



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 PLEŤOVÝCH MASEK S ÚČINKEM PROTI AKNĚ

PREPARATION OF SKIN MASKS WITH THE ANTI-ACNE EFFECT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Geierová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1803/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kateřina Geierová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a analýza přírodních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Příprava pleťových masek s účinkem proti akné

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše zaměřená na přehled typů pleťových masek, dále na metody přípravy a charakterizace nanovláken, materiály pro jejich výrobu a na přípravky proti akné
- 2) optimalizace přípravy nanovláken z vybraných biopolymerů metodou elektrostatického zvlákňování
- 3) funkcionalizace nanovláken vybranými přírodními antimikrobiálními látkami (eugenol, piperin), příprava aplikačních forem
- 4) testování antimikrobiální aktivity připravených produktů na buňkách *P. acnes*, *S. epidermidis* a *E. coli*

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kateřina Geierová
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci nanovláken s obsahem aktivních látek s cílem využít tyto materiály v pleťových maskách proti akné. Nanovlákná byla připravena z roztoku polyhydroxybutyrátu a z roztoku želatiny metodou elektrosponing. Z aktivních látek byl využit k funkcionalizaci nanovláken eugenol a piperin. V teoretické části byly charakterizovány typy pleťových masek, jednotlivé aktivní látky, materiály na přípravu nanovláken, jejich metody přípravy a jejich charakterizace.

V praktické části byla sledována antioxidační a antimikrobiální aktivita samotných účinných látek. Následně byla ve třech modelových prostředích sledována rychlost uvolňování vybraných aktivních látek z připravených nanovláken. U nanovláken byla sledována antimikrobiální aktivita na třech mikroorganismech, a to na *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* a *Escherichia coli*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanovlákná, polyhydroxybutyrát, želatina, antimikrobiální látka, *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

This bachelor thesis was focused on the preparation and characterization of nanofibers containing active agents with the aim of using these materials in anti-acne facial masks. The nanofibers were prepared from polyhydroxybutyrate solution and gelatin solution by electrospinning method. Among the active ingredients, eugenol and piperine were used to functionalize the nanofibers. In the theoretical part, the types of face masks, the individual active ingredients, the materials for the preparation of nanofibers, their preparation methods and their characterization were characterized.

In the practical part, the antioxidant and antimicrobial activity of the active ingredients themselves was investigated. Subsequently, the release rate of selected active ingredients from the prepared nanofibers was monitored in three model environments. The antimicrobial activity of the nanofibers was monitored on three microorganisms, namely *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* and *Escherichia coli*.

KEYWORDS

Nanofibers, polyhydroxybutyrate, gelatin, antimicrobial agent, *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli*

GEIEROVÁ, Kateřina. *Příprava pleťových masek s účinkem proti akné*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149209>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu, za její vstřícný přístup a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Lucii Dzurické za cenné rady, velkou ochotu, podporu, odborný dohled a trpělivost při zpracovávání mé experimentální části.

Obsah

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Pleťové masky.....	10
2.1.1 Typy pleťových masek	10
2.1.1.1 Látkové masky	10
2.1.1.2 Smývatelné masky	10
2.1.1.3 Slupovací masky	11
2.1.1.4 Hydrogelové masky	11
2.2 Nanomateriály	11
2.3 Nanovlákná	12
2.3.1 Materiály používané na přípravu nanovláken	12
2.3.1.1 Celulóza.....	12
2.3.1.2 Chitosan.....	13
2.3.1.3 Želatina.....	13
2.3.1.4 Přírodní polymery	13
2.3.2 Příprava nanovláken pomocí elektrospinningu	14
2.3.3 Příprava nanovláken pomocí forcespinningu	15
2.3.4 Další možnosti přípravy nanovláken	15
2.4 Antimikrobiální účinek	16
2.5 Antioxidační účinek	16
2.6 Antimikrobiální a antioxidační látky	17
2.6.1 Kurkumin.....	17
2.6.2 Eugenol.....	18
2.6.3 Piperin.....	19
2.7 Funkcionalizace nanovláken	19
2.8 Antimikrobiální testy	20
2.8.1 Difuzní metody	20
2.8.1.1 Disková difuzní metoda	20
2.8.2 Diluční metody	20
2.8.2.1 Bujónová diluční metoda	20
3 CÍLE PRÁCE	21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22

4.1	Použité chemikálie a pomůcky	22
4.1.1	Chemikálie použité při stanoveních	22
4.1.2	Chemikálie použité pro přípravu nanovláken.....	22
4.1.3	Chemikálie použité na práci s mikroorganismy	22
4.1.4	Přístroje a pomůcky	22
4.1.5	Použité mikroorganismy	23
4.1.6	Vybrané aktivní složky	23
4.2	Charakterizace aktivních látek	23
4.2.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	23
4.2.2	Stanovení celkových polyfenolů	23
4.2.3	Stanovení absorpčních maxim a kalibračních křivek.....	24
4.3	Příprava nanovláken.....	24
4.3.1	Příprava pracovního roztoku PHB pro zvlákňování.....	24
4.3.2	Příprava pracovního roztoku želatiny pro zvlákňování	24
4.3.3	Příprava PHB vláken pomocí elektrospinningu	24
4.3.4	Příprava želatinových vláken pomocí elektrospinningu.....	25
4.4	Charakterizace nanovláken	25
4.4.1	Uvolňování účinných látek z PHB nanovláken	25
4.4.2	Uvolňování účinných látek z želatinových nanovláken	25
4.5	Antimikrobiální testy	25
4.5.1	Příprava médií.....	26
4.5.2	Kultivace mikroorganismů	26
4.5.3	Bujónová diluční metoda.....	26
4.5.3.1	Stanovení antimikrobiální aktivity aktivních látek	26
4.5.3.2	Stanovení antimikrobiální aktivity nanovláken	27
4.5.4	Difuzní metoda	27
4.5.4.1	Příprava agarových ploten.....	27
4.5.4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	Charakterizace aktivních látek	28
5.1.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	28
5.1.2	Stanovení celkových polyfenolů	29
5.1.3	Stanovení absorpčních maxim a kalibračních křivek.....	29

5.2	Charakterizace nanovláken	31
5.2.1	Postupné uvolňování účinných látek z PHB nanovláken	31
5.2.1.1	Postupné uvolňování eugenolu	31
5.2.1.2	Postupné uvolňování polyfenolů z eugenolu	34
5.2.1.3	Postupné uvolňování piperinu.....	36
5.2.2	Postupné uvolňování účinných látek ze želatinových nanovláken.....	39
5.2.2.1	Postupné uvolňování eugenolu	39
5.2.2.2	Postupné uvolňování piperinu.....	40
5.3	Antimikrobiální testy	41
5.3.1	Eugenol a piperin.....	41
5.3.2	Stanovení antimikrobiální aktivity nanovláken z PHB	42
5.3.3	Stanovení antimikrobiální aktivity želatinových nanovláken	44
5.3.4	Difuzní metoda	47
5.4	Možné aplikace nanovláčkových struktur v kosmetice a farmacii	48
6	ZÁVĚR.....	50
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	62

1 ÚVOD

Pleťové masky jsou jedním z přípravků, které je vhodné zařadit do pravidelné péče o pleť. Masky se vyrábějí v různých formách, jako jsou viskózní gely, pasty či husté emulze. Mezi novější typy se řadí masky s obsahem nanovláken. Každý produkt má svoji specifickou funkci. Mezi hlavní cíle patří hydratace, vyhlazení pleti nebo pomoc při léčbě akné [1].

Nanovlákná jsou inovativní technologií, které se využívá v mnoha vědních oborech. V kosmetických produktech se využívají k vylepšení účinnosti, kdy vlákna pomáhají lepšímu prostupu účinných látek do kůže. Při enkapsulaci účinných látek do nanovláken je výhodou, že se aktivní látky snadněji vstřebávají a tím se zvýší jejich účinnost. Nanomateriály nacházejí uplatnění v krémech nebo v pleťových maskách [2].

Často se k enkapsulaci nanovláken využívá přírodních látek, mezi které patří například kurkuma, hřebíček nebo pepř. Tyto složky pomáhají při vyhlazení pleti, zarudnutí nebo při různých kožních onemocněních jako jsou ekzémy, lupenka nebo akné [3]. Zájem o léčbu přírodními látkami stále více narůstá. Hlavním důvodem je vysoká odolnost mikroorganismů na stávající antimikrobiální látky, a proto je potřeba hledat nové alternativy mezi které patří právě přírodní látky. Přírodní zdroje je možné použít jako samostatné řešení nebo jako doplněk k dalším léčivům [4][5].

Pro výrobu nanovlákných masek se využívá různých materiálů, nejčastěji jde o želatinu a celulózu. Želatina zajišťuje dobrý stav kůže, působí jako prevence před poškozením způsobeným UV zářením a také nachází uplatnění v přípravcích proti stárnutí kůže [6]. Celulóza se v kosmetice využívá při výrobě masek jako plnivo, stabilizátor, nosič, emulgátor a rozjasňovač [7]. Mezi další materiály se řadí přírodní polymery jako je například polyhydroxybutyrát. Tyto polymery se využívají jako bio implantátové náplasti, k podávání léčiv, dále v chirurgii a k obvazování ran [8][9][10].

Cílem této práce bylo připravit nanovlákná a obsahem aktivních látek za účelem využití těchto materiálů v pleťových maskách proti akné. Připravená nanovlákná a samotné aktivní látky byly charakterizovány z hlediska antimikrobiálních vlastností a obsahu polyfenolů. Dále bylo pozorováno postupné uvolňování účinných látek z nanovláken.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pleťové masky

Pleťové masky jsou na trhu již desítky let. Za tuto dobu bylo vylepšováno jejich složení, aby se dosáhlo vyšší účinnosti a zlepšení vlastností, díky kterým se odlišují od svých předchůdců. Tradiční pleťové masky se aplikují na obličej na určitou dobu v dostatečně silné vrstvě a nechávají se působit. O této vrstvě je známo, že rychle schne a zbylý film se sloupne nebo opláchne. Některé masky se masírují, dokud se neshluknou do snadno odstranitelných částic [1][11].

Na rozdíl od většiny kosmetických přípravků, které jsou využívány denně, se masky aplikují v určitých časových intervalech. Jedná se o jeden z nejoblíbenějších způsobů domácí i odborné péče o pleť [11].

Masky se dělí podle charakteru pleti a také podle požadovaného účinku. Místo aplikace a použité množství do značné míry určují reologické vlastnosti obličejových masek. Jsou formulovány jako viskózní gely, pasty nebo husté emulze. Obecně se jedná o přípravky snižující smyk, které se snadno a homogenně roztírají na obličej prsty. Po nanesení by vrstva masky měla zůstat na místě a nestékat. To je nezbytné, aby se produkt nedostal do očí a úst [12].

Hlavním kosmetickým cílem obličejových masek je poskytnout rychlou, hloubkovou hydrataci, doplnění a obnovení pleti, vstřebávání a eliminaci kožního mazu a omlazení pleti. Po sejmutí masky spotřebitelé navíc očekávají okamžitý zářivý vzhled pleti. V jiných případech a častěji v estetických praktikách se obličejové masky aplikují přes krém na obličej, aby napomohly pronikání aktivních látek podporou intenzivní hydratace pokožky. V tomto případě zůstávají déle na pokožce a jsou jemně odstraněny vlhčenými ubrousky [1].

Existují některé podkategorie obličejových masek, včetně těch, které zahrnují odpařování a ty, které jsou formulovány do substrátu, jako je látka, náplast, polštárek nebo polymerní film, aby se zachovala jejich aplikace. V odpařovacích maskách se voda nebo směs hydroalkoholických rozpouštědel odpaří a zanechá suchý zbytek pevných látek a činidla, která tvoří na obličejí film. Tento film slouží k napínání pokožky [12].

2.1.1 Typy pleťových masek

2.1.1.1 Látkové masky

Jedná se o jeden z nejvíce dostupných typů, jelikož je na trhu dlouhou dobu. Tyto masky poskytují rychlou hydrataci a ihned viditelný účinek na vrchní vrstvě kůže. Jejich nevýhodou je, že mohou obsahovat různé umělé vonné látky a barviva, které mohou být pro pleť škodlivé. Látkové masky zabraňují rychlému odpařování účinných složek a tím pádem podporuje proniknutí účinných složek do pokožky. Obsahují různé běžné složky jako Aloe Vera a vitamin C, ale také méně časté látky, například perly, výtažek ze šneků nebo mořské řasy [12].

2.1.1.2 Smývatelné masky

Smývatelné masky mohou mít různé účinky jako jsou hydratační, čistící, exfoliační a další. Masky mají různé přísady přírodního, ale i syntetického původu. Bylinné přípravky jsou vhodné díky své schopnosti zadržovat vlhkost. Syntetické složky mohou způsobovat alergické reakce a ekzémy. Bylinné hydratační masky se skládají ze sójového lecitinu, glycerinu a Aloe

Vera, dále mohou obsahovat vitamin C, santalový olej nebo růžovou vodu. Tyto masky jsou netoxické a ve většině případů nezpůsobují alergie [4].

2.1.1.3 Slupovací masky

Slupovací masky vytváří na pokožce film, který lze snadno sloupnout. Masky obsahují látky jako rostlinná mýdla, hydratační prostředky, vonné látky a konzervační složky. Hlavní složky tvoří alkoholy, které pokožku vysušují a určuje se podle nich délka aplikace. Samotná doba působení poté závisí na složkách masky. Ve slupovacích maskách se využívají různé složky jako antioxidanty, změkčovadla, látky se zklidňujícím účinkem nebo látky na redukci akné [7].

2.1.1.4 Hydrogelové masky

Hydrogelové masky se nejčastěji využívají pro citlivou pleť. Mají chladivé a zklidňující účinky. Tento typ je výhodný díky tomu, že se do pokožky absorbují složky, které mohou působit jako hydratační a ochranné látky, které pomáhají předcházet příznakům stárnutí a zlepšují kvalitu pleti. Jedná se například o glycerin, kyselinu hyaluronovou, perlový extrakt a směs rostlinných výtažků [17].

2.2 Nanomateriály

Nanomateriály jsou definovány jako jakýkoli organický, anorganický nebo organokovový materiál, jehož chemické, fyzikální a elektrické vlastnosti se mění v závislosti na velikosti a tvaru materiálu. Jedná se o materiály v rozmezí velikostí od 1 nm až po několik desítek nanometrů. U nanomateriálů se nachází velmi vysoký podíl povrchových atomů ve srovnání s vnitřními atomy [18].

Mezi nanomateriály patří například nanočástice, nanoliposomy a nanoemulze. Tyto materiály mají přínos pro lékařské odvětví díky tomu, že mají velkou povrchovou plochu, povrchovou reaktivitu a výhodou je také dobrá rozpustnost účinných látek, které jsou obsažené v nanokapsulích [19].

Nanomateriály mohou pocházet z několika zdrojů. Jedná se o přírodní, syntetické a ty, které vznikají neúmyslně. Přírodní materiály jsou vyrobené přírodní cestou a jsou často součástí biologických systémů. Nezáměrné mohou vzniknout jako vedlejší produkty různých průmyslových nebo mechanických procesů. Za tyto zdroje se dají považovat například výfukové plyny, vytápění tuhým palivem nebo opotřebení a koroze. Syntetické nanomateriály jsou účelově vyrobeny tak, aby měly požadované vlastnosti [18][20].

Nanomateriály lze klasifikovat podle jejich velikosti a rozměrů. Rozlišují se čtyři typy nanomateriálů, jako jsou bezrozměrné, jednorozměrné, dvourozměrné a třírozměrné. U nanomateriálů s nulovým rozměrem jsou všechny tři rozměry v řádu nanometrů a řadí se mezi ně například nanočástice. U jednorozměrných je jeden rozměr v nanometrech a zbývající se mohou pohybovat v makro rozměrech. Patří sem nanovlákna, nanodrátky a nanotrubičky. Dvourozměrné nanomateriály mají dva rozměry v nanometrech a jeden ve větších rozměrech. Trojrozměrné nanomateriály jsou materiály, které nejsou v žádném rozměru omezeny na nanoměřítka. Tato třída může obsahovat sypké prášky, disperze nanočástic, svazky nanodrátků a nanotrubiček i vícevrstvé nanomateriály [21].

2.3 Nanovláknna

Nanovláknna mají délku výrazně přesahující průměr, jedná se o velmi lehká vlákna. Mají obrovský měrný povrch, což znamená, že například membrána z nanovláken o rozměrech 1 m² má stejnou velikost povrchu jako fotbalové hřiště [22].

Nanovláknna mají vynikající mechanické vlastnosti, biologickou odbouratelnost, výborné povrchové vlastnosti, jsou schopné zadržet a rychle absorbovat molekuly. Díky svým vlastnostem nacházejí uplatnění, jako nosiče léčiv, v tkáňovém inženýrství, v potravinách, v kosmetice a v jiných vědních oborech [23].

Při využívání nanovláken v medicíně a kosmetice je důležitá jejich biokompatibilita. Vlákna nesmí být toxická a nesmí způsobovat zdravotní potíže. Cíleného uvolňování léčiv lze dosáhnout změnou struktury nanovláknenné membrány, obměnou tloušťky membrány a záleží také na biologické rozložitelnosti membrány. Jejich unikátní vlastností je vysoký poměr povrchové plochy a objemu, což umožňuje efektivní dodání léčiva [2].

Velký specifický povrch nachází uplatnění i v kosmetických produktech, jako jsou masky a náplasti na lokální použití. Tato formulace pomáhá zkvalitnit uvolňování jednotlivých složek. Velký povrch pleťových masek také zvyšuje optimální kontakt mezi pokožkou a maskou [24].

2.3.1 Materiály používané na přípravu nanovláken

Nanovláknna se vyrábějí z různých polymerních materiálů, které mohou být přírodní, syntetické či kombinované. Přírodní polymery mají lepší biokompatibilitu, na druhé straně syntetické polymery nabízejí větší flexibilitu při jejich syntéze. Mezi nejčastěji využívané přírodní polymery patří chitosan, celulóza, alginát, kolagen, želatina a další. Při výrobě nanovláken převažují syntetické polymery. Nejčastěji používané syntetické polymery jsou polyvinylalkohol, polykaprolakton, polyvinylpyrolidon a jejich kopolymery. Tyto polymery lze použít samostatně nebo v kombinaci s jinými syntetickými a přírodními polymery [25].

2.3.1.1 Celulóza

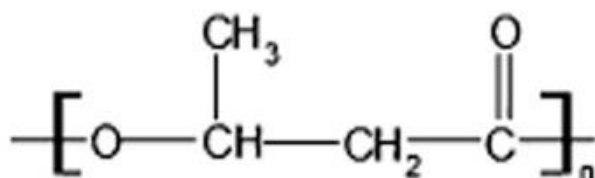
Celulóza se přirozeně vyskytuje v buněčných stěnách rostlin, konkrétně v dřevě. Svým chemickým složením se podobá škrobu. V potravinářství se využívá jako levná ingredience, která dokáže v potravinách výborně nahradit tuk, dodává tak jemnou, hutnou konzistenci. Pro člověka nemá žádnou výživovou ani léčivou hodnotu, ale jako vláknina je vhodná pro střevní mikroflóru. Není to alergen a nemá žádné dráždivé účinky [26].

Všechny vedlejší produkty celulózy mají poměrně stejné účinky (využívají se např. jako stabilizátory, emulgátory a zahušťovadla v pekařských výrobcích a při výrobě cukrovinek). Vyrábí se z ní guma, mikrokrystalická celulóza nebo rostlinné kapsle. Samotná celulóza má absorpční schopnosti, funguje jako plnidlo, zvyšuje hustotu a také pojí ostatní složky k sobě. Zajišťuje neprůhlednost produktu. V přípravcích o pokožku i vlasy napomáhá lepší kluznosti a roztíratelnosti [26].

Celulóza a její různé formy jsou vyhledávanou kosmetickou složkou používanou v celé řadě přípravků pro péči o pleť a vlasy. Tato složka funguje v kosmetice jako plnivo, stabilizátor, nosič, emulgátor a rozjasňovač [8].

řetězcem, který se skládá z 6-14 uhlíkatých monomerů. Typickým příkladem PHA s krátkým řetězcem jsou například poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(3-hydroxyvalerát) (PHV) a jejich kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV). Poly(3-hydroxyoktanoát) (PHO) a poly(3-hydroxynonanoát) (PHN), které jsou primárně tvořeny kopolymery s 3-hydroxyhexanoátem (HHx), 3-hydroxyheptanoátem (HH) nebo 3-hydroxydekanóátem (HD), jsou typickými příklady PHA se středně dlouhým řetězcem. Bylo identifikováno více než 150 různých monomerů PHA, což z nich činí největší skupinu přírodních polyesterů [31].

Polyhydroxybutyrát (Obrázek 2) lze získat v širokém rozmezí molekulových hmotností. Jeho termoplastické vlastnosti a biologická rozložitelnost bez vzniku toxických vedlejších produktů z něj činí udržitelnou alternativu k plastům na bázi ropy. Kromě toho se tento polymer vyrábí biotechnologickými strategiemi, které umožňují kontrolovat jeho chemické složení, a tedy i jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Jedná se o nejběžnější polyhydroxyalkanoát produkovaný bakteriemi jako zásobní materiál za omezených růstových podmínek. Tento polymer vykazuje zajímavé vlastnosti, jako je vysoká biokompatibilita se savčími buňkami, díky čemuž je vhodný pro lékařské aplikace [27].



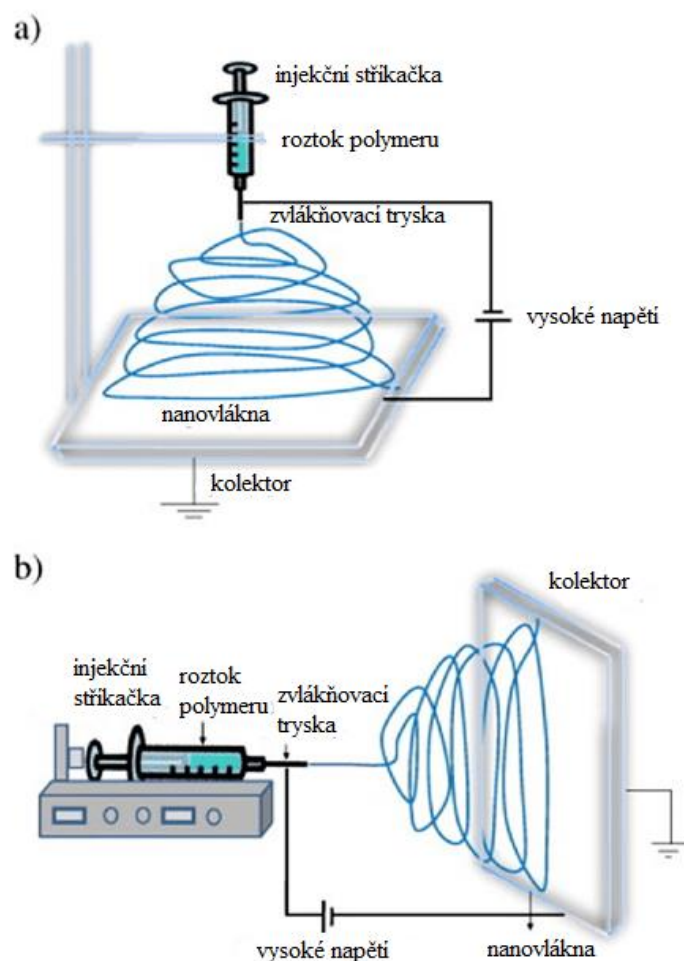
Obrázek 2: Chemická struktura polyhydroxybutyrátu (PHB) [10]

2.3.2 Příprava nanovláken pomocí elektrospinningu

Prvním způsobem výroby je elektrospinning (Obrázek 3). Jedná se o populární metodu výroby, která využívá při výrobě vysokého napětí o velikosti několika desítek kilovoltů [22].

Principem této metody je produkce tenkých polymerních vláken z roztoku polymeru, a to působením elektrostatických sil. Na konec kapiláry, ve které je roztok polymeru, je aplikováno elektrické pole, což indukuje náboj na povrchu kapaliny. Jak se elektrické pole zvětšuje, kapka na konci kapiláry se začne prodlužovat a tvořit tzv. Taylorův kužel [33].

Následným zvyšováním potenciálu je překonáno povrchové napětí a ve směru sběrné desky se tvoří polymerní vlákno. Vznikající vlákno se v elektrickém poli začne natahovat a tím zároveň i zužovat, až je vlákno úzké natolik, že dosáhne nanorozměrů. Vlákno poté dopadne na sběrnou desku, kde se s ním může nadále pracovat [22].



Obrázek 3: Schéma elektrospinningu a) vertikální uspořádání b) horizontální uspořádání [34]

2.3.3 Příprava nanovláken pomocí forcespinningu

Forcespinning je technika, která využívá odstředivou sílu. Zvlákňovací tryska rotuje a obsahuje polymerní roztok nebo taveninu. Ve chvíli, kdy je rychlost otáčení dostatečně vysoká, začne být proud kapaliny vypuzovaný z trysky. Tento proud se začne natahovat a dopadat na kolektor ve formě hotových nanovláken. Vzhled a tvar nanovláken lze korigovat pomocí rychlosti otáčení, teploty a systému sbírání hotových nanovláken [31].

Výhodou je vysoká produkce vláken za krátký časový úsek a také lze využít velké množství materiálů, jako polymery, kovy nebo keramiku [35].

2.3.4 Další možnosti přípravy nanovláken

Elektrospinning a forcespinning se řadí díky své jednoduchosti mezi jedny z nejčastějších způsobů přípravy nanovláken. Existuje ale řada jiných možností pro jejich přípravu. Mezi další metody přípravy se řadí například tažení, samosběr, fázové dělení a další [37].

Tažení lze charakterizovat jako suché zvlákňování na molekulární úrovni. Tuto metodu lze využít pouze pro viskoelastické materiály, které mohou dosáhnout vysokého stupně deformace, ale zároveň zůstávají dostatečně pevné, aby udržely vzniklé napětí během tažení. Metoda tažení vyžaduje povrch z oxidu křemičitého, mikropipetu a mikromanipulátor. Mikropipeta se pomocí mikromanipulátoru ponoří do kapky v blízkosti kontaktní linie. Mikropipeta je poté vyjmuta

z kapaliny rychlostí asi $1 \cdot 10^{-4}$ m/s a současně se z kapaliny natahuje vlákno. Kvůli nízké univerzálnosti se metoda nevyužívá v průmyslovém měřítku [38].

Při metodě samosběru se molekuly a atomy uspořádávají a sestavují za pomoci křehkých a nekovalentních sil, například hydrofobních sil, elektrostatických interakcí a vodíkových můstků a vytvářejí stabilní struktury. Vlákna získaná touto metodou mohou být mnohem tenčí než vlákna připravená pomocí elektrospinningu. Hlavním problémem spojeným s metodou samosběru je komplikovanost postupu a nízká produktivita [37].

Metoda fázového dělení se skládá z pěti hlavních fází. Jedná se o přípravu homogenního roztoku polymeru, proces separace fází, gelaci, extrakci rozpouštědla, zmrazení a lyofilizaci ve vakuu. Nejprve se polymer smíchá s rozpouštědlem a poté dojde ke gelaci. Hlavním mechanismem v tomto systému je separace fází v důsledku fyzikální nesoudržnosti. Fáze s rozpouštědlem je odpařena a po vysušení se získávají nanovlákna. Hlavní nevýhodou této metody je, že k získání nanovláken fázovou separací lze použít pouze několik polymerů. Důvodem je, že ne všechny polymery jsou s tímto postupem kompatibilní, protože je potřeba určitá schopnost gelovatění [34].

2.4 Antimikrobiální účinek

Antimikrobiální účinek je schopnost látek usmrcovat nebo inhibovat růst mikroorganismů. Antimikrobiální látky pronikají do samotné buňky a zabraňují tak mikroorganismům získávat živiny, které jsou důležité pro jejich přežití a rozmnožování. Antimikrobiální látky působí v buňce mikroorganismů různými způsoby, mohou poškodit buněčnou stěnu a způsobit její lýzu. Zasahují také do metabolických procesů a mohou inhibovat syntézu proteinů. Tyto látky působí v mikroorganismech různými způsoby [36]. Podle jejich celkového účinku je lze rozdělit na bakteriostatické, zastavující růst a baktericidní, usmrcující. Lze je rozdělit podle jejich aktivity na antimykotické, antibakteriální, antivirové a antiparazitické. Většinou se jedná o látky rostlinného původu, ale mohou vznikat i různými modifikacemi látek přírodních. Lze je také rozlišovat podle toho, zda jsou rostlinného, mikrobiálního nebo živočišného původu [37].

2.5 Antioxidační účinek

Antioxidační účinek je schopnost látek vylučovat volné radikály a chránit buňky před oxidačním stresem. Antioxidační látky hrají klíčovou roli v ochraně rostlin před poškozením znečištěním, zabraňují vzniku chorob u rostlin a živočichů a jsou důležité pro obranný systém organismu [43][44].

Volné radikály jsou molekuly nebo atomy, které obsahují nespárovaný elektron a mají tendenci reagovat s jinými molekulami. Jedná se o vysoce reaktivní a nestabilní látky. Nerovnováha mezi jejich tvorbou a odstraňováním vede k oxidačnímu stresu, který může vést k poškození všech typů tkání. Působení volných radikálů vede k poškození buněk, rychlejšímu procesu stárnutí, a navíc k nádorovým onemocněním v důsledku destrukce genetických buněčných struktur materiálu [45].

Za normálních podmínek dokáže antioxidační systém v lidském těle tyto radikály zneškodnit a udržet rovnováhu mezi jejich tvorbou a odstraňováním. Ale vlivem mnoha faktorů, jako je UV záření, vysoká teplota, znečištění životního prostředí, cigaretový kouř, alkohol, vzniká nadměrné množství volných radikálů. V důsledku toho dochází k nerovnováze a vzniku oxidačního stresu [46].

Volné radikály jsou schopny buď darovat elektron, nebo přijmout elektron z jiných molekul, a tak mohou reagovat jako oxidační nebo redukční činidla. Redukcí kyslíku vznikají reaktivní formy kyslíku. Mezi tyto formy patří superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál [47]. Při procesu dýchání mohou při přenosu elektronů z jednoho komplexu na druhý unikat elektrony, které následně reagují s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu. Následně reakcí s dalším elektronem za vzniku peroxidu vodíku. Ten není považován za vysoce reaktivní, ale slouží jako meziprodukt pro tvorbu hydroxylového radikálu. Podobně superoxidový radikál sám o sobě není příliš reaktivní, ale může velmi rychle reagovat s oxidem dusnatým za vzniku peroxydusitanu. Tyto sloučeniny se klasifikují jako reaktivní formy dusíku [43][44].

Vzniklé volné radikály poškozují proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. V proteinech dochází k deformaci a ztrátě jejich biologických vlastností. Dochází k oxidaci lipidů na buněčných membránách. Při oxidačním poškození nukleových kyselin dochází k mutacím a vzniku nádorů [47].

Látky s antioxidačním účinkem používané v potravinách, kosmetice a v léčivých přípravcích jsou nejčastěji přírodního původu, protože nemají škodlivé účinky na lidský organismus. Patří mezi ně např. sloučeniny rostlinného původu, jako jsou polyfenoly, vitamíny, β -karoten a další [47].

2.6 Antimikrobiální a antioxidační látky

Antimikrobiální látky lze rozdělit podle druhu mikroorganismu na který primárně působí. Patří sem antibiotika, která působí proti bakteriím a antimykotika působící proti houbám. Dále je možné je rozdělit také podle jejich funkce na látky bakteriostatické, které inhibují růst a baktericidní, usmrcující mikroorganismy [50][51].

Mezi látky s antimikrobiálním a antioxidačním účinkem se řadí polyfenoly, flavonoidy, alkaloidy a terpeny. Tyto látky se přirozeně vyskytují v potravinách jako jsou obiloviny, čaj, káva, ovoce a zelenina [52][53].

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin a podílejí se na obraně proti ultrafialovému záření. Chemicky jsou charakterizovány více fenolovými jednotkami, včetně flavonoidů, katechinů a antokyanů. Antioxidačních a protizánětlivých účinků polyfenolů se využívá k léčbě různých zánětů a chorob nebo v kosmetických přípravcích ke zpomalení stárnutí pokožky. Dlouhodobá konzumace polyfenolů chrání před zánětem a souvisejícími chorobami. V potravinách jsou polyfenoly zodpovědné za hořkost, trpkost, barvu, chuť a vůni [49][50].

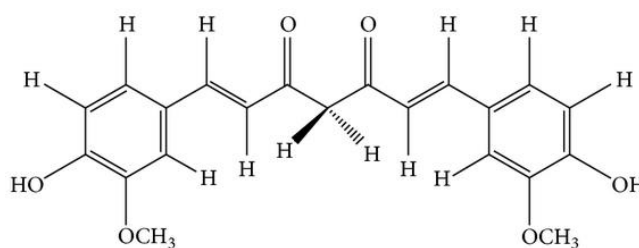
Antimikrobiální aktivitou se vyznačují také alkaloidy. Jde o heterocyklické sloučeniny dusíku, které se vyskytují jako soli organických kyselin nebo jako volné zásady. Mezi alkaloidy patří například kyselina nikotinová, kofein a chinin, které se nacházejí v nealkoholických nápojích, v kávě a v čaji [56][57].

2.6.1 Kurkumin

Kurkuma se získává z rostliny *Curcuma longa*, která se obvykle pěstuje v Indii, Číně a jihovýchodní Asii. Kurkumin (Obrázek 4), hlavní kurkuminoid obsažený v kurkumě, se již dlouho používá v tradiční indické a čínské medicíně k léčbě různých onemocnění, včetně žloutenky a jaterních poruch, revmatismu, anorexie a diabetických ran. Jedná se o oranžovožlutou složku kurkumy, je to polyfenol zodpovědný za regulaci mnoha signálních

drah a působí širokým spektrem biologických a farmakologických vlastností včetně protizánětlivých, antioxidantních, antibakteriálních, antikarcinogenních, neuroprotektivních, chemoprotektivních, vazodilatačních a účinků. Na rozdíl od komerčně dostupných léčiv se předpokládá, že nemá žádné závažné vedlejší účinky [53]. Kurkumin má dvě tautomerní formy, keto-formu a enol-formu. Je prakticky nerozpustný při pokojové teplotě ve vodných roztocích při neutrálním a kyselém pH. Je však rozpustný v organických rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, aceton a dimethylsulfoxid. Při neutrálním i kyselém pH převažuje ketoforma, enolový tautomer je přítomen výhradně v alkalických podmínkách. Rozpustnost kurkuminu ve vodném roztoku se zvyšuje za alkalických podmínek. Má především tři reaktivní místa, což jsou dvě fenolové skupiny a jedna diketonová skupina [58][59].

Kurkumin je také významným antioxidantem, který minimalizuje účinky oxidačního stresu. Účinně vychytává různé reaktivní formy kyslíku, včetně volného radikálu superoxidového aniontu a hydroxyradikálu. Kurkumin má také schopnost chránit lipidy, hemoglobin a DNA před oxidativní degradací. Snižuje toxicitu vyvolanou těžkými kovy tím, že vytváří stabilní komplexy s těžkými kovy, jako je měď, chrom, arsen, rtuť, olovo a kadmium. Je také schopný regulovat aktivitu mnoha enzymů [60][61].

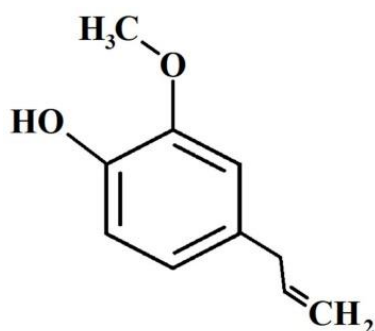


Obrázek 4: Chemická struktura kurkuminu [59]

2.6.2 Eugenol

Eugenol (Obrázek 5) je těkavý bioaktivní přírodní fenolický monoterpenoid. Obvykle se vyskytuje v různých aromatických bylinách, jako je hřebíček, skořice, muškátový oříšek a pepř, ale hlavně se izoluje z rostliny hřebíček (*Eugenia caryophyllata*). Eugenol je dobře známý pro své rozmanité využití v různých oblastech, jako je farmaceutický, potravinářský, aromatický, kosmetický, zemědělský a řada dalších průmyslových odvětví. Eugenol je dobře známý pro své farmakologické vlastnosti, a to antimikrobiální, protirakovinné, antioxidantní, protizánětlivé a analgetické účinky. Různé deriváty eugenolu se používají v medicíně jako lokální anestetika a antiseptika. Výtažky z hřebíčku se nacházejí v mnoha krémech, pleťových vodách a koupelových olejích pro lokální použití a příležitostně v zubních pastách. Bez ohledu na četná použití vykazuje eugenol také různé nežádoucí účinky, zejména pokud se užívá v nadměrném množství, než je doporučené dávkování. Může způsobit nevolnost, závratě, křeče a zrychlený srdeční tep [62][63].

Eugenol má antioxidantní schopnosti, dokáže inhibovat lipidovou peroxidaci vyvolanou reaktivními formami kyslíku. Inhibuje také tvorbu superoxidového radikálu a může inhibovat tvorbu hydroxylového radikálu. Zabraňuje oxidaci Fe^{2+} ve Fentonově reakci, při níž vzniká jeden z nejagresivnějších radikálů pro lidskou tkáň. Účinky eugenolu vždy závisí na použitém množství [64].

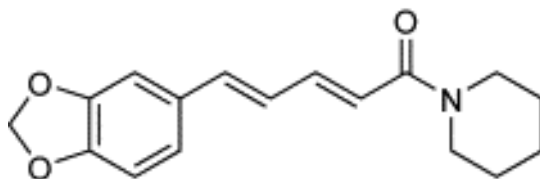


Obrázek 6: Chemická struktura eugenolu [65]

2.6.3 Piperin

Piperin (Obrázek 6) je převládající alkaloid obsažený v plodech a kořenech druhů *Piper nigrum* L. (černý pepř) a *Piper longum* L. (dlouhý pepř) z čeledi *Piperaceae*. Piperin je pevná látka, která je ve vodě v podstatě nerozpustná. Zpočátku je bez chuti, ale zanechává palčivou pachut'. Piperin patří do skupiny vaniloidních sloučenin, kam patří také kapsaicin, pálivá látka v pálivých chilli papričkách. Piperin vykazuje antioxidační, protizánětlivé, antiastmatické, antimutagenní, antimykobakteriální a protirakovinné účinky. Může mít aktivitu zvyšující biologickou dostupnost některých nutričních látek a některých léčiv [66][67].

Piperin má také antioxidační účinky, kdy chrání před oxidačním poškozením tím, že inhibuje nebo tlumí volné radikály a reaktivní formy kyslíku a hydroxylové radikály [68].



Obrázek 7: Chemická struktura piperinu [67]

2.7 Funkcionalizace nanovláken

Při funkcionalizaci nanovláken dochází k začlenění vhodných materiálů do nanovlákněných struktur. Funkcionalizované nanomateriály mají mimořádně užitečné vlastnosti, kterými mohou předčit své konvenční protějšky díky svým vynikajícím chemickým, fyzikálním a mechanickým vlastnostem a výjimečné tvarovatelnosti. Využívají se pro vývoj a inovace v řadě průmyslových odvětví. Funkcionalizací se rozumí modifikace povrchu nanovláken, která zahrnuje konjugaci chemických látek nebo biomolekul na povrch, jako je kyselina listová, molekuly biotinu, oligonukleotidy, peptidy, protilátky a další. Funkcionalizace může být provedena nekovalentně, kovalentně popřípadě pokrýváním nanočástic danou látkou [69][70].

Při kombinování nanočástic a nanovláken se maximalizuje jejich funkce. Kombinování poskytuje podporu nanočásticím a také zvětšuje povrch nanočástic a kontaktní plochu. Další výhodou kompozitů nanočástic a nanovláken je, že snižují sekundární znečištění způsobené čistými nanočásticemi, protože tyto nanočástice se uvolní do životního prostředí a je obtížné je odstranit. Nejnovější výzkumy ukazují, že nanočástice mají vedlejší účinky na člověka i na životní prostředí [71].

2.8 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální testy jsou metody využívané na stanovení mikrobiální aktivity ve studovaných vzorcích. Jedním z běžně stanovovaných parametrů je MIC, což je minimální inhibiční koncentrace. Jde o nejnižší koncentraci testované antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. Dále je možné stanovit například MLC, což je minimální letální koncentrace. Mezi nejběžnější a tradiční metody se řadí difuzní a diluční metody [72][73].

2.8.1 Difuzní metody

Principem difuzních metod je difuze testované látky ze zdroje do okolí. Jedná se o metodu kvalitativní. Na základě velikosti inhibičních zón se posuzuje, zda se jedná o bakterie citlivé, nebo rezistentní. Tato metoda není nejvhodnější pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), jelikož není možné určit množství antimikrobiální látky difundované do agaru. Časté používání difuzních metod je spojeno především s jednoduchostí provedení a nízkou cenou. Získané výsledky se dají lehce vizualizovat [72][74][75].

2.8.1.1 Disková difuzní metoda

U diskové difuzní metody se agarové médium naočkuje testovaným mikroorganismem. Poté se na povrch agaru umístí disk z filtračního papíru, který je napuštěný sloučeninou aktivní látky. Pokud jsou testované látky mikrobiologicky aktivní, vytvoří se po inkubaci kolem disku z filtračního papíru inhibiční zóna. Měří se průměry inhibičních růstových zón [76][77].

2.8.2 Diluční metody

Diluční metody jsou kvantitativní a používají se ke zjištění minimální inhibiční koncentrace. Tyto metody spočívají v inhibici růstu mikroorganismů danou koncentrací antimikrobiální látky. Jsou nejvhodnější, jelikož umožňují přesný odhad koncentrace inhibující testované látky [73][76].

2.8.2.1 Bujónová diluční metoda

Jedná se o jednu z nejzákladnějších metod na testování antimikrobiální aktivity. Při bujónové diluční metodě je na mikrotitrační destičce měřen zákal roztoku indikátorového kmenu bakterií. V jamkách destičky se nachází médium, které obsahuje klesající koncentraci antimikrobiální látky. Každá jamka je naočkována mikrobiálním inokulem a destička je inkubována za vhodných podmínek. Po inkubaci se hledá jamka, kde nevznikl zákal či sediment, což ukazuje na minimální inhibiční koncentraci látky. Vyhodnocení se provádí pomocí spektrofotometrického stanovení či turbidimetry [73][78].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je příprava funkcionalizovaných nanovláken s antimikrobiálním účinkem, které je možné následně využít v přípravcích proti akné. Součástí práce je řešení následujících dílčích úloh:

1. rešerše zaměřená na přehled typů pleťových masek, na metody přípravy a charakterizace nanovláken, materiály pro jejich výrobu a na přípravky proti akné
2. optimalizace přípravy nanovláken z vybraných biopolymerů metodou elektrostatického zvlákňování
3. funkcionalizace nanovláken vybranými přírodními antimikrobiálními látkami (eugenol, piperin), příprava aplikačních forem
4. testování antimikrobiální aktivity připravených produktů na buňkách *P. acnes*, *S. epidermidis* a *E. coli*

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a pomůcky

4.1.1 Chemikálie použité při stanoveních

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS, Sigma-Aldrich (Německo)

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina), Sigma Aldrich (Německo)

Ethanol pro UV/VIS, Penta (Česká republika)

Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)

Folin-Ciocalteuovo činidlo, VWR Chemicals BDH (Francie)

Uhličitan sodný, Lach-ner (Česká republika)

Kyselina gallová monohydrát, Sigma-Aldrich (Německo)

4.1.2 Chemikálie použité pro přípravu nanovláken

Chloroform, VWR Chemicals BDH (USA)

Polyhydroxybutyrát, VWR Chemicals BDH (USA)

Tetraethylamonium bromid, Sigma Aldrich (Německo)

Kyselina octová, Lach-ner (Česká republika)

Želatina, Lach-ner (Česká republika)

4.1.3 Chemikálie použité na práci s mikroorganismy

LB médium, Sigma-Aldrich (Německo)

BHI médium, Himedia (India)

Agar, Himedia (India)

Ethanol, Lach-ner (Česká republika)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

4.1.4 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy OHAUS Pioneer, OHAUS (Švýcarsko)

Předvážky OHAUS Scout, OHAUS (Švýcarsko)

Fixed Speed Vortex Mixer, Ohaus (Čína)

Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat-Verkon (Česká republika)

Automatické pipety o různých objemech, Discovery (Německo), Biohit (Německo)

ELISA Reader BioTek ELx800, Biotek (Německo)

Software Gen 5, BioTek (USA)

Laminární box Aura mini, BioAir Instruments (USA)

Spektrofotometr UV-1600PC, VWR International (USA)

Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (Česká republika)

Mikrovlnný autokláv Microjet, ENBIO (Polsko)

Regulovatelný zdroj napětí

NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)

4.1.5 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity mikroorganismy pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

Escherichia coli CCM 7395

Staphylococcus epidermidis CCM 4418

Cutibacterium acnes CCM 3343

4.1.6 Vybrané aktivní složky

Eugenol, Sigma-Aldrich (Německo)

Piperin, Sigma-Aldrich (Německo)

4.2 Charakterizace aktivních látek

Byly vybrány dvě aktivní látky, a to eugenol a piperin, u kterých byly stanovovány základní charakteristiky. U testovaných látek byla stanovena celková antioxidační aktivita a u eugenolu byl stanoven celkový obsah polyfenolů. Následně byly u látek stanovena absorpční maxima a sestavené jejich kalibrační přímky.

4.2.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), která spočívá v hodnocení schopnosti vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Následně byl ABTS přidán peroxidisíran draselný o koncentraci 2,45 mM. Poté byl roztok ponechán ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 12 hodin. Před měřením byl roztok ABTS^{•+} zředěn ethanolom pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm proti ethanolu pro UV/VIS. Do kyvety byl odpipetován 1 ml zředěného roztoku ABTS^{•+} a 10 μ l chloroformu a ihned byla změřena absorbance v čase 0 (A_0). Do další kyvety byl pipetován 1 ml roztoku ABTS^{•+} a do ní bylo přidáno 10 μ l vzorku. Vzorek byl promíchán a ponechán ve tmě. Po 10 minutách byl změřen pokles absorbance (A_1) při 734 nm. Rozdíl těchto hodnot ($A_0 - A_1$) byl přizpůsoben kalibrační závislosti standardu Troloxu, který byl rozpuštěn v 60% ethanolu v koncentračním rozmezí 40 až 360 μ g/ml.

4.2.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení obsahu celkových polyfenolů bylo provedeno spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Nejprve byl připraven roztok nasyceného uhličitanu sodného a zředěný vodný roztok Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9. Do zkumavky byl odpipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 100 μ l vzorku. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a ponechán stát. Po pěti minutách bylo do každé zkumavky k roztoku přidáno po 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a opět bylo vše dobře promícháno. Po 15 minutách byla změřena absorbance při 750 nm proti slepému vzorku (kde namísto 100 μ l vzorku bylo použito 100 μ l destilované vody). Obsah celkových polyfenolů ve vzorku byl vypočítán dosazením získané absorbance vzorku do rovnice kalibrace, která byla sestavena pro roztok kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,1 až 0,5 mg/ml.

4.2.3 Stanovení absorpčních maxim a kalibračních křivek

Pro samotnou charakterizaci aktivních látek byla nejprve pomocí spektrofotometru změřena absorpční maxima eugenolu a piperinu. Absorpční maxima byla získána proměřením absorpčních spekter v rozmezí vlnových délek 200–400 nm.

Následně byly sestaveny kalibrační přímky pro jednotlivé látky, které byly rozpuštěny v chloroformu.

Byly připraveny roztoky eugenolu o koncentraci 0,5–50,0 µg/ml. U těchto koncentrací byla pro eugenol změřena absorbance při vlnové délce 282 nm a byla sestavena kalibrační přímka.

Roztoky piperinu byly připraveny o koncentraci 0,2–7,0 µg/ml. Tyto roztoky piperinu byly proměřeny při vlnové délce 342 nm a byla sestavena kalibrační křivka.

4.3 Příprava nanovláken

Pro přípravu nanovláken byly namíchány roztoky ke zvlákňování, a to roztok polyhydroxybutyrátu a roztok želatiny. PHB byl vybrán jako zástupce nerozpustného materiálu a želatina, jakožto rozpustný polymer. Nanovláknina byla připravována pomocí elektrospinningu. Nanovláknina byla připravena čistá a také s obsahem aktivních látek.

4.3.1 Příprava pracovního roztoku PHB pro zvlákňování

Na přípravu vláken byl nachystán 2% roztok PHB v chloroformu a bylo přidáno 0,2 % tetraethylamonium bromidu. Dané množství polyhydroxybutyrátu a tetraethylamonium bromidu bylo naváženo a smícháno s chloroformem. Takto připravená směs byla zahřívána na magnetické míchačce při teplotě 100 °C, dokud nebylo celé množství PHB rozpuštěné. Takto připravený roztok byl následně použitý pro samotnou přípravu vláken.

4.3.2 Příprava pracovního roztoku želatiny pro zvlákňování

Byl připraven 30% zásobní roztok želatiny v 50% roztoku kyseliny octové. Potřebné množství želatiny bylo naváženo a smícháno s 50% roztokem kyseliny octové. Takto připravená směs byla zahřívána na magnetické míchačce ve vodní lázni při teplotě 50 °C, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění želatiny. Takto připravený roztok byl následně použitý pro samotnou přípravu vláken.

4.3.3 Příprava PHB vláken pomocí elektrospinningu

Elektrostatické zvlákňování bylo provedeno na elektrospinningovém zařízení sestaveném na FCH VUT v Brně. Injekční stříkačka byla naplněna 10 ml zásobního roztoku PHB a byla uchycena na dávkovací pumpu. Konec stříkačky byl obalen alobalem, na který byl připojen zdroj vysokého napětí. Ke zdroji byl rovněž připojen kolektor tvořený kovovou deskou pokrytou hliníkovou fólií. Na kolektor byl připevněn měděný drát, který sloužil jako uzemnění. Vzdálenost mezi stříkačkou a kolektorem byla nastavena na 10 cm. Použitá stříkačka měla průměr 16 mm. Zvlákňování probíhalo při napětí 15 kV a průtoku 4 až 9 ml/h. Za těchto podmínek byla připravena čistá PHB vlákna i vlákna s aktivními látkami. Pro přípravu vláken s účinnými látkami byly vypočítány navážky těchto látek pro 1%, 2%, 5% a 10% množství aktivní látky na celkový pevný podíl PHB v 10 ml. Po ukončení zvlákňování byla vytvořená vlákna opatrně sloupnuta ze sběrače a uložena do Petriho misky pro další práci.

4.3.4 Příprava želatinových vláken pomocí elektrospinningu

Příprava želatinových vláken probíhala na stejném zařízení jako příprava PHB vláken. Injekční stříkačka byla naplněna 5 ml zásobního roztoku želatiny a byla uchycena na dávkovací pumpu. Jehla stříkačky byla připojena ke zdroji vysokého napětí. Ke zdroji byl také připojen kolektor. Vzdálenost mezi jehlou a kolektorem byla nastavena na 10 cm. Použitá jehla měla průměr 1,2 mm a délku 2 cm. Zvlákňování bylo prováděno při napětí 15 kV a průtoku 0,4 až 1,2 ml/h. Za těchto podmínek byla připravena čistá želatinová vlákna i vlákna s obsahem účinných látek. Pro přípravu vláken s eugenolem a piperinem byly vypočítány navážky pro 1%, 2%, 5% a 10% množství aktivní látky na celkový pevný podíl želatiny v 5 ml. Tyto navážky byly smíchány s 250 µl ethanolu a tato směs byla přidána k 5 ml roztoku želatiny. Po ukončení zvlákňování byla vytvořená vlákna opatrně sloupnuta z kolektoru a uložena do Petriho misky pro další práci.

4.4 Charakterizace nanovláken

U nanovláken bylo sledováno uvolňování účinných látek. Měření bylo prováděno ve třech modelových prostředích – ve vodě, ve fyziologickém roztoku a ve fyziologickém roztoku zahřátém na 37 °C. Modelová prostředí byla vybrána podle možné budoucí aplikace v pleťových maskách, jelikož zvolené podmínky mohou nastat při finálním použití.

4.4.1 Uvolňování účinných látek z PHB nanovláken

Uvolňování účinných látek z nanovláken bylo stanovováno spektrofotometricky. Měření bylo prováděno ve třech modelových prostředích – ve vodě, ve fyziologickém roztoku a ve fyziologickém roztoku zahřátém na 37 °C. Byla připravena nanovlákná podle postupu v kapitole 4.4.3. Připravená nanovlákná byla nastříhána na čtverečky o velikosti 1 cm². Každý čtverec byl zvážen a vložen do 1,5 ml daného prostředí. Vzorky ve fyziologickém roztoku zahřátém na 37 °C byly umístěny na temperovanou třepačku a vzorky ve vodě a v nezahřátém fyziologickém roztoku byly ponechány při laboratorní teplotě. Měření probíhalo v časech 15 minut, 60 minut, 3, 8, 24, 48 a 72 hodin. Uvolněná látka byla vytřepána do chloroformu, následně byla změřena absorbance a bylo vypočteno množství uvolněné látky. U PHB nanovláken s obsahem eugenolu byla látka vytřepána do chloroformu a také byl měřen obsah uvolněných polyfenolů podle postupu v kapitole 4.2.2.

4.4.2 Uvolňování účinných látek z želatinových nanovláken

Měření bylo prováděno pouze v jednom prostředí – ve vodě. Byla připravena nanovlákná podle postupu v kapitole 4.4.4. Připravená nanovlákná byla nastříhána na čtverečky o velikosti 1 cm². Každý čtverec byl zvážen a vložen do 1,5 ml vody. Měření bylo prováděno ihned po rozpuštění želatinového nanovlákná. Uvolněná látka byla vytřepána do chloroformu, následně byla změřena absorbance při vlnové délce 282 nm pro eugenol a 342 nm pro piperin a bylo vypočteno množství uvolněné látky. U želatinových nanovláken s obsahem eugenolu byla látka vytřepána do chloroformu a byl měřen i obsah uvolněných polyfenolů podle popisu v kapitole 4.2.2.

4.5 Antimikrobiální testy

Při antimikrobiálních testech byly stanovovány antimikrobiální vlastnosti eugenolu a piperinu a také funkcionalizovaných nanovláken. Pro stanovení antimikrobiálních vlastností byly vybrány tři mikroorganismy, a to *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*

a *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*). Pro provedení testů bylo nejprve nutné mikroorganismy nakultivovat v tekutém médiu.

4.5.1 Příprava médií

Pro kultivaci jednotlivých mikroorganismů bylo vždy zvolené a připravené vhodné tekuté médium. Média byla připravována do Erlenmeyerových baněk, kam bylo naváženo potřebné množství látky (Tabulka 1) a bylo rozmícháno v daném množství destilované vody. Médium bylo následně sterilováno.

Tabulka 1: Použitá média pro kultivaci mikroorganismů

Mikroorganismus	Médium
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI médium – 37 g/l
<i>Cutibacterium acnes</i>	BHI médium – 37 g/l
<i>Escherichia coli</i>	LB médium – 20 g/l

4.5.2 Kultivace mikroorganismů

Mikroorganismy uchovávané v kryozkumavkách byly převedeny do 50 ml tekutého sterilního média. Zaočkované mikroorganismy byly kultivovány v inkubačním boxu za stálého třepání a při teplotě 37 °C. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin.

4.5.3 Bujónová diluční metoda

Pro tyto testy byla odebrána část inokula. Kultura byla naředěna sterilním médiem na hodnotu 0,5 McFarlandovy stupnice, tento roztok byl následně dále ředěn na vhodnou hodnotu podle daného mikroorganismu. Antimikrobiální vlastnosti byly stanovené pomocí bujónové diluční metody. Byly používány destičky s 96 a 24 jamkami a byla sledovaná inhibice růstu mikroorganismů za použití přístroje ELISA Reader BioTek. U připravených mikrotitračních destiček byla stanovena absorbance při vlnové délce 630 nm v čase 0 a následně po 24 hodinách.

4.5.3.1 Stanovení antimikrobiální aktivity aktivních látek

Pro testování aktivních látek byly použity destičky s 96 jamkami. Do každé jamky bylo pipetováno sterilní médium a roztok aktivní látky. Byly připraveny roztoky aktivní látky o koncentraci 16 mg/ml rozpuštěné v 10% dimethylsulfoxidu (DMSO), které byly naředěny dvojkovým ředěním. Nakonec bylo do jamek napipetováno 100 µl vhodně naředěné kultury mikroorganismu. Jako kontrola média bylo do jamek napipetováno 200 µl sterilního média. Jako kontrola buněk bylo do jamek pipetován 100 µl média a 100 µl naředěné kultury mikroorganismu. Jako pozitivní kontrola bylo do jamek napipetováno 25% DMSO a naředěná kultura mikroorganismu. Vzorky na mikrotitračních destičkách byly změřeny na přístroji ELISA Reader, kdy byla sledována absorbance při vlnové délce 630 nm. Následně byly destičky ponechány v inkubačním boxu po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubace byla opět změřena absorbance při 630 nm. Ze získaných hodnot byla zjištěna antimikrobiální aktivita testovaných látek.

4.5.3.2 Stanovení antimikrobiální aktivity nanovláken

Pro stanovení antimikrobiálních vlastností nanovláken byly používány destičky s 24 jamkami. Do každé jamky byl napipetovaný 1 ml sterilního média a 1 ml naředěné kultury mikroorganismu. Jako kontrola média byly do jamek napipetovány 2 ml sterilního média. Jako kontrola buněk byl do jamek napipetován 1 ml média a 1 ml naředěné kultury mikroorganismu. U mikrotitrační destičky byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm v čase 0. Poté byly do jamek sterilně vložené připravené vzorky nanovláken. Do každé jamky byl přidán čtverec nanovláknů o velikosti 1 cm², který byl předtím zvážený a vysterilovaný pod UV světlem. Připravené mikrotitrační destičky s vlákny byly uloženy do inkubačního boxu s teplotou 37 °C. Po uplynutí 24 hodin byla opět změřena absorbance při 630 nm.

4.5.4 Difuzní metoda

Metoda byla použita ke stanovení minimální inhibiční koncentrace piperinu. Pro stanovení antimikrobiálních vlastností byly vybrány tři mikroorganismy, a to *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* a *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*). Pro provedení testů bylo nejprve nutné mikroorganismy nakultivovat v tekutém médiu.

4.5.4.1 Příprava agarových ploten

Pro přípravu agarových ploten bylo do Erlenmeyerovy baňky odváženo potřebné množství média vybraného pro daný mikroorganismus, stejně jako u tekutého média (Tabulka 1). Následně byl k médiu přidán agar v množství 2 g na 100 ml. Připravený roztok byl poté sterilován. Agarové plotny byly připraveny nalitím sterilního agarového média do sterilních Petriho misek.

4.5.4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Po ztuhnutí agarových ploten byla na každou plotnu pomocí sterilní hokejky rozetřena vhodně naředěná kultura mikroorganismu. Poté bylo do každé agarové plotny uděláno 6 jamek, do kterých byly pipetovány roztoky piperinu a jako kontrola bylo použito 25% DMSO. Roztoky piperinu byly připraveny v koncentracích 10–100 mg/ml. Piperin byl rozpouštěn v 10% DMSO. Petriho misky byly ponechány 24 hodin v inkubačním boxu při teplotě 37 °C.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

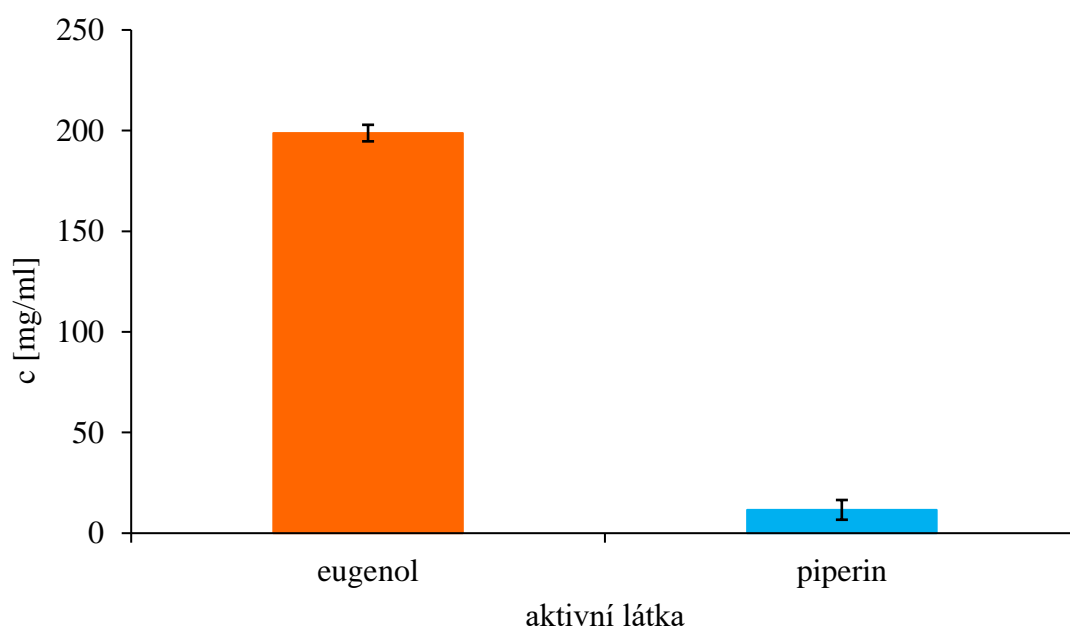
Tato bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci funkcionalizovaných nanovláken a aktivních látek. Nanovlákná byla připravena ze želatiny a polyhydroxybutyrátu (PHB). Připravená nanovlákná byla funkcionalizovaná eugenolem a piperinem. Tyto látky byly vybrány z důvodu jejich antimikrobiálních účinků [65, 79]. U aktivních látek byla stanovena antioxidační aktivita. Eugenol byl charakterizován z hlediska obsahu polyfenolů. U eugenolu i piperinu byla testována antimikrobiální účinnost vůči mikroorganismům *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* a *Cutibacterium acnes*. U připravených nanovláken byla stanovována antimikrobiální účinnost a také bylo sledováno postupné uvolňování aktivních látek s cílem využít tyto materiály v pleťových maskách proti akné.

5.1 Charakterizace aktivních látek

Byly vybrány dvě aktivní látky, a to eugenol a piperin, u kterých byly stanovovány základní charakteristiky. U testovaných látek byla stanovena celková antioxidační aktivita a u eugenolu byl stanoven celkový obsah polyfenolů. Následně byly u látek stanovena absorpční maxima a sestavené jejich kalibrační přímky. Měření probíhalo podle postupů v kapitole 4.2.

5.1.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity

U aktivních látek byla stanovena antioxidační aktivita podle postupu v kapitole 4.2.1. Nejprve byla sestavena kalibrační přímka Troloxu, která měla kalibrační rovnici $y = 0,0019x$. Vzorke byly proměřeny v triplicátech a naměřené hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky jsou uvedeny v grafu (Obrázek 8).



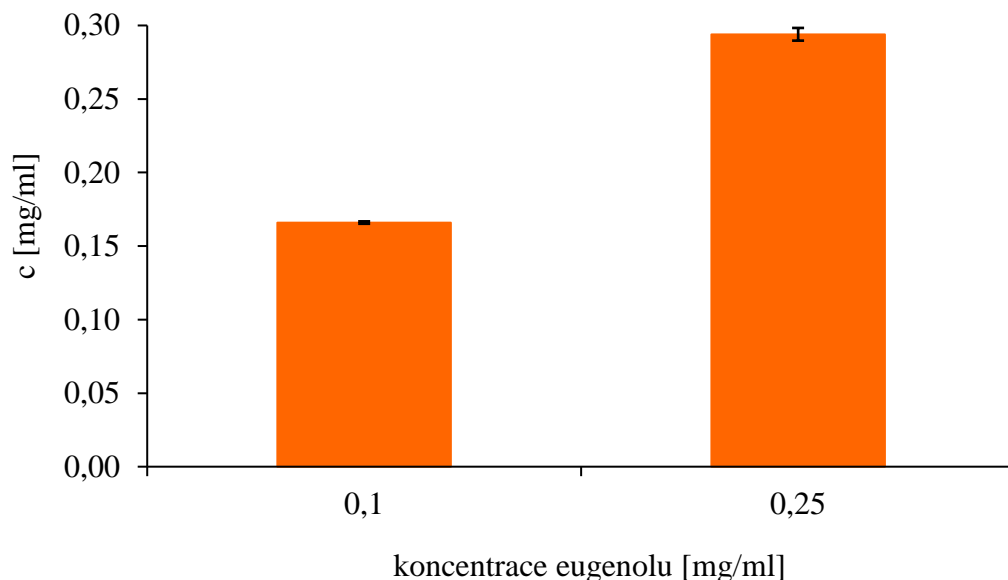
Obrázek 8: Stanovená antioxidační aktivita aktivních látek proti Troloxu

Z grafu je možné vidět, že eugenol vykazoval vyšší antioxidační aktivitu, a to $198,77 \pm 4,11$ mg/ml. Antioxidační aktivita piperinu byla $11,58 \pm 4,90$ mg/ml, což je ve srovnání s eugenolem zanedbatelná hodnota.

Eugenol se tedy jeví jako vhodný antioxidant, naproti tomu piperin nelze úplně řadit mezi antioxidační látky, jelikož je jeho antioxidační aktivita velmi nízká. Přesto je piperinu tato vlastnost v některých publikacích přisuzována [80].

5.1.2 Stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů v eugenolu byl stanoven spektrofotometricky. Kalibrační přímka kyseliny gallové byla sestrojena podle postupu v kapitole 4.2.2. Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace polyfenolů. Vzorke byly proměřeny třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v grafu (Obrázek 9).



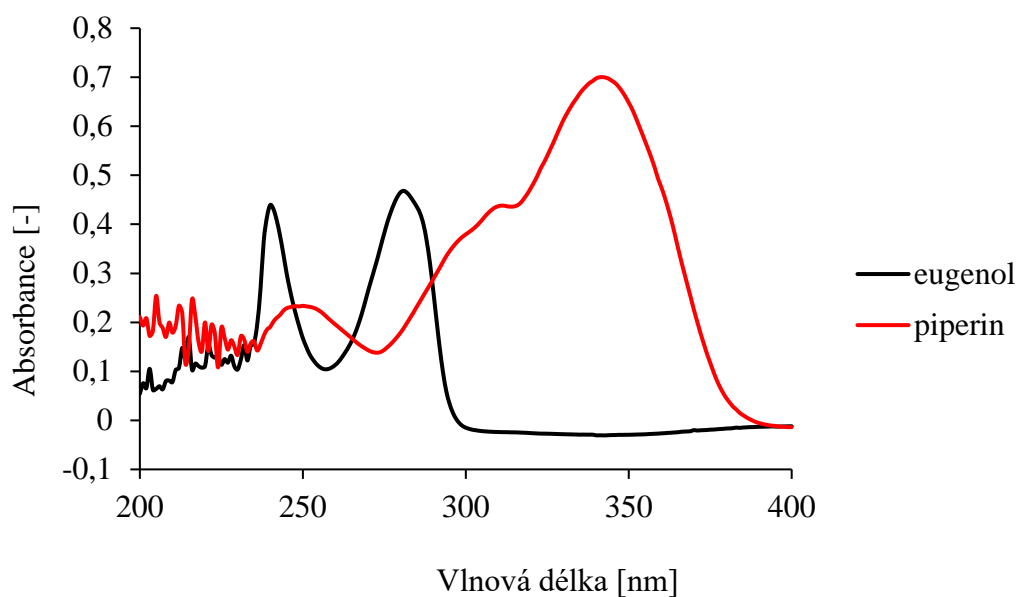
Obrázek 9: Obsah polyfenolů ve vzorcích eugenolu

Z grafu je patrné, že vzorek eugenolu o vyšší koncentraci obsahoval vyšší množství polyfenolů, a to $0,29 \pm 0,82$ mg/ml. Roztok o nižší koncentraci obsahoval $0,17 \pm 0,32$ mg/ml polyfenolů. Polyfenoly jsou výhodné pro lidský organismus, jelikož působí antioxidačně, vasodilatačně nebo také protizánětlivě [81].

5.1.3 Stanovení absorpčních maxim a kalibračních křivek

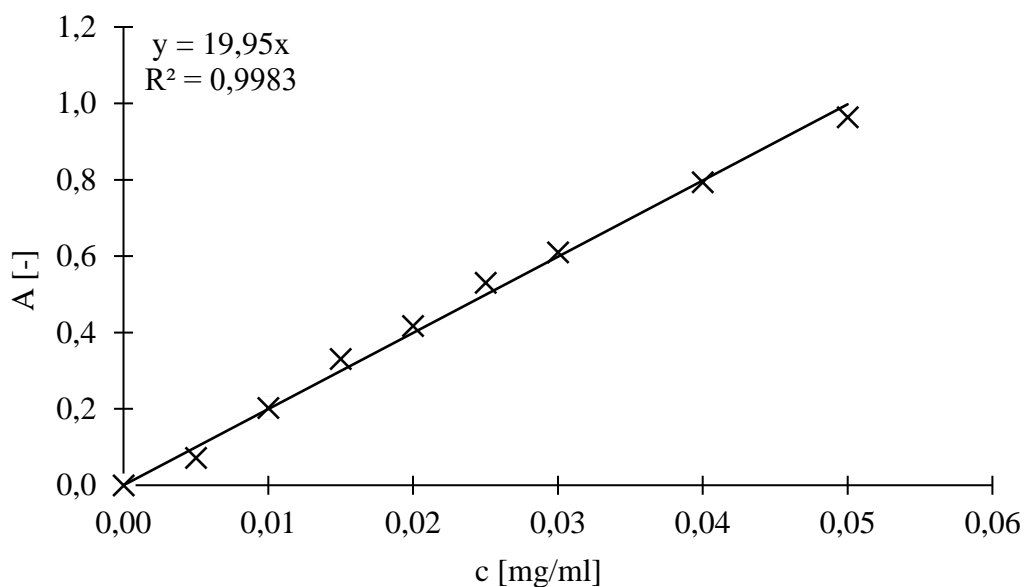
Pro samotnou charakterizaci aktivních látek byla změřena absorpční spektra eugenolu a piperinu ze kterých byla získána jejich absorpční maxima. Měření spekter bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 200–400 nm. Absorpční spektra byla měřena kvůli zjištění absorpčního maxima daných látek, jelikož při těchto vlnových délkách byly měřeny kalibrační křivky a také uvolněné látky pomocí vytřepávání do chloroformu.

Absorpční spektrum eugenolu s absorpčním maximem 282 nm a absorpční spektrum piperinu s absorpčním maximem 342 nm se nachází v grafu (Obrázek 10).

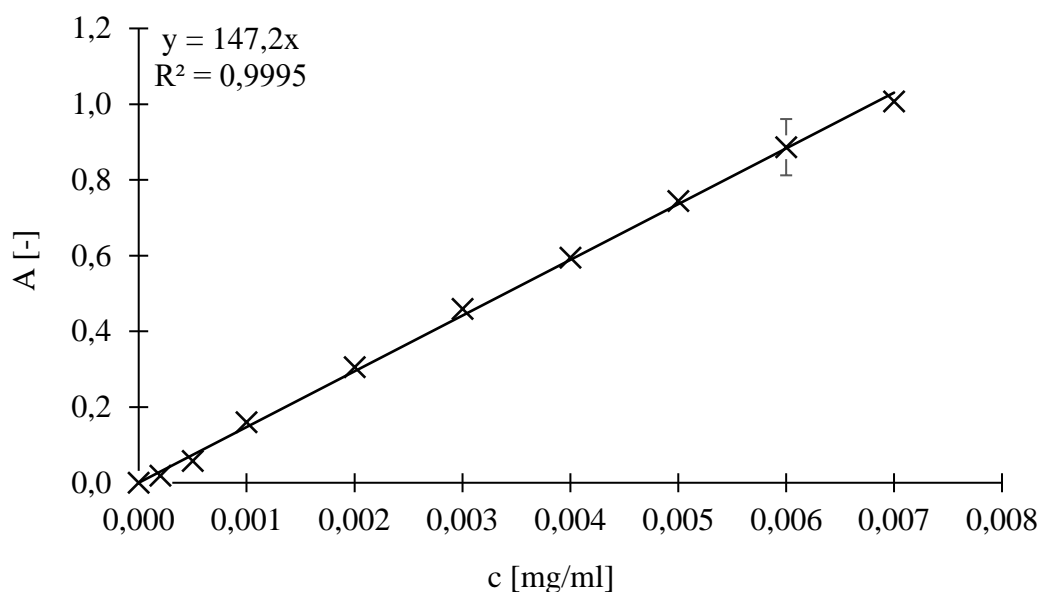


Obrázek 10: Absorpční spektra eugenolu a piperinu

Následně byly sestaveny kalibrační přímky pro jednotlivé látky podle postupu v kapitole 4.2.3. Kalibrační přímky eugenolu (Obrázek 11) a piperinu (Obrázek 12) jsou zobrazeny v následujících grafech.



Obrázek 11: Kalibrační přímka eugenolu



Obrázek 12: Kalibrační přímka piperinu

5.2 Charakterizace nanovláken

Dále byla připravena nanovlákná z PHB a ze želatiny pomocí elektrospinningu. Nanovlákná byla z důvodu optimalizace funkcionalizovaná aktivními látkami, a to výše zmiňovaným eugenolem a piperinem. U nanovláken bylo sledováno uvolňování účinných látek. Měření bylo prováděno ve třech modelových prostředích – ve vodě, ve fyziologickém roztoku a ve fyziologickém roztoku zahřátém na 37 °C. Modelová prostředí byla vybrána podle možné budoucí aplikace v pleťových maskách, jelikož zvolené podmínky mohou nastat při finálním použití.

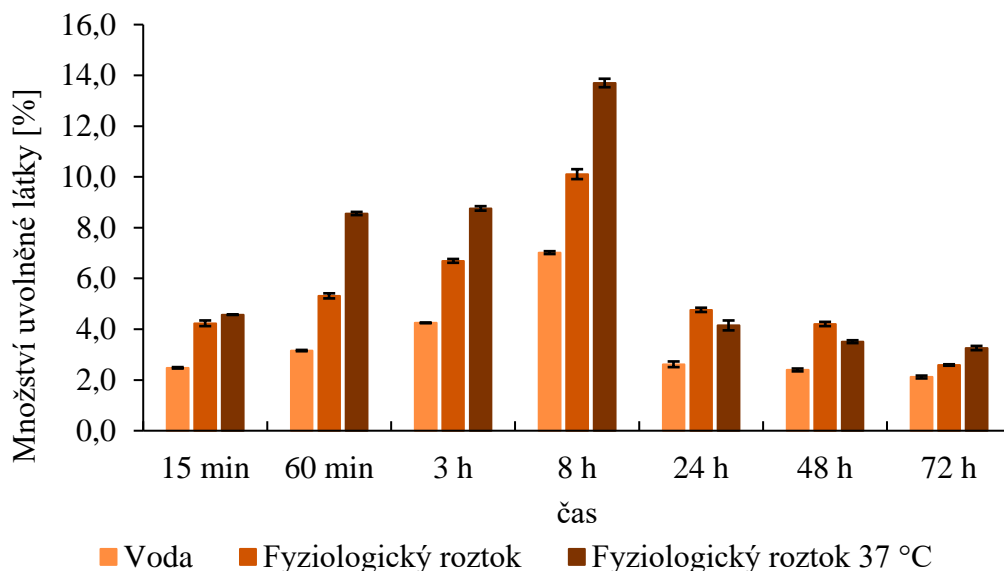
5.2.1 Postupné uvolňování účinných látek z PHB nanovláken

Roztok PHB ke zvláknování byl připraven podle postupu v kapitole 4.3.1 a samotná nanovlákná byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.3. Vlákna byla funkcionalizována eugenolem a piperinem. Připravená vlákna byla následně použita ke sledování postupného uvolňování aktivních látek, měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.4.1. Uvolněná látka byla vytřepána do chloroformu, následně byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima dané látky a bylo vypočteno množství uvolněné látky. U nanovláken s obsahem eugenolu byl kromě chloroformové metody měřen obsah uvolněných polyfenolů podle postupu v kapitole 4.2.2.

5.2.1.1 Postupné uvolňování eugenolu

Nanovlákná byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.3 se čtyřmi koncentracemi eugenolu, a to jako 1%, 2%, 5% a 10%. Dané koncentrace byly vybrány z důvodu zvolení nejvhodnější koncentrace, kdy se uvolní nejvyšší množství aktivní látky. Vyšší koncentrace nebyly zvoleny, protože eugenol ve vyšších koncentracích by mohl mít nežádoucí vliv na pokožku, což je u budoucího použití do pleťových masek nežádoucí [65]. Tyto koncentrace byly vybrány z důvodu optimalizace funkcionalizovaných masek. Byla sledována nejvhodnější koncentrace, která by byla nejlepší z hlediska uvolňování. Měření bylo prováděno v triplicátech.

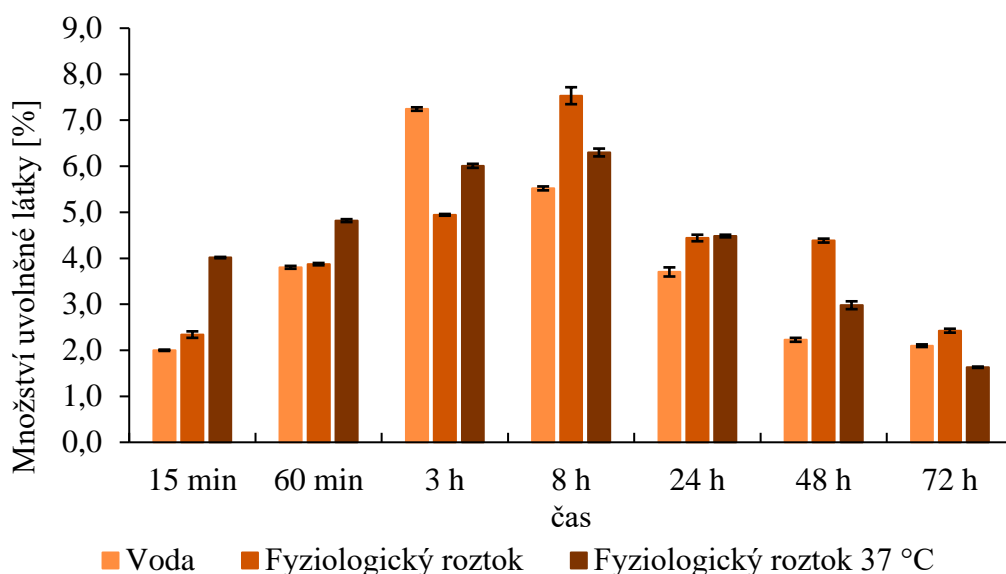
Na následujících grafech (Obrázek 13, Obrázek 14, Obrázek 15 a Obrázek 16) jsou zpracována množství uvolněného eugenolu ve třech modelových prostředích – ve vodě, ve fyziologickém roztoku a ve fyziologickém roztoku o teplotě 37 °C. Modelová prostředí byla vybrána podle možné budoucí aplikace v pleťových maskách, jelikož zvolené podmínky mohou nastat při finálním použití.



Obrázek 13: Uvolňování 1% eugenolu z PHB vláken

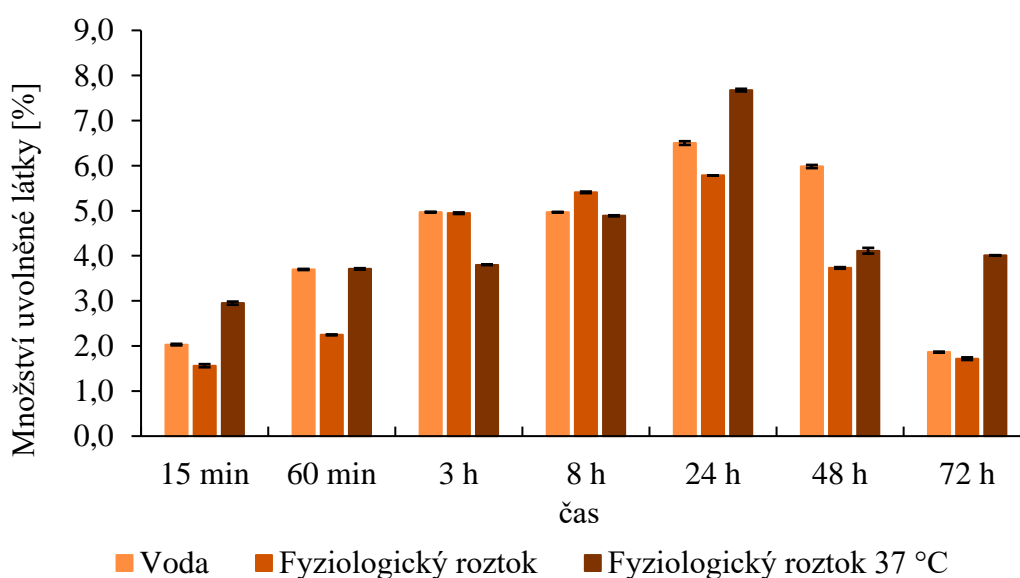
Z grafu (Obrázek 13) je možné pozorovat, že uvolněné množství z PHB vláken s enkapsulovaným eugenolem o koncentraci 1 % se s časem zvyšovalo a po dosažení maxima prudce kleslo. Nárůst a poté prudký pokles mohly být způsobeny tepelnou nebo světelnou degradací aktivní látky [82]. Popřípadě se mohlo nárazově uvolnit malé množství látky, které potom klesalo.

Nejvyšší množství eugenolu se ve všech třech prostředích uvolnilo v čase 8 hodin a poté uvolněné množství prudce kleslo. Nejvíce eugenolu se uvolnilo v prostředí zahřátého fyziologického roztoku, a to $13,70 \pm 0,17$ %. Vyšší teplota mohla mít vliv na rychlost rozpadu a degradaci vláken a tím pádem se mohla látka rychleji uvolnit [83].



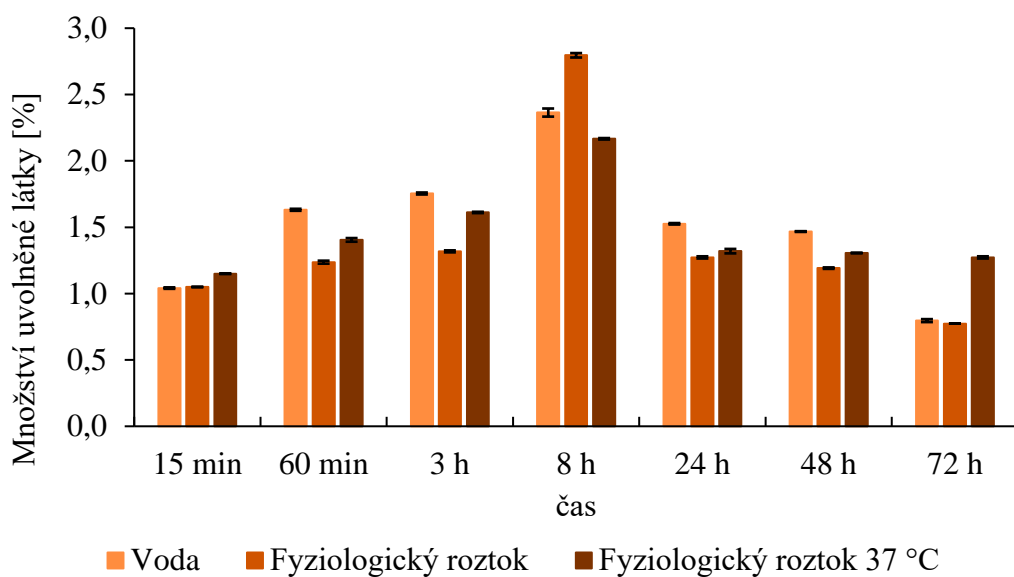
Obrázek 14: Uvolňování 2% eugenolu z PHB vláken

Graf (Obrázek 14) zobrazuje uvolňování z PHB vláken s enkapsulovaným eugenolem o koncentraci 2 %. Z grafu lze určit, že uvolněné množství eugenolu se s časem zvyšuje. Celkově nejvyšší množství eugenolu se uvolnilo po 8 hodinách v zahřátém fyziologickém roztoku, hodnota činila $7,53 \pm 0,18$ %. Lze předpokládat, že nejvyšší množství se uvolnilo v zahřátém fyziologickém roztoku kvůli možné tepelné degradaci PHB vláken [83].



Obrázek 15: Uvolňování 5% eugenolu z PHB vláken

Graf (Obrázek 15) zobrazuje postupné uvolňování z PHB vláken, ve kterých byl enkapsulován eugenol o koncentraci 5 %. V grafu je možné pozorovat, že eugenol se uvolňoval postupně, kdy se nejvyšší množství uvolnilo v zahřátém fyziologickém roztoku v čase 24 hodin. Toto množství bylo $7,67 \pm 0,04$ %. Je možné usoudit, že nejvyšší množství se uvolnilo v zahřátém fyziologickém roztoku kvůli možné tepelné degradaci samotných nanovláken [83].



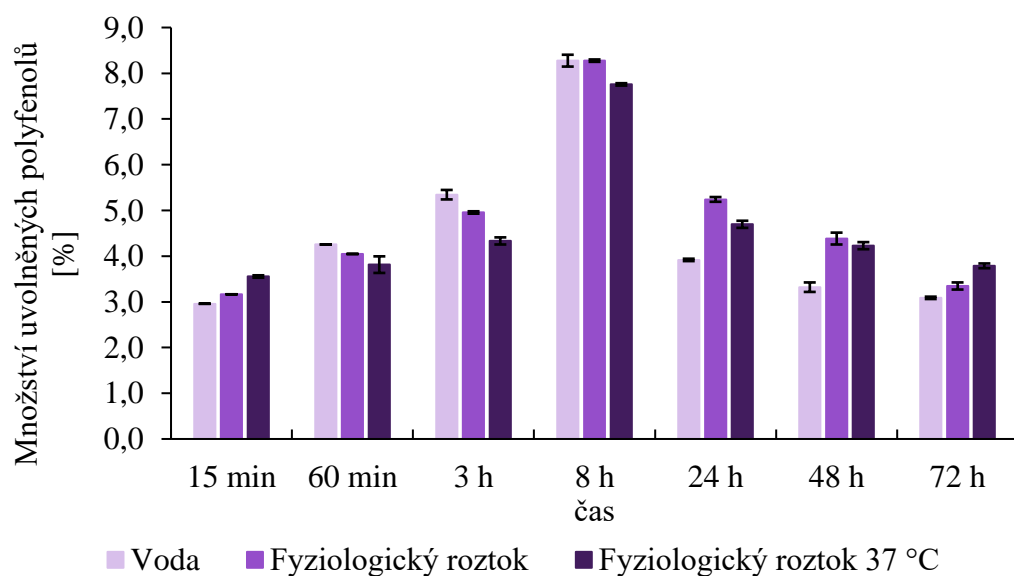
Obrázek 16: Uvolňování 10% eugenolu z PHB vláken

Z grafu (Obrázek 16) je možné vidět, že z PHB vláken s enkapsulovaným eugenolem o koncentraci 10 % se uvolnilo nejmenší množství v poměru k celkové hmotnosti ze všech měřených koncentrací. Nejvyšší množství se uvolnilo ve fyziologickém roztoku v čase 8 hodin, a to $2,80 \pm 0,02$ %.

5.2.1.2 Postupné uvolňování polyfenolů z eugenolu

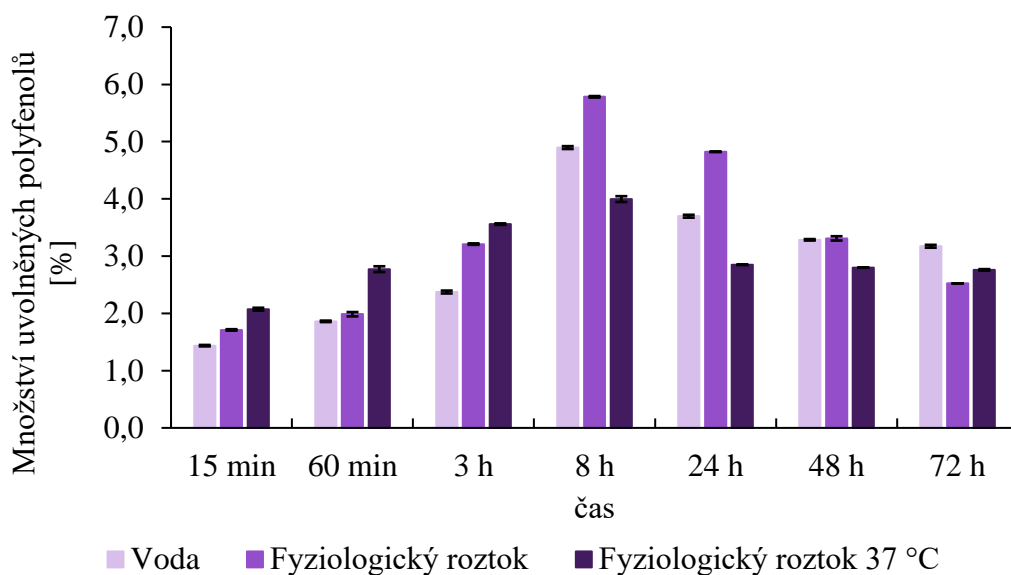
Roztok PHB použitý ke zvláknění byl připraven podle postupu v kapitole 4.3.1. Nanovláknina byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.3. Připravená vlákna byla použita ke sledování postupného uvolňování polyfenolů z eugenolu, měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.4.

U nanovláken s eugenolem bylo stanoveno uvolněné množství polyfenolů z PHB vláken, měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.4. Stanovené hodnoty jsou zobrazeny v následujících grafech (Obrázek 17, Obrázek 18, Obrázek 19 a Obrázek 20).



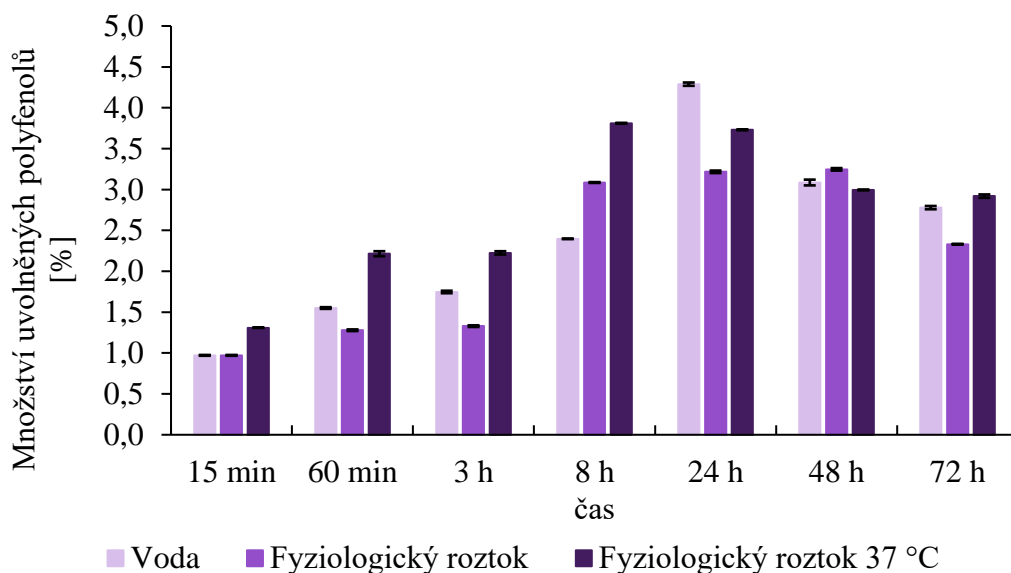
Obrázek 17: Uvolňování polyfenolů u 1% eugenolu z PHB vláken

Na grafu (Obrázek 17) je možné vidět, že se nejvyšší množství polyfenolů z PHB vláken s enkapsulovaným eugenolem o koncentraci 1 % uvolnilo v čase 8 hodin ve vodě i ve fyziologickém roztoku. Toto množství bylo ve vodě $8,28 \pm 0,13$ % a ve fyziologickém roztoku činilo $8,28 \pm 0,01$ %.



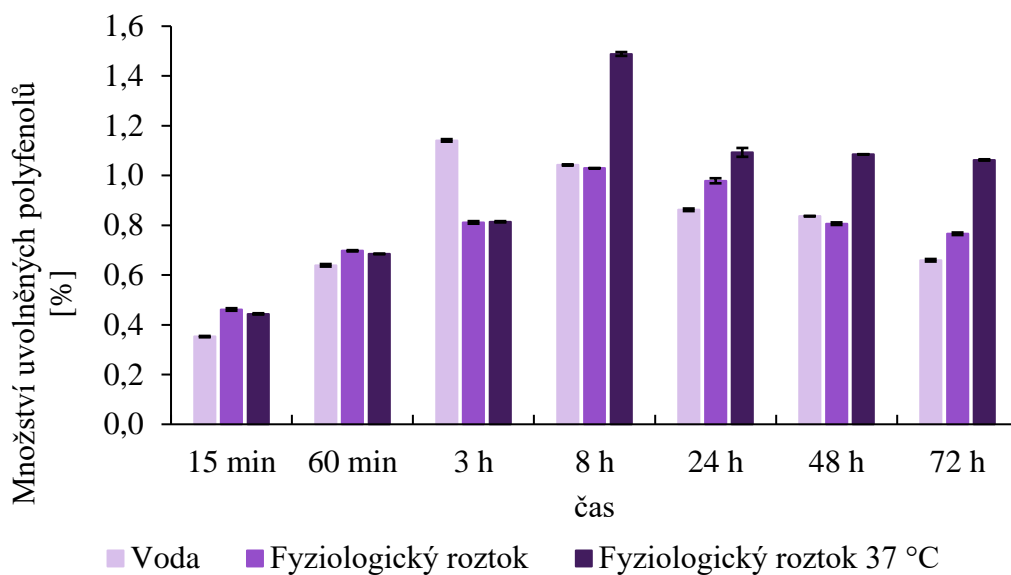
Obrázek 18: Uvolňování polyfenolů u 2% eugenolu z PHB vláken

Z grafu (Obrázek 18) je možné vidět, že nejvyšší množství polyfenolů z 2% eugenolu z PHB vláken se uvolnilo ve fyziologickém roztoku v čase 8 hodin, a to $5,78 \pm 0,01$ %. Lze vidět, že množství polyfenolů se postupně zvyšovalo do dosažení maxima a poté pomalu klesalo. Mohlo se nárazově uvolnit malé množství látky, které se poté snižovalo.



Obrázek 19: Uvolňování polyfenolů u 5% eugenolu z PHB vláken

U grafu (Obrázek 19) lze pozorovat, že nejvyšší uvolněné množství polyfenolů z 5% eugenolu z PHB vláken bylo ve vodě v čase 24 hodin, a to $4,29 \pm 0,02$ %. Množství polyfenolů s časem postupně stoupalo, po dosažení maxima klesalo mírně.



Obrázek 20: Uvolňování polyfenolů u 10% eugenolu z PHB vláken

U grafu (Obrázek 20) lze pozorovat, že nejvyšší uvolněné množství polyfenolů bylo v zahřátém fyziologickém roztoku v čase 8 hodin, a to $1,49 \pm 0,01$ %.

Z naměřených hodnot lze usoudit, že při vytřepávání do chloroformu i u stanovení polyfenolů se jako nejlepší zdá eugenol o koncentraci 1 % enkapsulovaný v PHB vláknech. Toto zjištění je vhodné i pro možné budoucí aplikace do pleťových masek, jelikož je u nižší koncentrace eugenolu menší pravděpodobnost nežádoucích účinků eugenolu [65].

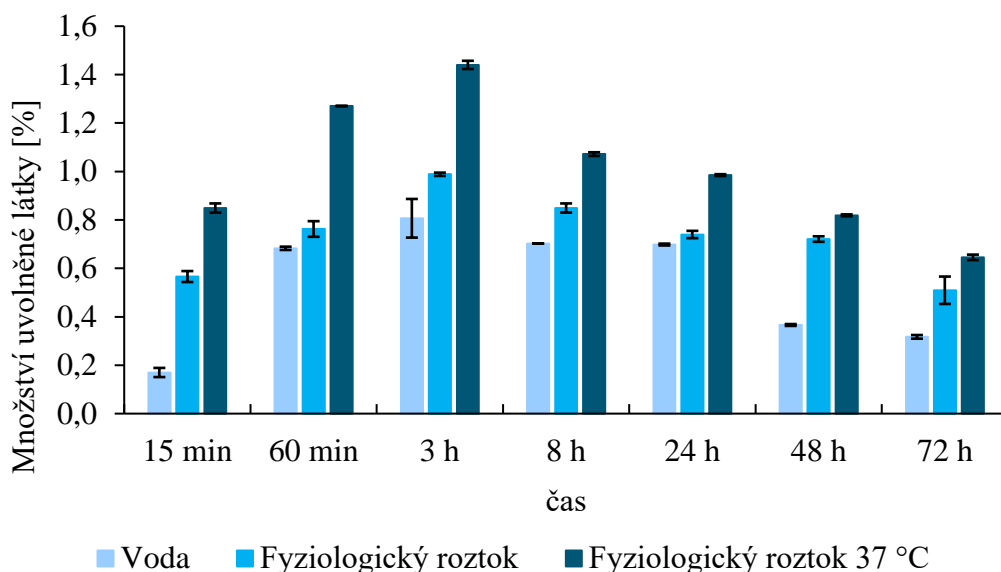
Měření bylo prováděno dvěma metodami, z naměřených hodnot jsou vidět odlišné výsledky. Metody se liší v tom, že u polyfenolů bylo odebráno vlákno a část modelového prostředí, která byla následně měřena. Zatímco u chloroformové metody bylo pracováno s celým objemem modelového prostředí. Jelikož je eugenol hydrofobní, tak mohlo dojít k zachycení na stěnách a při odebrání vzorku u polyfenolů nedošlo k odebrání veškerého uvolněného množství.

5.2.1.3 Postupné uvolňování piperinu

Roztok PHB použitý ke zvláknování byl připraven podle postupu v kapitole 4.3.1. Nanovlákna byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.3. Měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.4. Měření bylo prováděno v triplicátech.

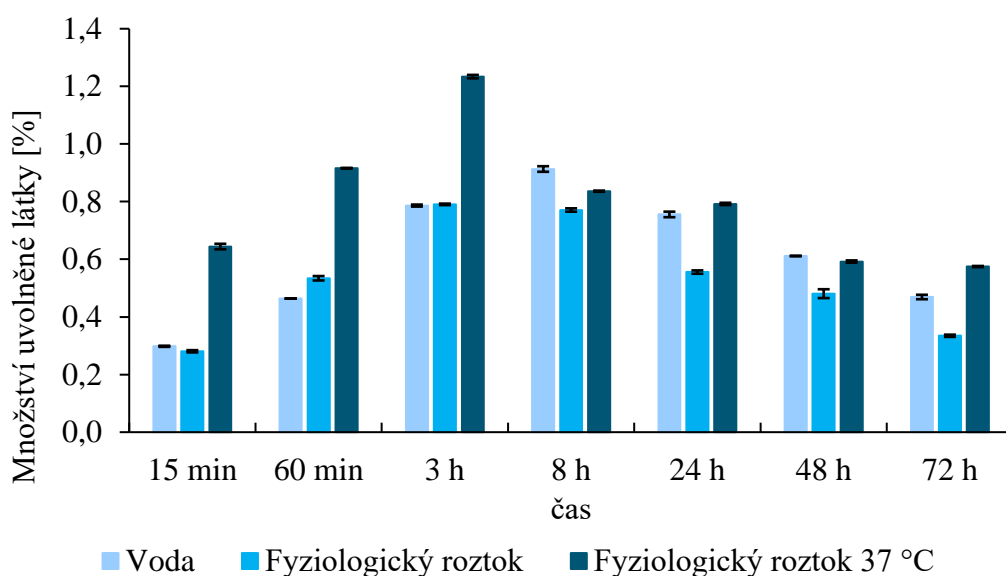
Nanovlákna byla připravena ve čtyřech koncentracích piperinu, a to jako 1%, 2%, 5% a 10%. Dané koncentrace byly vybrány z důvodu zvolení nejvhodnější koncentrace, kdy se uvolní nejvyšší množství aktivní látky. Vyšší koncentrace piperinu nebyly zvoleny z důvodu jeho špatné rozpustnosti, i přestože některé články uvádí vyšší koncentrace, které se rozpustí i ve vodném prostředí [84]. U postupného uvolňování piperinu bylo měřeno pouze vytřepávání do chloroformu, jelikož je piperin alkaloid a tím pádem by nebylo možné stanovit obsah polyfenolů [85].

Na následujících grafech (Obrázek 21, Obrázek 22, Obrázek 23 a Obrázek 24) jsou zpracována množství uvolněného piperinu ve třech modelových prostředích – ve vodě, ve fyziologickém roztoku a ve fyziologickém roztoku o teplotě 37 °C. Modelová prostředí byla vybrána podle možné budoucí aplikace v pleťových maskách, jelikož zvolené podmínky mohou nastat při finálním použití.



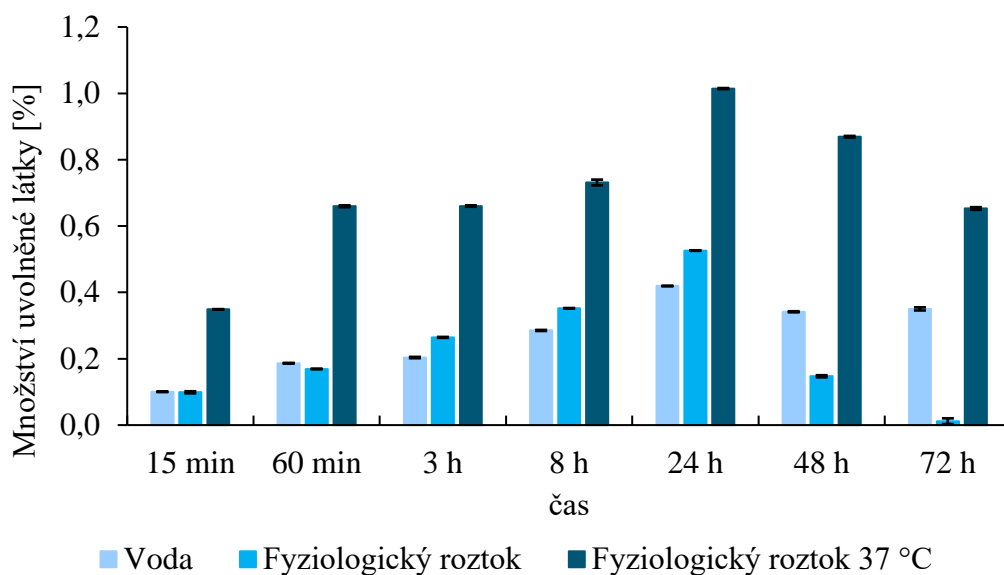
Obrázek 21: Uvolňování 1% piperinu z PHB vláken

V grafu (Obrázek 21) je možné vidět uvolněné množství piperinu. Nejvyšší množství se uvolnilo v zahřátém fyziologickém roztoku v čase 3 hodiny. Toto množství činilo $1,44 \pm 0,02$ %. Piperinu se uvolnilo nízké množství, jelikož se jedná o stabilní látku. Nejvyšší uvolněné množství piperinu bylo pozorováno při vyšší teplotě, jelikož dochází k možné tepelné degradaci vlákna a tím pádem k uvolnění látky [83].



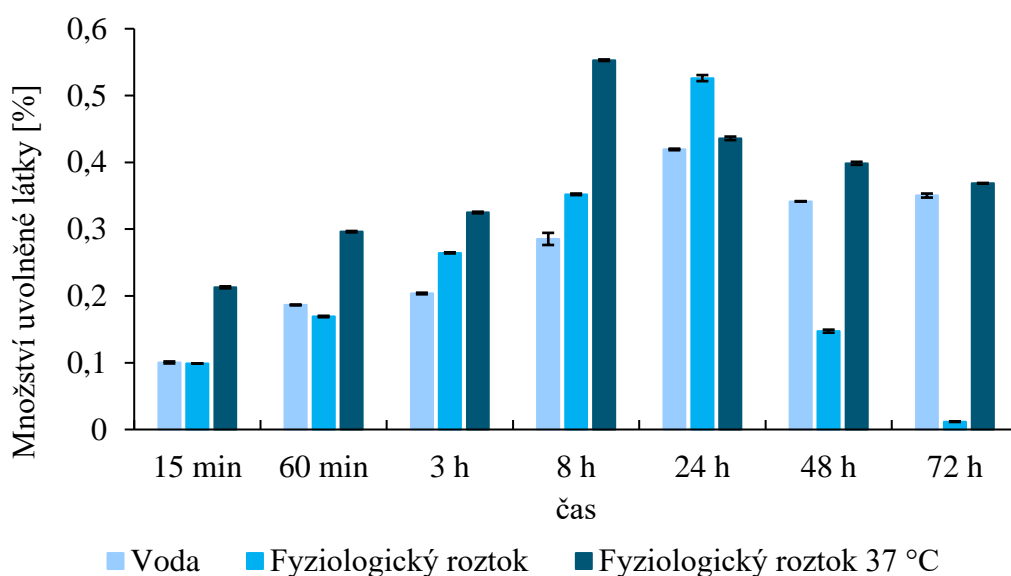
Obrázek 22: Uvolňování 2% piperinu z PHB vláken

Z grafu (Obrázek 22) lze vidět, že nejvyšší množství piperinu se uvolnilo v čase 3 hodiny v zahřátém fyziologickém roztoku. Toto množství bylo $1,23 \pm 0,01$ %. Jako v předchozím případě, lze vidět nízké uvolněné množství piperinu. Nárazově se uvolnilo malé množství z vláken, která postupně vlivem podmínek degradovala a k dalšímu uvolnění již nedocházelo [83].



Obrázek 23: Uvolňování 5% piperinu z PHB vláken

Na grafu (Obrázek 23) je možné vidět, že ve nejvyšší množství piperinu se uvolnilo v čase 24 hodin v zahřátém fyziologickém roztoku. Toto množství bylo $1,01 \pm 0,00$ %. Z naměřených hodnot je možné vidět, že se uvolnilo piperinu nízké množství. Mohlo to být způsobeno nárazovým uvolněním malého množství látky z nanovláken, které mohly vlivem podmínek degradovat a vyšší množství se už neuvolnilo [83].



Obrázek 24: Uvolňování 10% piperinu z PHB vláken

V grafu (Obrázek 24) je možné vidět, že nejvyšší množství piperinu se uvolnilo v čase 8 hodin v zahřátém fyziologickém roztoku. Množství piperinu činilo $0,55 \pm 0,00$ %.

Při postupném uvolňování piperinu z PHB vláken nebylo dosaženo vysokých hodnot. Z těchto výsledků lze říci, že nejlépe se jeví vlákna enkapsulovaná piperinem o koncentraci 1 %. Ale tato forma piperinu není v této podobě nejvhodnější variantou při budoucím použití do pletěových masek. Je možné využití jiného izomeru piperinu, například chavicinu, který by teoreticky mohl mít pozitivnější výsledky [86].

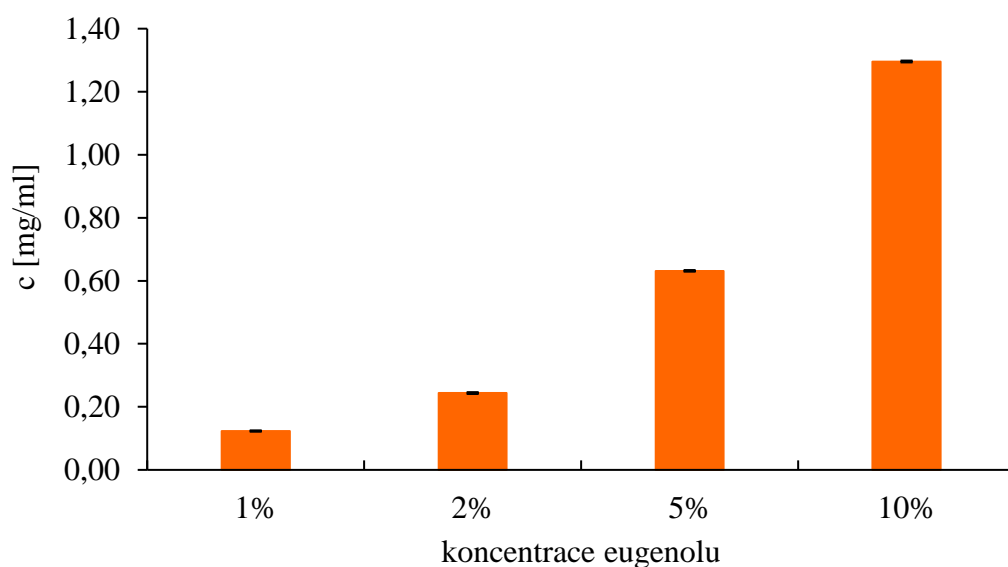
Testovaný izomer piperinu byl vybrán kvůli dobrým synergickým účinkům s jinými aktivními látkami, jak uvádí některé publikace [87].

5.2.2 Postupné uvolňování účinných látek ze želatinových nanovláken

Roztok želatiny ke zvláknování byl připraven podle postupu v kapitole 4.3.2 a samotná nanovlákna byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.4. Vlákna byla funkcionalizována eugenolem a piperinem. Připravená vlákna byla následně použita ke sledování uvolněného množství aktivních látek, měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.4.2. Uvolněná látka byla vytřepána do chloroformu, následně byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima dané látky a bylo vypočteno množství uvolněné látky. U nanovláken s obsahem eugenolu byl měřen obsah uvolněných polyfenolů podle postupu v kapitole 4.2.2.

5.2.2.1 Postupné uvolňování eugenolu

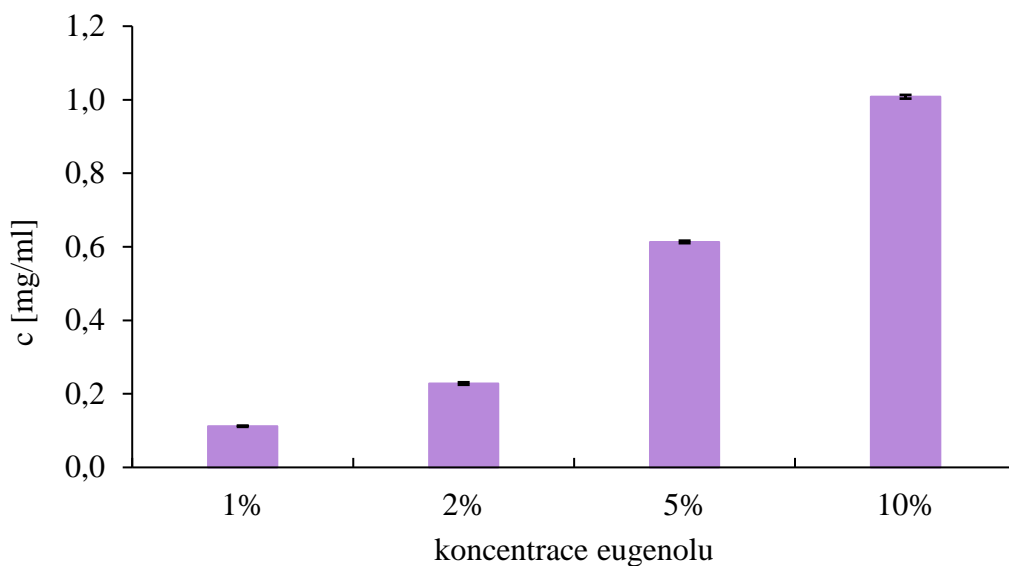
Nanovlákna byla připravena se čtyřmi koncentracemi eugenolu, a to jako 1%, 2%, 5% a 10%. Dané koncentrace byly vybrány z důvodu zvolení nejvhodnější koncentrace, kdy se uvolní nejvyšší množství aktivní látky. Vyšší koncentrace nebyly zvoleny, protože eugenol by mohl mít ve vyšších koncentracích nepříznivý vliv na pokožku, což je u budoucího použití do pleťových masek nežádoucí [65]. Na následujícím grafu (Obrázek 25) jsou zpracována množství uvolněného eugenolu. Želatinová vlákna byla měřena pouze ve vodném prostředí, ihned po rozpuštění želatinového čtverečku. Želatinová vlákna byla měřena pouze v jednom prostředí, jelikož bylo potřeba určit množství aktivních látek obsažené ve vláknech. Měření bylo prováděno kvůli stanovení enkapsulační účinnosti.



Obrázek 25: Uvolněné množství eugenolu ze želatinových vláken

Z grafu (Obrázek 25) lze pozorovat, že největší množství bylo podle předpokladu obsaženo ve vláknech s obsahem eugenolu o koncentraci 10 %. Nejvyšší enkapsulované množství činilo $1,296 \pm 0,001$ mg/ml.

U nanovláken s eugenolem bylo kromě vytřepávání do chloroformu také stanoveno uvolněné množství polyfenolů, hodnoty jsou zobrazeny v následujícím grafu (Obrázek 26).



Obrázek 26: Uvolněné množství polyfenolů u eugenolu ze želatinových vláken

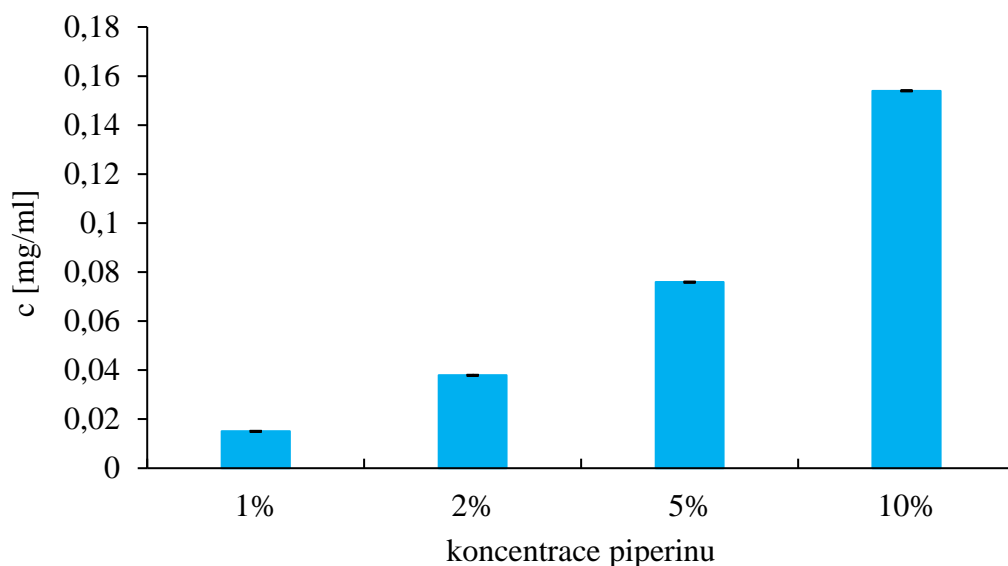
Z grafu (Obrázek 26) lze pozorovat, že nejvyšší množství polyfenolů v želatinových nanovláčkách bylo enkapsulováno u vláken s obsahem eugenolu o koncentraci 10 %, a to $1,008 \pm 0,005$ mg/ml.

Stanovené hodnoty u vytřepávání do chloroformu i u stanovení polyfenolů jsou srovnatelné. Z obou hodnot bylo zjištěno, že nejvyšší enkapsulované množství se nachází v želatinových nanovláčkách připravených s obsahem eugenolu o koncentraci 10 %.

U chloroformové metody bylo pracováno s celým objemem modelového prostředí. Jelikož je eugenol hydrofobní, tak mohlo dojít k zachycení na stěnách a při odebrání vzorku u polyfenolů nedošlo k odebrání veškerého uvolněného množství.

5.2.2.2 Postupné uvolňování piperinu

Nanovláčka byla připravena se čtyřmi koncentracemi piperinu, a to jako 1%, 2%, 5% a 10%. Dané koncentrace byly vybrány z důvodu zvolení nejvhodnější koncentrace, kdy se uvolní nejvyšší množství aktivní látky. Na následujícím grafu (Obrázek 27) jsou zpracována množství uvolněného piperinu. Želatinová vlákna byla měřena pouze ve vodném prostředí, ihned po rozpuštění želatinového čtverečku. Želatinová vlákna se rozpustila přibližně 10 sekund po převedení do vodného roztoku. Želatinové řetězce mají po stranách připojené atomy vodíku, které se mohou slabě vázat s vodou, což způsobuje její dobrou rozpustnost ve vodě [88]. Želatinová vlákna byla měřena pouze v jednom prostředí, jelikož bylo potřeba určit enkapsulované množství aktivní látky ve vláčkách.



Obrázek 27: Uvolněné množství piperinu ze želatinových vláken

U grafu (Obrázek 27) je možné pozorovat uvolněné množství piperinu ze želatinových vláken. Kdy nejvyšší enkapsulovaná hodnota byla naměřena u želatinových nanovláken s obsahem piperinu o koncentraci 10 %. Nejvyšší hodnota činila 0,154 mg/ml.

5.3 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita byla měřena u čistého eugenolu a piperinu a také u nanovláken s enkapsulovanými aktivními látkami. Antimikrobiální aktivita byla stanovena pomocí bujónové diluční metody podle postupu v kapitole 4.5.3.1. Měření probíhalo na přístroji ELISA Reader BioTek při vlnové délce 630 nm. Měření byla prováděna ve 3 opakováních. Hodnoty antimikrobiální aktivity byly vyjádřeny v procentech. Hodnota 100 % popisuje, že nebyl inhibován žádný mikroorganismus a naopak 0 % popisuje inhibované všechny buňky mikroorganismů.

5.3.1 Eugenol a piperin

Látky byly rozpuštěny v 10% dimethylsulfoxidu, který byl použit jako kontrola prostředí, jelikož 10% koncentrace DMSO nemá inhibiční vliv na mikroorganismy. DMSO byl zvolen, protože je vhodným rozpouštědlem pro dané aktivní látky, převážně pro lépe rozpustný eugenol.

Piperin byl zvolen z důvodu předpokládaných antimikrobiálních účinků a možné synergie s jinými aktivními látkami [89]. U nejvyšších koncentrací piperinu nebylo možné stanovit antimikrobiální aktivitu kvůli jeho špatné rozpustnosti [65]. Antimikrobiální aktivita piperinu byla stanovována pomocí difuzních testů, kdy byly testovány koncentrace 10 až 100 mg/ml.

Hodnoty antimikrobiální aktivity eugenolu jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Výsledky bujónové diluční metody pro eugenol

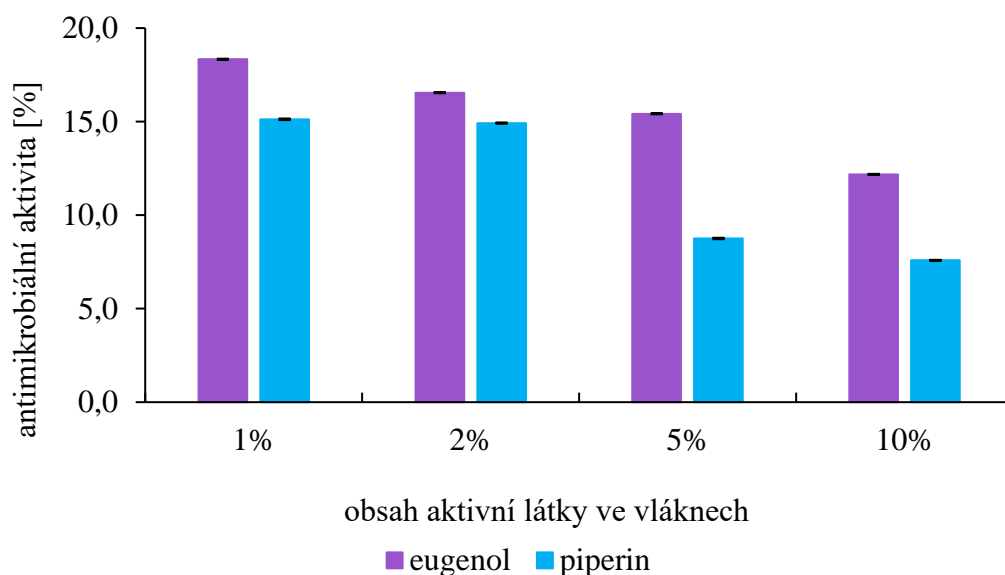
Koncentrace eugenolu [mg/ml]	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. acnes</i>
	Viabilita [%]		
8,000	6,712 ± 0,006	6,218 ± 0,007	0,000 ± 0,078
4,000	14,672 ± 0,058	12,937 ± 0,056	7,629 ± 0,023
2,000	51,457 ± 0,070	34,016 ± 0,259	10,663 ± 0,026
1,000	57,336 ± 0,145	66,416 ± 0,314	19,734 ± 0,073
0,500	71,436 ± 0,356	82,253 ± 0,163	41,271 ± 0,037
0,250	83,247 ± 0,390	88,722 ± 0,096	58,151 ± 0,050
0,125	88,189 ± 0,373	91,426 ± 0,088	77,825 ± 0,069
0,063	97,034 ± 0,407	91,593 ± 0,059	80,078 ± 0,075
0,031	100,000 ± 4,631	93,852 ± 0,014	83,232 ± 0,064
0,016	100,000 ± 9,053	97,272 ± 0,086	83,743 ± 0,020

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) eugenolu byla vypracována výše uvedená tabulka (Tabulka 2). Z tabulky je patrné, že MIC eugenolu u mikroorganismu *S. epidermidis* byla stanovena na koncentraci 2,000 mg/ml. U *E. coli* byla MIC eugenolu určena na 2,000 mg/ml a u *C. acnes* hodnota MIC eugenolu činila 0,500 mg/ml.

5.3.2 Stanovení antimikrobiální aktivity nanovláken z PHB

Ke stanovení antimikrobiální aktivity funkcionalizovaných nanovláken z PHB byla vlákna připravena podle postupu v kapitole 4.3.3 a samotné měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.5.3.2.

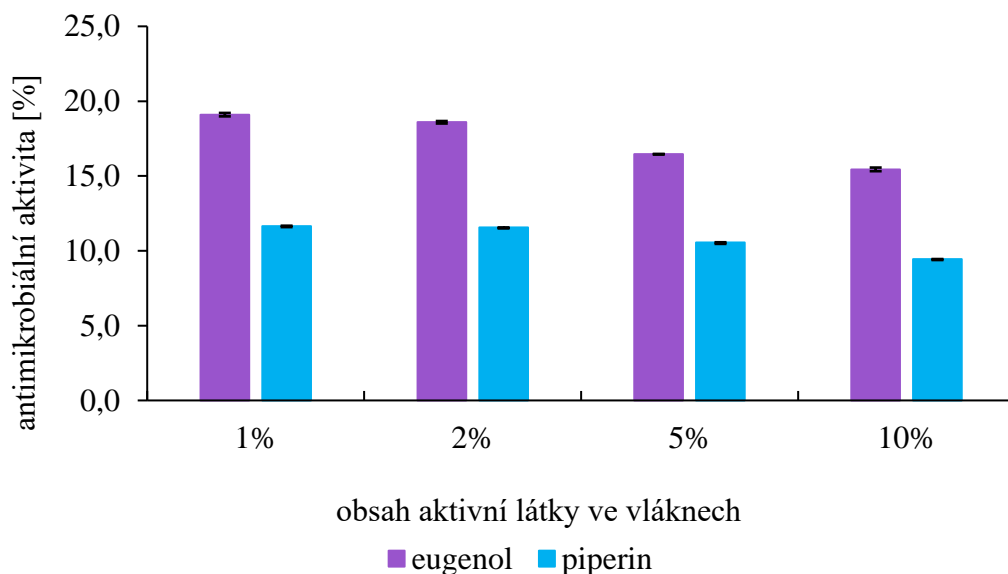
Hodnoty antimikrobiální aktivity PHB vláken s eugenolem a piperinem jsou shrnuty v následujících grafech (Obrázek 28, Obrázek 29, Obrázek 30).



Obrázek 28: Antimikrobiální aktivita účinných látek v PHB vláknech u *S. epidermidis*

Z grafu (Obrázek 28) lze vidět, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala nanovlákná z PHB funkcionalizovaná eugenolem o koncentraci 1%, jelikož se v tomto případě uvolnilo nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.1.1. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *S. epidermidis* v tomto případě byla $18,337 \pm 0,004$ %.

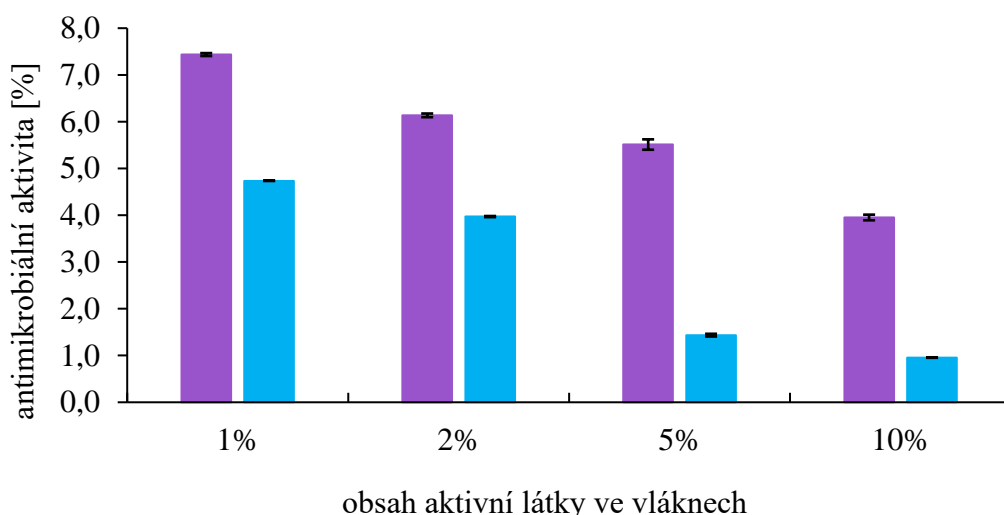
Antimikrobiální aktivita piperinu v PHB vláknech byla nejvyšší u vláken s obsahem piperinu v koncentraci 1 %. Hodnota antimikrobiální aktivity je srovnatelná s antimikrobiální aktivitou vláken s enkapsulovaným eugenolem. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $15,124 \pm 0,025$ %. Hodnoty mohly být ovlivněny i mikroorganismy, které ulpěly na PHB vláknech, která byla vytažena, aby bylo možné změřit absorbanci po 24 hodinách.



Obrázek 29: Antimikrobiální aktivita účinných látek v PHB vláknech u *E. coli*

Z grafu (Obrázek 29) lze určit, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala nanovlákná z PHB funkcionalizovaná eugenolem o koncentraci 1 %, jelikož se v tomto případě uvolnilo nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.1.1. Stejně jako v předchozím případě, lze pozorovat, že se zvyšující se koncentrací klesá antimikrobiální aktivita. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *E. coli* v tomto případě byla $19,100 \pm 0,114$ %.

Antimikrobiální aktivita piperinu v PHB vláknech byla nejvyšší u vláken s obsahem piperinu o koncentraci 1 %, jelikož se uvolnilo nejvyšší množství účinné látky, stejně jako v předchozím případě. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $11,651 \pm 0,066$ %. Ovlivnit hodnoty mohl i úbytek mikroorganismů, který ulpěl na PHB vláknech, která byla vytažena při měření ve 24 hodinách.



Obrázek 30: Antimikrobiální aktivita účinných látek v PHB vláknech u *C. acnes*

Z grafu (Obrázek 30) lze vidět, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala nanovlákná z PHB funkcionalizovaná eugenolem o koncentraci 1 %, jelikož se v tomto případě uvolnilo nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.1.1. Stejně jako v předchozím případě, lze pozorovat, že se zvyšující se koncentrací klesá antimikrobiální aktivita. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *C. acnes* v tomto případě byla $7,436 \pm 0,031$ %.

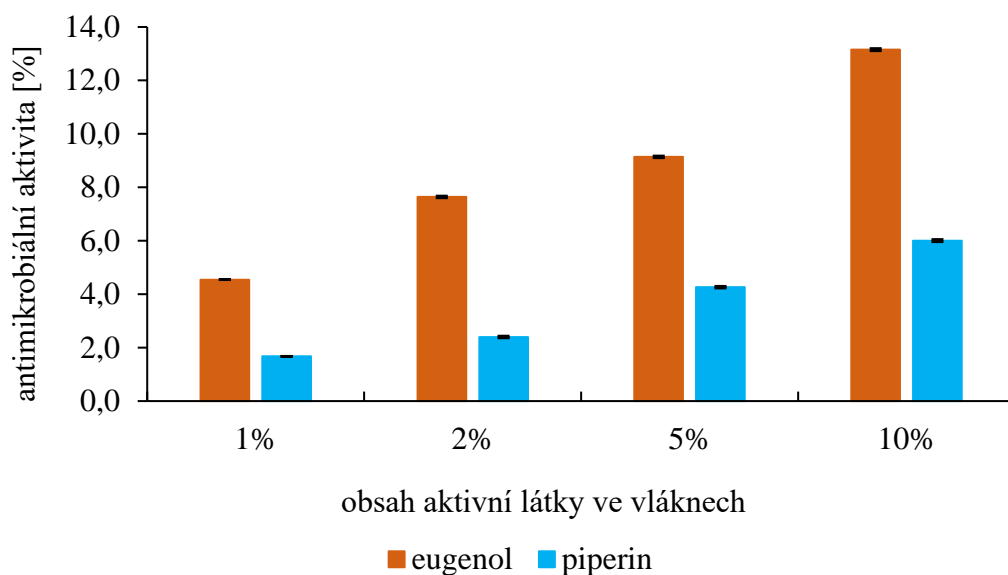
Antimikrobiální aktivita piperinu v PHB vláknech byla nejvyšší u vláken s obsahem piperinu o koncentraci 1 %, jelikož se uvolnilo nejvyšší množství účinné látky, stejně jako v předchozím případě. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $4,737 \pm 0,004$ %.

Ze stanovených hodnot lze říci, že PHB vlákna funkcionalizovaná aktivními látkami jsou nejúčinnější s obsahem aktivní látky o koncentraci 1 %. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla stanovena u *E. coli* a nejnižší hodnotu vykazovala PHB vlákna u mikroorganismu *C. acnes*.

5.3.3 Stanovení antimikrobiální aktivity želatinových nanovláken

Ke stanovení antimikrobiální aktivity funkcionalizovaných želatinových nanovláken byla vlákna připravena podle postupu v kapitole 4.3.4 a samotné měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.5.3.2.

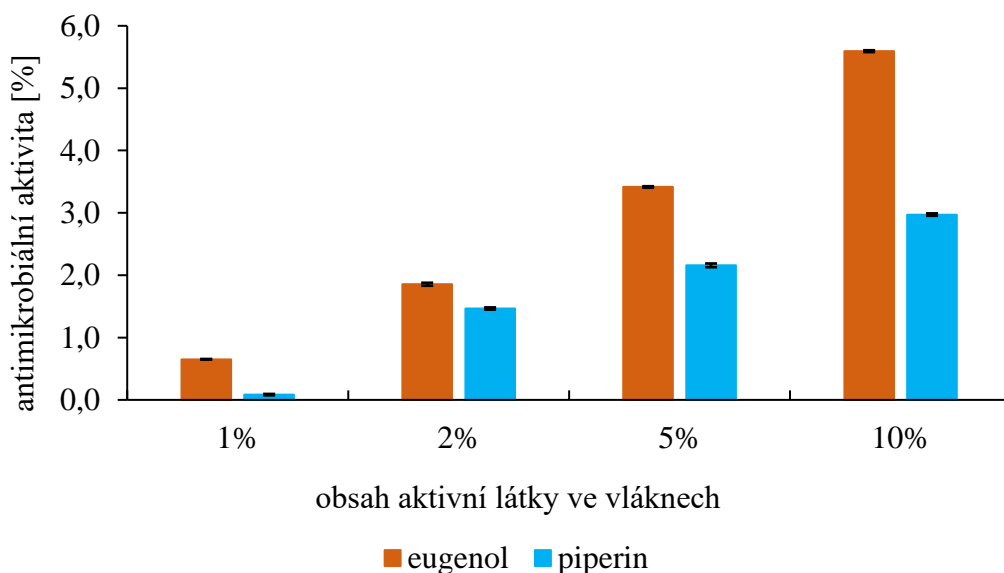
Hodnoty antimikrobiální aktivity želatinových nanovláken s eugenolem a piperinem jsou shrnuty v následujících grafech (Obrázek 31, Obrázek 32 a Obrázek 33).



Obrázek 31: Antimikrobiální aktivita účinných látek v želatinových vláknech u *S. epidermidis*

Z grafu (Obrázek 31) lze říci, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala nanovlákná ze želatiny funkcionalizovaná eugenolem o koncentraci 10 %, jelikož v tomto případě bylo enkapsulováno nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.2.1. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *S. epidermidis* v tomto případě byla $13,153 \pm 0,002$ %.

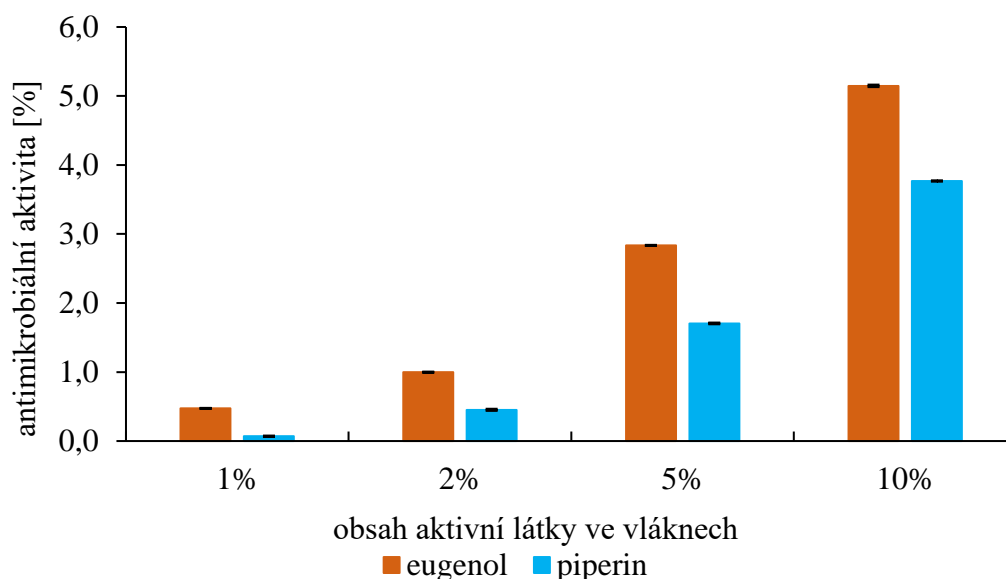
Antimikrobiální aktivita piperinu v želatinových vláknech byla nejvyšší u vláken s piperinem o koncentraci 10 %, v tomto případě bylo ve vláknech enkapsulováno nejvyšší množství aktivní látky. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $6,006 \pm 0,002$ %.



Obrázek 32: Antimikrobiální aktivita účinných látek v želatinových vláknech u *E. coli*

Z grafu (Obrázek 32) lze soudit, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala nanovlákná ze želatiny funkcionalizovaná piperinem o koncentraci 10 %, stejně jako v předchozím případě. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *E. coli* v tomto případě byla $5,593 \pm 0,005$ %.

Antimikrobiální aktivita piperinu v želatinových vláknech byla nejvyšší u vláken s obsahem piperinu o koncentraci 10 %, v tomto případě bylo enkapsulováno nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.2.2. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $2,972 \pm 0,011$ %.



Obrázek 33: Antimikrobiální aktivita účinných látek v želatinových vláknech u *C. acnes*

Z grafu (Obrázek 33) lze soudit, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu opět vykazovala nanovláknina ze želatiny funkcionalizovaná eugenolem o koncentraci 10 %. V tomto případě bylo z vláken uvolněno nejvyšší množství aktivní látky, jak je popsáno v kapitole 5.2.2.1. Antimikrobiální aktivita eugenolu u *C. acnes* v tomto případě byla $5,147 \pm 0,003$ %.

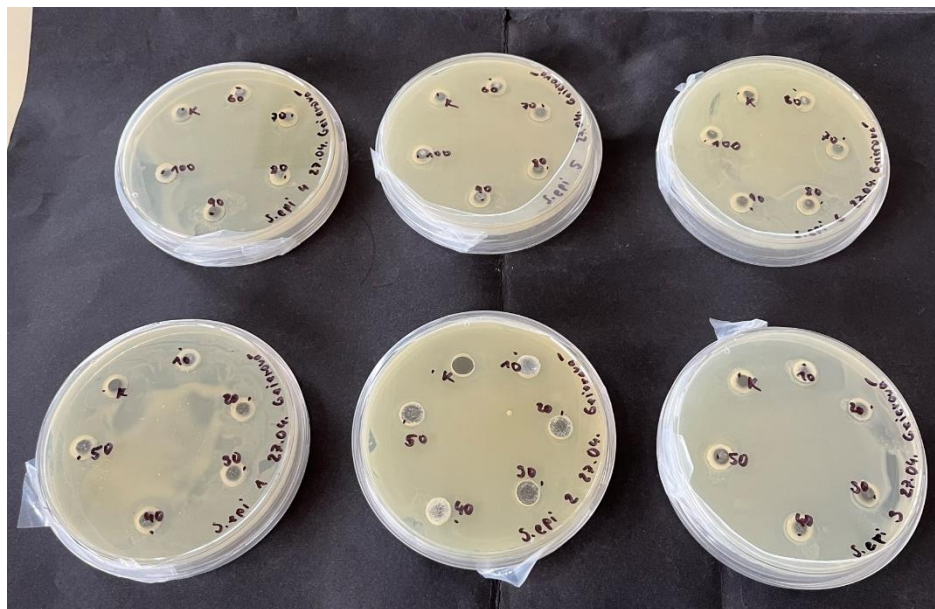
Antimikrobiální aktivita piperinu v želatinových vláknech byla nejvyšší u piperinu o koncentraci 10 %. V tomto případě bylo nejvyšší množství aktivní látky ve vláknech, jak je popsáno v kapitole 5.2.2.2. Hodnota antimikrobiální aktivity v tomto případě byla $3,768 \pm 0,005$ %.

Ze stanovených hodnot lze říci, že želatinová vlákna funkcionalizovaná aktivními látkami jsou nejúčinnější s 10% obsahem účinné látky. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla stanovena u *S. epidermidis*, kdy hodnota antimikrobiální aktivity činila $13,153 \pm 0,002$ %.

5.3.4 Difuzní metoda

Metoda byla zvolena pro stanovení minimální inhibiční koncentrace piperinu. Piperin byl připraven o koncentracích 10 až 100 mg/ml a byl rozpouštěn v 10% DMSO. Měření bylo prováděno podle postupu v kapitole 4.5.4.2. Měření bylo prováděno v triplicáttech.

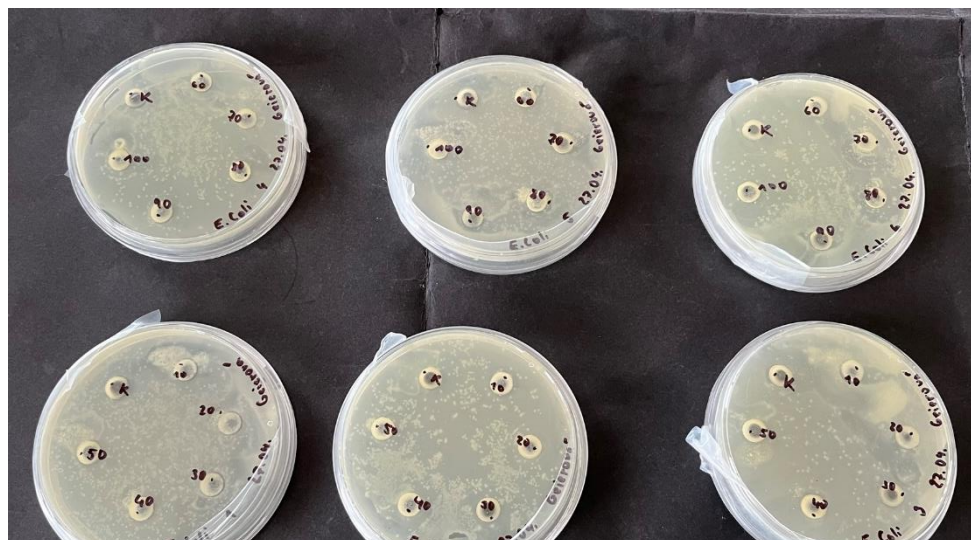
Výsledky jsou na následujících obrázcích (Obrázek 34, Obrázek 35 a Obrázek 36).



Obrázek 34: Difuzní testy s piperinem u *S. epidermidis*

Na obrázku (Obrázek 34) je možné vidět agarové plotny s mikroorganismem *S. epidermidis*. Ve spodní řadě se nacházejí koncentrace piperinu v rozmezí 10 až 50 mg/ml, v horní řadě jsou poté koncentrace 60 až 100 mg/ml. Jamka s písmenem „K“ je kontrola rozpouštědla, což bylo 25% DMSO.

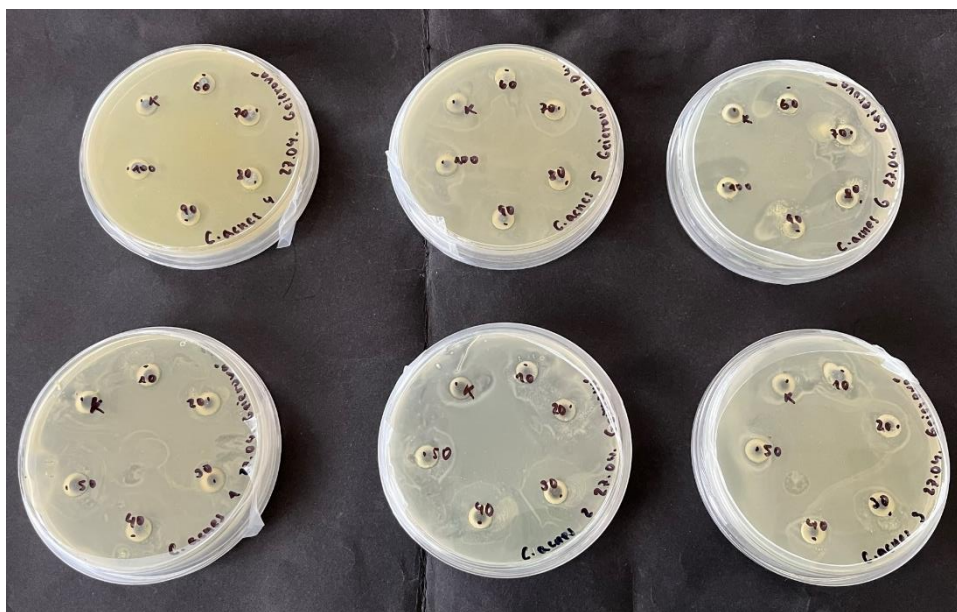
Je možné vidět, že piperin na mikroorganismus neměl žádný nebo velmi nepatrný účinek, což mohlo být způsobeno tím, že piperin nebylo možné rozpustit, jelikož se jedná o velmi hydrofobní látku [80]. Tím pádem se piperin usadil v jamkách a nedifundoval.



Obrázek 35: Difuzní testy s piperinem u *E. coli*

Na obrázku (Obrázek 35) jsou k vidění agarové plotny s mikroorganismem *E. coli*. Ve spodní řadě se nachází koncentrace piperinu v rozmezí 10 až 50 mg/ml, v horní řadě jsou poté koncentrace 60 až 100 mg/ml. Jamka s písmenem „K“ je kontrola rozpouštědla, což byl 25% DMSO.

Stejně jako v předchozím případě z těchto testů nelze určit minimální inhibiční koncentraci piperinu, jelikož nebyl pozorován žádný vliv. Mohlo to být způsobeno tím, že piperin nebylo možné rozpustit, jelikož se jedná o velmi hydrofobní látku [80]. Tím pádem došlo k usazení piperinu v jamkách.



Obrázek 36: Difuzní testy s piperinem u *C. acnes*

Na obrázku (Obrázek 36) jsou agarové plotny s mikroorganismem *C. acnes*. Stejně jako v předchozích případech se ve spodní řadě nachází koncentrace piperinu v rozmezí 10 až 50 mg/ml, v horní řadě jsou poté koncentrace 60 až 100 mg/ml. Jamka s písmenem „K“ je kontrola rozpouštědla, což bylo 25% DMSO.

Stejně jako v případech výše z těchto testů nelze určit minimální inhibiční koncentraci piperinu, jelikož nebyl pozorován žádný nebo minimální vliv. Mohlo to být způsobeno tím, že piperin nebylo možné rozpustit, jelikož se jedná o velmi hydrofobní látku [80]. Tím pádem došlo k usazení piperinu v jamkách a nedocházelo k jeho difundování.

5.4 Možné aplikace nanovlákných struktur v kosmetice a farmacii

Nanovlákné materiály mají potenciál při využití v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. U funkcionalizovaných nanovláken byla pomocí testů stanovena jejich antimikrobiální aktivita a uvolňování enkapsulovaných účinných látek.

Ze stanovených výsledků se jako vhodnou látkou využitelnou k aplikacím do pleťových masek jeví eugenol, který vykazoval vyšší antioxidační i antimikrobiální aktivitu i vyšší množství uvolněné látky. Antioxidační aktivita eugenolu je výhodná z hlediska aplikací v kosmetice, jelikož antioxidační účinky jsou v kosmetice důležité. Ze stanovených hodnot lze říci, že pleťové masky by bylo vhodné využívat v kratších časových intervalech z důvodu nejvyššího uvolněného množství aktivní látky. Zároveň je i výhodou, že nejlepší účinky

eugenol vykazuje při nejnižší koncentraci, což je výhodné z hlediska nejmenší pravděpodobnosti nežádoucích účinků. Účinky eugenolu by mohly být zvýšeny kombinací s jinými aktivními látkami [90]. Jako potenciál do budoucna by bylo kombinovat PHB a želatinová vlákna.

Vhodnou aplikační formou by mohly být rozpustné i nerozpustné nanovláknenné masky, které svým účinkem mohou zpomalit stárnutí pleti, chránit před UV zářením, hojit rány a také léčit akné. Tyto struktury jsou vhodné díky tomu, že dokáží dostat účinné látky do hlubších vrstev pokožky a tím docílit vyšších účinků [91].

V kosmetice se používají nanomateriály ke zlepšení pronikání látek do pokožky, zlepšení stavu pokožky. Prodlužují dobu působení buď řízeným dodáváním účinných složek nebo zlepšením kompatibility aktivních látek. Dále se nanostrukturální materiály využívají v přípravcích pro péči o vlasy a nehty, kdy stimulují jejich růst, chrání jejich strukturu a hydratují [92].

Kromě využití v kosmetice je možné nanovláknenné struktury uplatnit také ve farmacii k doručování léčiv. Nanovláknna mohou doručit určité množství léčiva do cílového místa a zajistit účinnou interakci léčivé látky v místě působení díky většímu povrchu. Dalšími důležitými výhodami nanovláken jsou nízká hustota, vysoká pórovitost, malá velikost pórů, vysoká mechanická pevnost a nízká cena. Malá velikost pórů je v případě využití nanovláken ve farmacii důležitým faktorem. Malé póry zabrání průniku mikroorganismů, ale pro příjem kyslíku jsou dostatečně velké, takže rána nemokvá [93].

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci nanovláken funkcionalizovaných aktivními látkami s cílem využití při přípravě pleťových masek s účinkem proti akné. Dále se zabývá testováním samotných antimikrobiálních a antioxidačních látek a také testováním těchto látek enkapsulovaných do nanovláken. U čistých látek i u nanovláken byl stanoven antimikrobiální účinek a u nanovlákných struktur bylo také sledováno postupné uvolňování těchto látek ve třech modelových prostředích.

Nejprve byla stanovena antioxidační aktivita látek. Eugenol vykazoval vyšší antioxidační aktivitu, a to $198,77 \pm 4,11$ mg/ml. Eugenol se tedy jeví jako vhodný antioxidant, naproti tomu piperin nelze úplně řadit mezi antioxidační látky, jelikož je jeho antioxidační aktivita velmi nízká. Antioxidační aktivita piperinu byla $11,58 \pm 4,90$ mg/ml.

Poté byl změřen celkový obsah polyfenolů u eugenolu. Hodnota celkových polyfenolů byla $0,29 \pm 0,82$ mg/ml. Polyfenoly jsou výhodné pro lidský organismus, jelikož působí antioxidačně, vasodilatačně nebo také protizánětlivě [81].

Následující část byla věnována postupnému uvolňování účinných látek z funkcionalizovaných nanovláken. Bylo zjištěno, že při vytřepávání do chloroformu i u stanovení polyfenolů se jako nejlepší koncentrace eugenolu v PHB vláknech zdá 1% obsah eugenolu. Toto zjištění je vhodné i pro možné budoucí aplikace do pleťových masek, jelikož je u nižší koncentrace eugenolu menší pravděpodobnost nežádoucích účinků eugenolu [65]. Při postupném uvolňování piperinu z PHB vláken nebylo dosaženo vysokých hodnot. Z těchto výsledků lze říci, že nejlépe se jeví vlákna enkapsulovaná piperinem o koncentraci 1 %. Ale tato forma piperinu není v této podobě nejvhodnější variantou při budoucím použití do pleťových masek. Je možné využití jiného izomeru piperinu, například chavicinu, který by teoreticky mohl mít pozitivnější výsledky [86]. Testovaný izomer piperinu byl vybrán kvůli dobrým synergickým účinkům s jinými aktivními látkami, jak uvádí některé publikace [87]. Nízké výsledky uvolněné látky ve vyšších koncentracích u PHB vláken mohly být způsobeny hydrofobním charakterem materiálu vláken. Při přidání vyšší koncentrace látky se jí větší množství zachytí a tím pádem se látky uvolní menší množství. Při uvolňování látek ze želatinových nanovláken se u vláken s eugenolem i s piperinem jeví jako nejlepší varianta vlákna s obsahem aktivní látky o koncentraci 10 %. U této koncentrace bylo naměřeno nejvyšší uvolněné množství, což mohlo být způsobeno tím, že želatinová nanovlákná hůře zadržují špatně rozpustné fenolické látky.

Dále byla stanovována antimikrobiální aktivita eugenolu a také funkcionalizovaných nanovláken. Minimální inhibiční koncentrace eugenolu u mikroorganismu *S. epidermidis* byla stanovena na koncentraci 2,000 mg/ml. U *E. coli* byla MIC eugenolu určena na 2,000 mg/ml a u *C. acnes* hodnota MIC eugenolu činila 0,500 mg/ml. Při určování antimikrobiální aktivity funkcionalizovaných nanovláken lze říci, že PHB vlákna s aktivními látkami jsou neúčinnější s eugenolem o koncentraci 1 %. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla stanovena u *E. coli* a nejnižší hodnotu vykazovala PHB vlákna u mikroorganismu *C. acnes*. Lze vidět, že nejvyšší antimikrobiální aktivita byla u PHB vláken s nejnižší koncentrací látky, což mohlo být způsobeno hydrofobním charakterem PHB. Tím pádem byly látky o vyšších koncentracích silněji potáhány v nanovlákněch a uvolnilo se jich nižší množství. Které mohlo působit na

mikroorganismy. Ze stanovených hodnot u želatinových nanovláken lze říci, že neúčinnější jsou vlákna s obsahem účinné látky o koncentraci 10 %. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla stanovena u *S. epidermidis*, kdy hodnota antimikrobiální aktivity činila $13,153 \pm 0,002$ %. Důvodem mohl být fakt, že želatinová nanovláknina nedokáže silně vázat špatně rozpustné fenolické látky. Tím pádem je při vyšším obsahu aktivní látky také vyšší antimikrobiální účinek, jelikož je více látky dostupné aktivní látky působící na mikroorganismy. Antimikrobiální aktivitu piperinu se nepodařilo určit kvůli jeho špatné rozpustnosti [80].

V praktické části byla úspěšně připravena funkcionalizovaná nanovláknina. Pro budoucí využití v pleťových maskách proti akné by byla pravděpodobně potřebná úprava do jiných materiálů, popřípadě využití kombinací materiálů a látek. Po těchto úpravách by se mohl zvýšit antimikrobiální účinek, což je při využití v pleťových maskách proti akné klíčovým bodem.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH, ed. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2009. ISBN 978-1-4200-6963-1.
- [2] SHARMA, Jaishri, Monira LIZU, Mark STEWART, Kyle ZYGULA, Yang LU, Rajat CHAUHAN, Xingru YAN, Zhanhu GUO, Evan WUJCIK a Suying WEI. Multifunctional Nanofibers towards Active Biomedical Therapeutics. *Polymers* [online]. 2015, **7**(2), 186–219 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym7020186
- [3] ZARE, Mina, Karolina DZIEMIDOWICZ, Gareth R. WILLIAMS a Seeram RAMAKRISHNA. Encapsulation of Pharmaceutical and Nutraceutical Active Ingredients Using Electrospinning Processes. *Nanomaterials* [online]. 2021, **11**(8), 1968 [vid. 2023-05-24]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11081968
- [4] VINSOVA, Jarmila a Aleš IMRAMOVSKÝ. [Salicylanilides: still a potential antibacterially active group]. *Ceská a Slovenská farmacie : casopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti*. 2004, **53**, 294–9.
- [5] OLOWOSULU, Adeniji a Yakubu IBRAHIM. Studies on the antimicrobial screening of Aqueous extracts of five plants used in Folk medicine in Nigeria. *J Biol Sci*. 2006, **3**, 21–26.
- [6] AL-NIMRY, Suhair, Alaa Abu DAYAH, Inas HASAN a Rawand DAGHMASH. Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. *Marine Drugs* [online]. 2021, **19**(3), 145 [vid. 2023-05-24]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md19030145
- [7] BIANCHET, Ritanara Tayane, Anelise Leal VIEIRA CUBAS, Marina Medeiros MACHADO a Elisa Helena SIEGEL MOECKE. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, **27**, e00502 [vid. 2023-05-24]. ISSN 2215-017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2020.e00502
- [8] BIANCHET, Ritanara Tayane, Anelise Leal VIEIRA CUBAS, Marina Medeiros MACHADO a Elisa Helena SIEGEL MOECKE. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, **27**, e00502 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2020.e00502
- [9] ALIPAL, J., N.A.S. MOHD PU'AD, T.C. LEE, N.H.M NAYAN, N. SAHARI, H. BASRI, M.I. IDRIS a H.Z. ABDULLAH. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2021, **42**, 240–250 [vid. 2023-05-07]. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.12.922
- [10] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45–56 [vid. 2023-05-07]. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001

- [11] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 978-80-7345-046-5.
- [12] NILFOROUSHZADEH, Mohammad Ali, Mohammad Amir AMIRKHANI, Payam ZARRINTAJ, Abolfazl SALEHI MOGHADDAM, Tina MEHRABI, Shiva ALAVI a Mahsa MOLLAPOUR SISAKHT. Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2018, **17**(5), 693–702 [vid. 2023-05-07]. ISSN 14732130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12730
- [13] KAPOOR, Shweta a Swarnlata SARAF. Formulation and Evaluation of Moisturizer Containing Herbal Extracts for the Management of Dry Skin. *Pharmacognosy Journal* [online]. 2010, **2**(11), 409–417 [vid. 2023-05-07]. ISSN 09753575. Dostupné z: doi:10.1016/S0975-3575(10)80024-0
- [14] ZARWINDA, Irma, Fauziah FAUZIAH, Jumirna JUMIRNA a Azmalina ADRIANI. THE FORMULATION OF PEEL-OFF MASK FROM THE ETHANOL EXTRACT OF BILIMBI LEAVES (*Averrhoa bilimbi* L.) AS ANTI-ACNE TREATMENT. *Lantanida Journal* [online]. 2021, **9**(1) [vid. 2023-05-07]. ISSN 2548-9062, 2356-3133. Dostupné z: doi:10.22373/lj.v9i1.10206
- [15] BERINGHS, André O'Reilly, Julia Macedo ROSA, Hellen Karine STULZER, Rosane Maria BUDAL a Diva SONAGLIO. Green Clay and Aloe Vera Peel-Off Facial Masks: Response Surface Methodology Applied to the Formulation Design. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2013, **14**(1), 445–455 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-013-9930-8
- [16] VELASCO, M. V. R., R. P. VIEIRA, A. R. FERNANDES, M. F. DARIO, C. A. S. O. PINTO, C. A. PEDRIALI, T. M. KANEKO a A. R. BABY. Short-term clinical of peel-off facial mask moisturizers. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2014, **36**(4), 355–360 [vid. 2023-05-07]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12133
- [17] QUATTRONE, Anna, Anna CZAJKA a Sara SIBILLA. Thermosensitive Hydrogel Mask Significantly Improves Skin Moisture and Skin Tone; Bilateral Clinical Trial. *Cosmetics* [online]. 2017, **4**(2), 17 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics4020017
- [18] HOCELLA, Michael F., David W. MOGK, James RANVILLE, Irving C. ALLEN, George W. LUTHER, Linsey C. MARR, B. Peter MCGRIL, Mitsu MURAYAMA, Nikolla P. QAFOKU, Kevin M. ROSSO, Nita SAHAI, Paul A. SCHROEDER, Peter VIKESLAND, Paul WESTERHOFF a Yi YANG. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science* [online]. 2019, **363**(6434), eaau8299 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aau8299
- [19] MORDORSKI, B., A. LANDRISCINA a A. FRIEDMAN. An Overview of Nanomaterials in Dermatology. In: *Nanoscience in Dermatology* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2023-05-07], s. 31–46. ISBN 978-0-12-802926-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802926-8.00003-3

- [20] FILELLA, M. Nanomaterials. In: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [vid. 2023-05-07], s. 109–124. ISBN 978-0-12-381374-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381373-2.00032-6
- [21] MALHOTRA, Bansi Dhar a Md. Azahar ALI. Nanomaterials in Biosensors. In: *Nanomaterials for Biosensors* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2023-05-07], s. 1–74. ISBN 978-0-323-44923-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7
- [22] KO, Frank K. a Yuqin WAN. *Introduction to Nanofiber Materials* [online]. 1. vyd. B.m.: Cambridge University Press, 2014 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-0-521-87983-5. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781139021333
- [23] RAMALINGAM, M. a S. RAMAKRISHNA. Introduction to nanofiber composites. In: *Nanofiber Composites for Biomedical Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2023-05-07], s. 3–29. ISBN 978-0-08-100173-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100173-8.00001-6
- [24] NGUYEN, Luong T. H., Shilin CHEN, Naveen K. ELUMALAI, Molamma P. PRABHAKARAN, Yun ZONG, Chellappan VIJILA, Suleyman I. ALLAKHVERDIEV a Seeram RAMAKRISHNA. Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers: Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2013, **298**(8), 822–867 [vid. 2023-05-07]. ISSN 14387492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201200143
- [25] STOJANOV, Spase a Aleš BERLEC. Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, **8**, 130 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00130
- [26] *Green Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-0-12-809270-5. Dostupné z: doi:10.1016/C2015-0-05674-X
- [27] EHRMANN, Andrea. Non-Toxic Crosslinking of Electrospun Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering and Biomedicine—A Review. *Polymers* [online]. 2021, **13**(12), 1973 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13121973
- [28] JEONG, Lim a Won PARK. Preparation and Characterization of Gelatin Nanofibers Containing Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(4), 6857–6879 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15046857
- [29] *Nanobiomaterials in Medical Imaging* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-0-323-41736-5. Dostupné z: doi:10.1016/C2015-0-00392-6
- [30] JANG, Sun Ah, Ji Hyun PARK, Hye Jin LIM, Joon Young OH, Hyeon Bae KI, Kyung Jin LEE, Jae Kwang SONG a Dong-Myung KIM. Bio-specific immobilization of enzymes on electrospun PHB nanofibers. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2021, **145**, 109749 [vid. 2023-05-07]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2021.109749

- [31] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), e265–e265 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1884-4049, 1884-4057. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [32] PARVEEZ, Ghulam Kadir Ahmad, Omar A. RASID, Ahmad Tarmizi HASHIM, Zamzuri ISHAK, Samsul Kamal ROSLI a Ravigadevi SAMBANTHAMURTHI. Tissue Culture and Genetic Engineering of Oil Palm. In: *Palm Oil* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [vid. 2023-05-07], s. 87–135. ISBN 978-0-9818936-9-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-9818936-9-3.50007-1
- [33] SHARMA, Jaishri, Monira LIZU, Mark STEWART, Kyle ZYGULA, Yang LU, Rajat CHAUHAN, Xingru YAN, Zhanhu GUO, Evan K. WUJCIK a Suying WEI. Multifunctional Nanofibers towards Active Biomedical Therapeutics. *Polymers* [online]. 2015, **7**(2), 186–219 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym7020186
- [34] PEÑA, C., T. CASTILLO, A. GARCÍA, M. MILLÁN a D. SEGURA. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* [online]. 2014, **7**(4), 278–293 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1751-7915, 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12129
- [35] BARHOUM, Ahmed, Mikhael BECHELANY a Abdel Salam Hamdy MAKHLOUF, ed. *Handbook of Nanofibers* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-3-319-53654-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-53655-2
- [36] RIAHI, Daniel N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forspinning process. *International Journal of Non-Linear Mechanics* [online]. 2017, **92**, 1–7 [vid. 2023-05-07]. ISSN 00207462. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijnonlinmec.2017.03.004
- [37] EATEMADI, Ali, Hadis DARAEE, Nosratolah ZARGHAMI, Hassan MELAT YAR a Abolfazl AKBARZADEH. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2016, **44**(1), 111–121 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2169-1401, 2169-141X. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2014.922568
- [38] ALMETWALLY, A.A., Mohamed EL-SAKHAWY, Mahmoud ELSHAKANKERY a M.H. KASEM. Technology of nano-fibers: Production techniques and properties - Critical review. *Journal of the Textile Association*. 2017, **78**, 5–14.
- [39] BAYRAK, Ece. Nanofibers: Production, Characterization, and Tissue Engineering Applications. In: Phuong V. PHAM, ed. *21st Century Nanostructured Materials - Physics, Chemistry, Classification, and Emerging Applications in Industry, Biomedicine, and Agriculture* [online]. B.m.: IntechOpen, 2022 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-1-80355-084-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.102787
- [40] KOTHARI, Vijay. Antimicrobial Effects. In: *Definitions* [online]. B.m.: Qeios, 2019 [vid. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.32388/007045
- [41] MOODY, Von a Howard L. NEEDLES. Antimicrobial Agents. In: *Tufted Carpet* [online]. B.m.: Elsevier, 2004 [vid. 2023-05-07], s. 145–153. ISBN 978-1-884207-99-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-188420799-0.50015-4

- [42] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. [online]. B.m.: NEPTUN, 2005 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-80-86850-00-9. Dostupné z: <https://is.muni.cz/publication/597304/cs/Lekarska-mikrobiologie-obecna/Votava>
- [43] CHENG, Hao a Gangliang HUANG. Extraction, characterisation and antioxidant activity of *Allium sativum* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **114**, 415–419 [vid. 2023-05-07]. ISSN 01418130. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.156](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.156)
- [44] COULIBALY, Ahmed Yacouba, Rokiah HASHIM, Shaida Fariza SULAIMAN, Othman SULAIMAN, Lily Zuin Ping ANG a Kheng Leong OOI. Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2014, **7**, S553–S559 [vid. 2023-05-07]. ISSN 19957645. Dostupné z: [doi:10.1016/S1995-7645\(14\)60289-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60289-3)
- [45] ŻYMAŃCZYK-DUDA, Ewa, Beata SZMIGIEL-MERENA, Małgorzata BRZEZIŃSKA-RODAK a Magdalena KLIMEK-OCHAB. Natural antioxidants—properties and possible applications. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* [online]. 2018, **5**(4) [vid. 2023-05-07]. ISSN 25728466. Dostupné z: [doi:10.15406/jabb.2018.05.00146](https://doi.org/10.15406/jabb.2018.05.00146)
- [46] XU, Dong-Ping, Ya LI, Xiao MENG, Tong ZHOU, Yue ZHOU, Jie ZHENG, Jiao-Jiao ZHANG a Hua-Bin LI. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(1), 96 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms18010096](https://doi.org/10.3390/ijms18010096)
- [47] LOBO, V, A PATIL, A PHATAK a N CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2010, **4**(8), 118 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0973-7847. Dostupné z: [doi:10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902)
- [48] ÇALIŞKAN, Betül a Ali CENGİZ ÇALIŞKAN. Antioxidant and Oxidative Stress. In: Viduranga WAISUNDARA, ed. *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action* [online]. B.m.: IntechOpen, 2021 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-1-83968-864-5. Dostupné z: [doi:10.5772/intechopen.96643](https://doi.org/10.5772/intechopen.96643)
- [49] PIZZINO, Gabriele, Natasha IRRERA, Mariapaola CUCINOTTA, Giovanni PALLIO, Federica MANNINO, Vincenzo ARCORACI, Francesco SQUADRITO, Domenica ALTAVILLA a Alessandra BITTO. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**, 1–13 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1942-0900, 1942-0994. Dostupné z: [doi:10.1155/2017/8416763](https://doi.org/10.1155/2017/8416763)
- [50] BRYSKIER, André, ed. *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals* [online]. Washington, DC, USA: ASM Press, 2005 [vid. 2023-05-08]. ISBN 978-1-68367-191-6. Dostupné z: [doi:10.1128/9781555815929](https://doi.org/10.1128/9781555815929)
- [51] MILLER, Elwyn R., Duane E. ULLREY a Austin J. LEWIS. *Swine Nutrition*. B.m.: Butterworth-Heinemann, 2018. ISBN 978-1-4831-6211-9.
- [52] KALOGIANNI, Aphrodite I., Thomai LAZOU, Ioannis BOSSIS a Athanasios I. GELASAKIS. Natural Phenolic Compounds for the Control of Oxidation, Bacterial

- Spoilage, and Foodborne Pathogens in Meat. *Foods* [online]. 2020, **9**(6), 794 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9060794
- [53] ANGIOLELLA, Letizia, Gianni SACCHETTI a Thomas EFFERTH. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Natural Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2018, **2018**, 1–3 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1741-427X, 1741-4288. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1945179
- [54] CHAIWANGYEN, Wittaya, Orada CHUMPHUKAM, Napapan KANGWAN, Komsak PINTHA a Maitree SUTTAJIT. Chapter 8 - Anti-aging effect of polyphenols: possibilities and challenges. In: Kanti Bhooshan PANDEY a Maitree SUTTAJIT, ed. *Plant Bioactives as Natural Panacea Against Age-Induced Diseases* [online]. B.m.: Elsevier, 2023 [vid. 2023-05-08], Drug Discovery Update, s. 147–179. ISBN 978-0-323-90581-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90581-7.00022-0
- [55] PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, **2**(5), 270–278 [vid. 2023-05-08]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/>
- [56] *Naturally alkaloids as Antimicrobial agents* [online]. [vid. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/1696>
- [57] KUREK, Joanna. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. In: *Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life* [online]. B.m.: IntechOpen, 2019 [vid. 2023-05-08]. ISBN 978-1-78984-577-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.85400
- [58] DIAS, Lucas D., Kate C. BLANCO, Ivan S. MFOUO-TYNGA, Natalia M. INADA a Vanderlei S. BAGNATO. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* [online]. 2020, **45**, 100384 [vid. 2023-05-07]. ISSN 13895567. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384
- [59] KOTHA, Raghavendhar R. a Devanand L. LUTHRIA. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* [online]. 2019, **24**(16), 2930 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24162930
- [60] JAKUBCZYK, Karolina, Aleksandra DRUŽGA, Janda KATARZYNA a Karolina SKONIECZNA-ŻYDECKA. Antioxidant Potential of Curcumin—A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(11), 1092 [vid. 2023-05-09]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9111092
- [61] HUANG, Mou-Tuan. Antioxidant and Antitumorigenic Properties of Curcumin. In: Hajime OHIGASHI, Toshihiko OSAWA, Junji TERAO, Shaw WATANABE a Toshikazu YOSHIKAWA, ed. *Food Factors for Cancer Prevention* [online]. Tokyo: Springer Japan, 1997, s. 249–252. ISBN 978-4-431-67017-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-4-431-67017-9_50
- [62] Eugenol (Clove Oil). In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and

- Kidney Diseases, 2012 [vid. 2023-05-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551727/>
- [63] SHARMA, Ajay, Garima BHARDWAJ, Harvinder Singh SOHAL a Apurba GOHAIN. Eugenol. In: *Nutraceuticals and Health Care* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [vid. 2023-05-07], s. 177–198. ISBN 978-0-323-89779-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89779-2.00007-7
- [64] HIDALGO, María E., Carlos DE LA ROSA, Héctor CARRASCO, Wilson CARDONA, Claudio GALLARDO a Luis ESPINOZA. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Química Nova* [online]. 2009, **32**, 1467–1470 [vid. 2023-05-09]. ISSN 0100-4042, 1678-7064. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-40422009000600020
- [65] ULANOWSKA, Magdalena a Beata OLAS. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(7), 3671 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073671
- [66] NAIR, Haritha H., Vijai V. ALEX a Ruby John ANTO. Significance of nutraceuticals in cancer therapy. In: *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules* [online]. B.m.: Elsevier, 2021 [vid. 2023-05-07], s. 309–321. ISBN 978-0-12-821710-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821710-8.00014-X
- [67] IZAWA, Kunisuke, Yusuke AMINO, Masanori KOHMURA, Yoichi UEDA a Motonaka KURODA. Human–Environment Interactions – Taste. In: *Comprehensive Natural Products II* [online]. B.m.: Elsevier, 2010 [vid. 2023-05-07], s. 631–671. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045382-8.00108-8
- [68] MITTAL, R. a R. L. GUPTA. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* [online]. 2000, **22**(5), 271–274. ISSN 0379-0355. Dostupné z: doi:10.1358/mf.2000.22.5.796644
- [69] *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-0-12-816787-8. Dostupné z: doi:10.1016/C2018-0-00341-2
- [70] THIRUPPATHI, Rukmani, Sachin MISHRA, Mathangi GANAPATHY, Parasuraman PADMANABHAN a Balázs GULYÁS. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Advanced Science* [online]. 2017, **4**(3), 1600279 [vid. 2023-05-07]. ISSN 21983844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.201600279
- [71] LOU, Lihua, Odia OSEMWEIGIE a Seshadri S. RAMKUMAR. Functional Nanofibers and Their Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2020, **59**(13), 5439–5455 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0888-5885, 1520-5045. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.9b07066
- [72] TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O’HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1995, **33**(6), 1524–1527 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.33.6.1524-1527.1995

- [73] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71–79 [vid. 2023-05-07]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [74] MERCER, Derry K., Marcelo D. T. TORRES, Searle S. DUAY, Emma LOVIE, Laura SIMPSON, Maren VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, Cesar DE LA FUENTE-NUNEZ, Deborah A. O'NEIL a Alfredo M. ANGELES-BOZA. Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10**, 326 [vid. 2023-05-07]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.00326
- [75] BONEV, B., J. HOOPER a J. PARISOT. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2008, **61**(6), 1295–1301 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0305-7453, 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkn090
- [76] WIEGAND, Irith, Kai HILPERT a Robert E W HANCOCK. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* [online]. 2008, **3**(2), 163–175 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.521
- [77] HORVÁTH, Gy., T. BENCSIK, K. ÁCS a B. KOCSIS. Sensitivity of ESBL-Producing Gram-Negative Bacteria to Essential Oils, Plant Extracts, and Their Isolated Compounds. In: *Antibiotic Resistance* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2023-05-07], s. 239–269. ISBN 978-0-12-803642-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803642-6.00012-5
- [78] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, **49**(11), 1749–1755 [vid. 2023-05-07]. ISSN 1058-4838, 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/647952
- [79] STOJANOVIĆ-RADIĆ, Zorica, Milica PEJČIĆ, Marina DIMITRIJEVIĆ, Ana ALEKSIĆ, Nanjangud V. ANIL KUMAR, Bahare SALEHI, William C. CHO a Javad SHARIFI-RAD. Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A Review of Its Bioactivity and Studies. *Applied Sciences* [online]. 2019, **9**(20), 4270 [vid. 2023-05-26]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9204270
- [80] TIWARI, Anshuly, Kakasaheb R. MAHADIK a Satish Y. GABHE. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. *Medicine in Drug Discovery* [online]. 2020, **7**, 100027 [vid. 2023-05-25]. ISSN 2590-0986. Dostupné z: doi:10.1016/j.medidd.2020.100027
- [81] ABDEL-SHAIFY, Hussein a Mona MANSOUR. Polyphenols: Properties, Occurrence, Content in Food and Potential Effects. In: . 2017, s. 232–261.
- [82] FERRAZ, Mariana Costa, Fernanda Ramalho PROCÓPIO, Guilherme DE FIGUEIREDO FURTADO, Amanda Maria Tomazini MUNHOZ MOYA, Cinthia Baú Betim CAZARIN a Miriam Dupas HUBINGER. Cinnamon and paprika oleoresin emulsions: A study of physicochemical stability and antioxidant synergism. *Food*

- Research International* [online]. 2021, **150**, 110777 [vid. 2023-05-25]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110777
- [83] ZHOU, Yansheng, Ying LI, Daqing LI, Yidan YIN a Fenglei ZHOU. Electrospun PHB/Chitosan Composite Fibrous Membrane and Its Degradation Behaviours in Different pH Conditions. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2022, **13**(2), 58 [vid. 2023-05-26]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb13020058
- [84] PADALKAR, K. a V. GAIKAR. Extraction of Piperine from Piper Nigrum (Black Pepper) by Aqueous Solutions of Surfactant and Surfactant + Hydrotrope Mixtures. *Separation Science and Technology* [online]. 2008, **43**, 3097–3118. Dostupné z: doi:10.1080/01496390802063887
- [85] DEROSA, Giuseppe, Pamela MAFFIOLI a Amirhossein SAHEBKAR. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2016, **928**, 173–184. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41334-1_8
- [86] IZAWA, Kunisuke, Yusuke AMINO, Masanori KOHMURA, Yoichi UEDA a Motonaka KURODA. 4.16 - Human–Environment Interactions – Taste. In: Hung-Wen (Ben) LIU a Lew MANDER, ed. *Comprehensive Natural Products II* [online]. Oxford: Elsevier, 2010 [vid. 2023-05-25], s. 631–671. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045382-8.00108-8
- [87] SAINI, Neha, Bhawna CHOPRA a Ashwani K. DHINGRA. Synergistic Effect of Piperine and its Derivatives: A Comprehensive Review. *Current Drug Research Reviews* [online]. nedatováno, **15**(2), 105–121 [vid. 2023-05-26]. Dostupné z: <https://www.eurekaselect.com/article/127327>
- [88] GHORANI, Behrouz, Bahareh EMADZADEH, Hassan REZAEINIA a Stephen. J. RUSSELL. Improvements in gelatin cold water solubility after electrospinning and associated physicochemical, functional and rheological properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **104**, 105740 [vid. 2023-05-25]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105740
- [89] ABDUL MANAP, Aimi Syamima, Amelia Cheng WEI TAN, Weng Hhin LEONG, Adeline Yoke YIN CHIA, Shantini VIJAYABALAN, Aditya ARYA, Eng Hwa WONG, Farzana RIZWAN, Umesh BINDAL, Shajan KOSHY a Priya MADHAVAN. Synergistic Effects of Curcumin and Piperine as Potent Acetylcholine and Amyloidogenic Inhibitors With Significant Neuroprotective Activity in SH-SY5Y Cells via Computational Molecular Modeling and in vitro Assay. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. 2019, **11**, 206 [vid. 2023-05-25]. ISSN 1663-4365. Dostupné z: doi:10.3389/fnagi.2019.00206
- [90] MOHAMMADI NEJAD, Solmaz, Hilal ÖZGÜNEŞ a Nursen BAŞARAN. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **14**(2), 201–206 [vid. 2023-05-25]. ISSN 1304-530X. Dostupné z: doi:10.4274/tjps.62207
- [91] YILMAZ, Fulya, Gizem CELEP a Gamze TETIK. Nanofibers in Cosmetics. In: [online]. 2016. ISBN 978-953-51-4828-9. Dostupné z: doi:10.5772/64172

- [92] GUPTA, Vaibhav, Sradhanjali MOHAPATRA, Harshita MISHRA, Uzma FAROOQ, Keshav KUMAR, Mohammad Javed ANSARI, Mohammed F. ALDAWSARI, Ahmed S. ALALAIWE, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. *Gels* [online]. 2022, **8**(3), 173 [vid. 2023-05-27]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels8030173
- [93] PRIYA, Sakshi, Unnati BATRA, Samshritha R.N., Sudhanshu SHARMA, Akash CHAURASIYA a Gautam SINGHVI. Polysaccharide-based nanofibers for pharmaceutical and biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, **218**, 209–224 [vid. 2023-05-25]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.07.118

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TFE	2,2,2-trifluorethanol
PHB	polyhydroxybutyrát
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
PHO	poly(3-hydroxyoktanoát)
PHN	poly(3-hydroxynonanoát)
HHx	3-hydroxyhexanoát
HH	3-hydroxyheptanoát
HD	3-hydroxydekanoátem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BHI	Brain Heart Infusion Broth
LB	Lysogeny Broth
TEAB	Tetraethylamonium Bromid
TEAC	Trolox Equivalant Antioxidant Capacity
DMSO	dimethylsulfoxid