



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE  
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ NANOČÁSTIC A  
NANOVLÁKEN S PŘÍRODNÍMI UV FILTRY  
PREPARATION AND APPLICATION OF NANOPARTICLES AND NANOFIBRES WITH  
NATURAL UV FILTERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR  
PRÁCE  
AUTHOR

Bc. Monika Plachá

VEDOUCÍ  
PRÁCE  
SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CS

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1152/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Monika Plachá**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Příprava a využití nanočástic a nanovláken s přírodními UV filtry

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na přehled přírodních UV filtrů a přípravu nanomateriálů
- 2) optimalizace metod přípravy nanočástic a nanovláken
- 3) funkcionalizace nanostruktur vybranými typy přírodních UV filtrů, charakterizace SPF faktoru
- 4) testování připravených UV filtrů in vitro i in vivo

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

-----  
Bc. Monika Plachá  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Predložená diplomová práca je zameraná na prípravu nanočastíc a nanovláknien s prírodnými UV filtrami. V práci boli pripravené lipozómové častice, do ktorých boli enkapsulované vodné, etanolové a olejové extrakty. Ďalej boli vytvorené nanovlákná z PHB s obsahom olejových extraktov.

V práci bola spracovaná rešerš zameraná na prírodné materiály s potenciálnym účinkom UV filtrov. Teoretická časť popisuje nanočastice, nanovlákná a metódy ich prípravy a charakterizácie.

V experimentálnej časti práce boli pripravené vodné, etanolové a olejové extrakty z praženej kávy, zelenej kávy a cascary. Extrakty boli spektrofotometricky charakterizované na obsah polyfenolov, flavonoidov, antioxidantov, tanínov a bolo stanovené ich SPF. Z extraktov boli pripravené častice, u ktorých bola stanovená enkapsulačná účinnosť, krátkodobá stabilita, dlhodobá stabilita a SPF. Pomocou metódy DLS bola stanovená veľkosť častíc, polydisperzitný faktor a koloidná stabilita. Pomocou elektrospinningu a forcesspinngu boli vytvorené vlákna z PHB s obsahom olejových extraktov. Pripravené vlákna boli analyzované FTIR-ATR, testom antioxidantnej aktivity a bolo vykonané stanovenie krátkodobej a dlhodobej stability. Z vybraných druhov častíc boli pripravené emulzie a gély a bolo stanovené ich SPF. Z emulzií boli vybrané 3 typy, ktoré boli testované na dobrovoľníkoch a bola stanovená ich stabilita pomocou analytickej centrifúgy.

Na záver práce bola stanovená cytotoxicita vybraných druhov častíc a vláknien na keratinocytoch.

## **Kľúčové slová**

Nanočastice, nanovlákná, polyhydroxybutyrát, UV filtre, keratinocyty, SPF, stabilita

## **Abstract**

The presented diploma thesis is focused on preparation of nanoparticles and nanofibres with natural UV filters. Liposomes with encapsulated aqueous, ethanol and lipid extracts were prepared. Nanofibers from PHB containing lipid extract were prepared too.

As a part of this work, an overview of natural sources with potential effects as UV filters were introduced. Moreover, nanoparticles and nanofibers and methods of their characterization were described. Size, polydisperse index and colloid stability of prepared nanoparticles were characterized via DLS.

In experimental part aqueous, ethanol and lipid extracts were prepared from roasted coffee, green coffee and cascara. These extracts were spectrophotometrically characterized for the content of polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, tannins and their SPF. Liposomes and liposomes containing PHB with these extracts were prepared and the encapsulation effectivity, short-term and long-term stability as well as SPF of nanoparticles were determined. Nanofibers from PHB containing lipid extracts were prepared via electrospinning and forcespinning methods. Prepared nanofibers were examined via FTIR-ATR. Antioxidant activity, short-term and long-term stability were determined spectrophotometrically. From selected nanoparticles, emulsions and gels were prepared and their SPF was also determined. Three types of emulsions with the best SPF were selected and tested on volunteers. Sedimentation stability of emulsions was tested by analytical centrifuge. Finally, cytotoxicity of selected nanoparticles and nanofibers was tested via MTT assay using human keratinocytes.

## **Key words**

Nanoparticles, nanofibres, polyhydroxybutyrate, UV filters, keratinocytes, SPF, stability

PLACHÁ, M. *Příprava a využití nanočástic a nanovláken s přírodními UV filtry*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 88 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

**PREHLÁSENIE:**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje boli správne a úplne citované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekanom fakulty FCH VUT.

.....  
podpis študenta

**POĎAKOVANIE:**

Touto cestou by som sa rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie práce. Ďalej by som sa chcela poďakovať mojej konzultantke Ing. Renate Pavelkovej za cenné rady pri experimentálnej časti práce, ako aj Ing. Jitke Bokrovej. V neposlednom rade by som sa rada poďakovala mojej rodine a priateľovi za podporu počas celého trvania štúdia a tiež jeho umožnenie.

# OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Teoretická časť.....	11
2.1	Koža.....	11
2.1.1	Epidermis .....	11
2.1.2	Dermis .....	11
2.2	Charakteristika vybraných bioaktívnych zložiek prírodných látok.....	12
2.2.1	Antioxidanty.....	12
2.2.2	Flavonoidy.....	12
2.2.3	Polyfenoly .....	13
2.2.4	Taníny.....	14
2.3	Charakterizácia prírodných extraktov .....	14
2.3.1	UV–VIS spektrofotometria.....	14
2.4	UV žiarenie.....	14
2.5	UV filtre.....	15
2.5.1	Chemické UV filtre .....	15
2.5.2	Fyzikálne UV filtre.....	15
2.6	Prírodné UV filtre.....	15
2.7	SPF .....	16
2.8	Prírodné látky potenciálne obsahujúce UV filtre .....	19
2.8.1	Káva .....	19
2.8.2	Zelená káva .....	20
2.8.3	Cascara .....	20
2.9	Enkapsulácia.....	21
2.10	Nanotechnológie v kozmetike .....	21
2.11	Nanočastice.....	22
2.11.1	Lipozómy .....	22
2.11.2	Materiály používané na prípravu častíc .....	23
2.11.3	Metódy prípravy častíc.....	24
2.12	Charakterizácia častíc .....	24
2.12.1	Enkapsulačná účinnosť.....	25
2.12.2	Charakterizácia častíc pomocou dynamického rozptylu svetla.....	25
2.12.3	Charakterizácia stability častíc .....	25
2.12.4	Testy cytotoxicity .....	26
2.12.5	SOS chromotest.....	27

2.13	Nanovlákná.....	27
2.13.1	Príprava nanovlákién pomocou elektrosponingu .....	27
2.13.2	Príprava nanovlákién pomocou forcéspinningu .....	28
2.13.3	Charakterizácia vlákién pomocou FTIR–ATR .....	29
2.14	Emulzie.....	30
2.14.1	Hydrofilno–lipofilná rovnováha.....	30
2.14.2	Suroviny používané na prípravu emulzie.....	31
2.14.3	Suroviny používané na prípravu gélov.....	32
2.14.4	Charakterizácia stability emulzie .....	32
3	Ciele práce .....	34
4	Experimentálna časť .....	35
4.1	Použité humánne bunky .....	35
4.2	Použité chemikálie.....	35
4.3	Prístroje a pomôcky.....	36
4.4	Materiály použité ako vzorky .....	36
4.5	Príprava extraktov kávy.....	36
4.5.1	Extrakcia do etanolu.....	36
4.5.2	Extrakcia podľa Folcha .....	36
4.6	Všeobecná charakteristika prírodných látok .....	37
4.6.1	Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov.....	37
4.6.2	Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov.....	37
4.6.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity .....	37
4.7	Meranie UV spektra pomocou nanofotometra .....	38
4.7.1	Výpočet SPF.....	38
4.8	Stanovenie tanínov .....	38
4.9	Príprava nanočastíc z vodných extraktov metódou sonikácie.....	38
4.10	Príprava nanočastíc z olejových extraktov metódou sonikácie.....	38
4.11	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nanočastíc .....	39
4.12	Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS.....	39
4.13	Stanovenie stability častíc pomocou zeta potenciálu .....	39
4.14	Štúdium krátkodobej stability častíc .....	39
4.15	Štúdium dlhodobej stability častíc.....	39
4.16	Príprava PHB nanovlákién .....	39
4.16.1	Príprava nanovlákién pomocou forcéspinningu .....	39
4.16.2	Príprava nanovlákién pomocou elektrosponingu .....	40

4.17	Antioxidačná aktivita nanovlákien .....	40
4.18	Štúdium krátkodobej stability vlákien .....	40
4.19	Štúdium dlhodobej stability vlákien .....	40
4.20	Charakterizácia vlákien pomocou metódy FTIR–ATR .....	40
4.21	Testy cytotoxicity a genotoxicity .....	40
4.21.1	Kultivácia keratinocytov .....	40
4.21.2	MTT test .....	41
4.21.3	Stanovenie koncentrácie lipidov pomocou Stewartovej metódy .....	41
4.21.4	SOS chromotest .....	41
4.22	Príprava emulzie typu O/V a gélov .....	42
4.23	Stanovenie SPF emulzií a gélov .....	42
4.24	Stavenie stability emulzie pomocou analytickej centrifúgy .....	42
4.25	Testovanie vybraných emulzií na respondentoch .....	42
5	Výsledky a diskusia .....	44
5.1	Všeobecná charakteristika extraktov .....	44
5.1.1	Obsah polyfenolov v extraktoch .....	44
5.1.2	Obsah flavonoidov v extraktoch .....	44
5.1.3	Antioxidačná aktivita extraktov .....	45
5.1.4	Výt'aznosť olejových extraktov .....	46
5.1.5	Stanovenie SPF extraktov .....	47
5.2	Obsah tanínov .....	47
5.3	Príprava častíc .....	48
5.3.1	Enkapsulačná účinnosť .....	48
5.3.2	Veľkosť a koloidná stabilita častíc .....	49
5.3.3	Krátkodobá stabilita častíc .....	51
5.3.4	Dlhodobá stabilita častíc .....	52
5.3.5	Stanovenie SPF častíc .....	53
5.4	Príprava vlákien .....	54
5.4.1	Antioxidačná aktivita vlákien .....	54
5.4.2	Krátkodobá stabilita vlákien .....	55
5.4.3	Dlhodobá stabilita vlákien .....	57
5.4.4	Charakterizácia vlákien pomocou FTIR–ATR .....	58
5.5	MTT test .....	58
5.5.1	Cytotoxicita častíc .....	59
5.5.2	Cytotoxicita vlákien .....	63



5.6	SOS chromotest .....	63
5.7	Príprava emulzií a gélov .....	64
5.7.1	Stanovenie SPF emulzií a gélov .....	65
5.7.2	Stanovenie stability emulzií .....	66
5.7.3	Dermatologické testovanie vybraných typov emulzií .....	69
6	Záver .....	73
7	Zoznam použitej literatúry .....	76
8	Zoznam použitých skratiek a symbolov .....	86
9	Prílohy .....	87
9.1	Dotazník .....	87

## 1 ÚVOD

Elektromagnetické žiarenie, ktoré dopadá zo Slnka na zemský povrch má na ľudské zdravie nielen pozitívne, ale aj negatívne účinky. Medzi pozitívne účinky patrí napr. produkcia vitamínu D alebo zlepšenie chronických ochorení kože. Avšak čoraz diskutovanejšie sú negatívne účinky UV žiarenia. Ľudia sa voči tomuto žiareniu chránia oblečením, okuliarmi a pokrývkami hlavy, no je vhodné používať aj opaľovacie prípravky. Kozmetické produkty obsahujúce UV filtre nielenže dokážu predĺžiť dĺžku vystavenia slnečnému žiareniu, ale tiež chrániť zdravie spotrebiteľa. Dopyt po opaľovacích prípravkoch sa teda čoraz viac zvyšuje.

Prítomnosť štruktúr pripravených na princípe nanotechnologických postupov slúži nielen ako lákadlo pre spotrebiteľa pri kúpe, ale predovšetkým má významný vplyv na výrobu a samotný finálny produkt. Preto spoločnosti s kozmetickými produktmi viac a viac začleňujú do svojho portfólia výrobky s obsahom nanočastíc a nanovlákiem. Zároveň je potrebné pri vývoji týchto produktov dbať na požiadavky a preferencie spotrebiteľov. Tí uprednostňujú produkty s obsahom prírodných látok, ktoré na rozdiel od syntetických zlúčenín nezat'azujú životné prostredie. Dôvodom dôvery v prírodné látky je aj to, že mnohé z nich sa od nepamäti používajú v ľudovom liečiteľstve a ich účinky na ľudský organizmus, či už pozitívne alebo negatívne, sú overené mnohými generáciami. Zároveň je čoraz viac ľudí uvedomelých v otázke odpadov a ich postupného znižovania. Preto by mnohí spotrebiteľia ocenili produkty s pridanou hodnotou.

Príkladom takéhoto materiálu je bipolymér PHB (poly-3-hydroxybutyrát), ktorý je produkovaný baktériami, pričom ako zdroj živín môže slúžiť odpadný fritovací olej. Z tohto materiálu môžu byť vytvorené už vyššie spomenuté nanoštruktúry, pričom by sa stále jednalo o prírodný, biokompatibilný a biodegradabilný materiál. Zároveň by z PHB mohli byť vytvorené obaly týchto prípravkov, ktoré by sa jednoducho a rýchlejšie rozložili po spotrebovaní produktov a záťaž na životné prostredie by sa znížila.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Koža

Koža predstavuje najväčší samostatný orgán ľudského tela a tiež prvotnú bariéru medzi telom a vonkajším prostredím. Jej úlohou je zabezpečiť komunikáciu organizmu s okolitým prostredím a taktiež ochraňovať pred škodlivými vplyvmi prostredia, ako je napríklad UV žiarenie. Z vonkajšej strany je koža pomerne nepriepustná pre vodu, a tak bráni strate tekutín. Spolu s derivátmi kože sa podieľa na termoregulácii [1,2].

Skladba kože pozostáva z epitelovej zložky, ktorou je pokožka (epidermis). Pod ňou sa nachádza väzivová zložka zvaná zamša (dermis, corium). Po dermis nasleduje vrstva podkožného väziva (hypodermis), ktorá je tvorená riedkym kolagénovým väzivom. Úlohou hypodermis je pripájať kožu k hlbšie uloženým tkanivám [1].

Celková hrúbka kože je odlišná na rôznych častiach tela. Na základe toho delíme typ kože na tlstý a tenký. Tlstý typ sa nachádza na dlaniach a chodidlách, pričom hrúbka epidermis je v rozmedzí 400–600  $\mu\text{m}$ . Tenký typ kože pokrýva ostatné časti tela a hrúbka epidermis sa pohybuje medzi 75 až 150  $\mu\text{m}$ . V koži tenkého typu sa vyskytujú aj kožné adnexe ako vlasy a chlpy [1].

Pre klasifikáciu typu kože, ale aj pre posúdenie možného rizika rakoviny kože, bol vyvinutý tzv. Fitzpatrickov test. Koža je klasifikovaná na základe jej farby a reakcie po vystavení slnečnému žiareniu. Určenie správneho fototypu kože je dôležité, pretože rakovina kože predstavuje jednu z najrozšírenejších foriem rakoviny vo svete ako u žien, tak aj u mužov. V Tabuľka 1 sú uvedené jednotlivé typy kože a ich vlastnosti [3,4].

Tabuľka 1: Fitzpatrickova klasifikácia typov kože [4]

Typ kože	Typické vlastnosti	Reakcia na slnečné žiarenie
I	Svetlo biela koža, modré alebo orieškové oči, ryšavé alebo blond vlasy	Vždy spálená, pokožka sa neopáli
II	Svetlá pleť, modré oči	Ľahko sa spáli
III	Krémovo biela pleť	Občas mierne spálená koža
IV	Ľahko hnedá pokožka	Minimálne sa spáli
V	Hnedá koža	Spálenie kože je zriedkavé
VI	Tmavohnedá až čierna koža	Koža sa nikdy nespáli

#### 2.1.1 Epidermis

Za bariérovú funkciu kože zodpovedá predovšetkým epidermis. Predstavuje tak fyzikálnu, chemickú a imunologickú bariéru organizmu. Okrem toho spomaľuje proces transepidermálnej straty vody, pôsobí ako antimikrobiálna bariéra, ako ochrana proti UV žiareniu a plní tiež biosenzorické funkcie. Pokožka pozostáva z viacvrstvého dlaždicového rohovejúceho epitelu. Bunky vytvárajúce tento epitel, teda rohovejúce epitelové bunky, nazývame keratinocyty. V epidermis sa okrem keratinocytov nachádzajú aj melanocyty, Langerhansove a Merkelove bunky. V epidermis rozlišujeme celkovo 5 vrstiev a to: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum a stratum corneum [1,5].

#### 2.1.2 Dermis

Základom zamše je väzivové tkanivo, ktoré prepája epidermis so subkutis. Dermis významne prispieva k mechanickým vlastnostiam kože v dôsledku kolagénových a elastínových vlákien, ktoré obsahuje. Tie umožňujú vysokú úroveň deformácie a pružnosti pri naťahovaní. Hrúbka

zamše je odlišná v závislosti od umiestnenia na ľudskom tele, pričom najhrubšia je na chrbte [1,6].

Rozhranie medzi epidermis a dermis je tvorené bazálnou membránou, kde výbežky dermis, nazývané papily, zasahujú do epidermis. Úlohou papíl je privádzanie ciev bližšie k vrstvám epitelových buniek epidermis a zároveň posilňovať dermo–epidermálne spojenie. Papily sú najviac lokalizované na miestach, ktoré musia odolávať vysokému mechanickému zaťaženiu kože. V zamši rozoznávame dve vrstvy, a to stratum papillare a stratum reticulare [1].

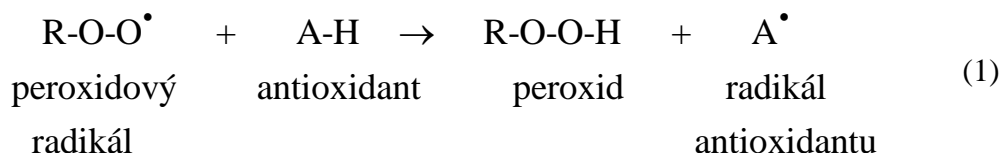
## 2.2 Charakteristika vybraných bioaktívnych zložiek prírodných látok

### 2.2.1 Antioxidanty

Sú biologické látky, ktoré chránia pred reaktívnymi druhmi kyslíka (ROS – reactive oxygen species). ROS pri vysokých koncentráciách spôsobujú poškodenie biomolekúl ako DNA, RNA, proteínov a lipidov. Tieto poškodenia vedú k vzniku patologických stavov. ROS sú prirodzene produkované živými bunkami, pričom produkcia prebieha najmä v organelách ako mitochondrie, peroxizómy, endoplazmatické retikulum. Najväčšie množstvo je vyprodukované prostredníctvom mitochondriálneho respiračného komplexu počas vysokej tvorby ATP, oxidácie mastných kyselín či v priebehu detoxikačných procesov. Zdravý systém je charakterizovaný rovnováhou medzi vyprodukovanými ROS a ich zachytávaním pomocou antioxidantov. Ak dôjde k narušeniu rovnováhy, dochádza k vzniku oxidačného stresu [7].

Antioxidanty pôsobia ako lapače pre voľné radikály a zabraňujú oxidačným reakciám, ktoré vedú k vzniku rôznych chorôb. Ďalej vykazujú protivírusové, protizápalové a protirakovinové účinky [7].

Mechanizmus účinku antioxidantov, ktorý ilustruje Rovnica 1, je založený na poskytovaní atómového vodíka k zneškodneniu ROS [8].



Radikál antioxidantu je málo reaktívny, a teda nie je schopný vyvolať ďalšiu reťazovú reakciu. Namiesto toho má tendenciu sa spájať s ďalším radikálom ( $\text{A}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ) alebo sa disproportionovať, pričom vzniká pôvodný antioxidant a odpovedajúci chinón [8].

Aj napriek ich mnohým benefítom je ich negatívom nízka stabilita pri tepelných procesoch. Ako adekvátne riešenie odstránenia tohto nedostatku je zapuzdrenie antioxidantov do nanočastíc. Enkapsulácia aktívnych látok uľahčí nasledujúce manipulácie, zvýši stabilitu, zlepši rozpustnosť vo vode, zvýši účinnosť a uvoľňovanie biologicky aktívnych látok sa stane riadené [9].

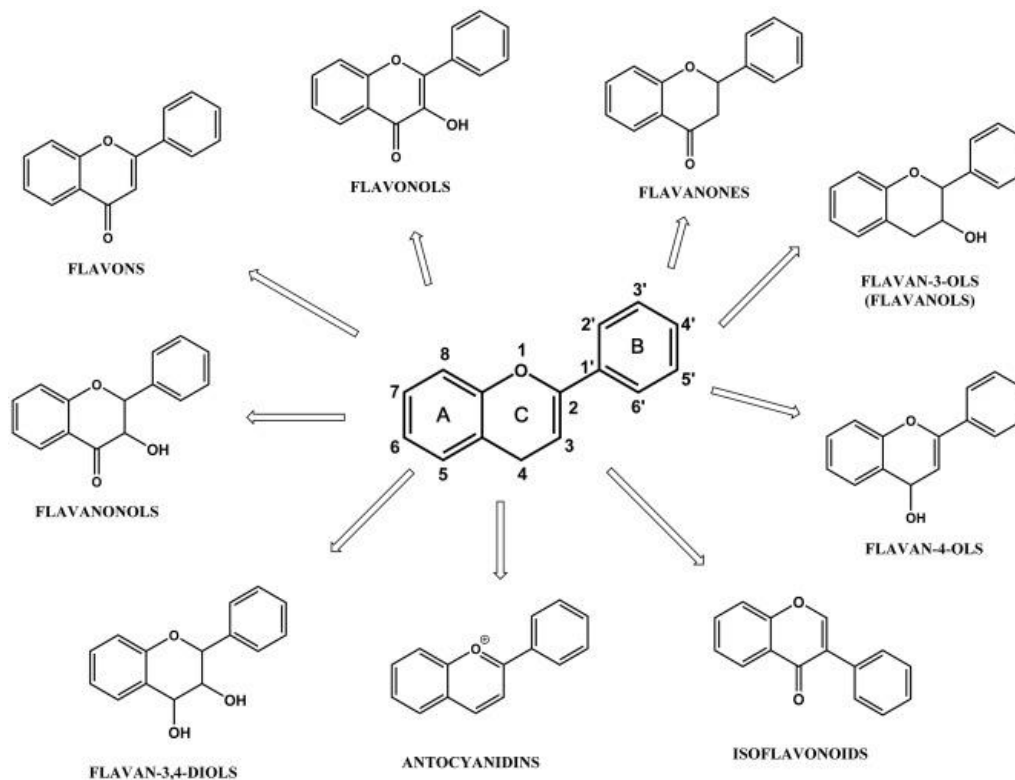
Väčšina antioxidantov je produkovaná rastlinami, a teda sa jedná o fytochemikálie [7].

### 2.2.2 Flavonoidy

Sú sekundárne polyfenolické metabolity, ktoré sa bežne nachádzajú v mnohých hubách a rastlinách [10].

Molekula obsahuje C15 flavanový cyklický skelet, ktorý pozostáva z dvoch substituovaných benzénových jadier A a B a pyranového kruhu C, ktorý je spojený s kruhom A. Za typické reakcie flavonoidov je zodpovedný heterocyklus C, ktorý obsahuje atóm kyslíka. Modifikáciou základnej štruktúry prostredníctvom rôznych druhov oxidácií alebo substituentov na C kruhu môžeme flavonoidy rozdeliť do rôznych tried [8,10].

Príkladom klasifikácie flavonoidov je členenie na základe stupňa oxidácie pyranového kruhu, ktorý je znázornený na Obrázok 1. Rozlišujeme flavany, flavanoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny a chalkony. Každá z podtried je ďalej členená [8].



Obrázok 1: Klasifikácia flavonoidov [10]

Flavonoidy majú mnoho benefitov na ľudské zdravie. Ako príklady je možné uviesť antioxidantnú aktivitu, vplyv na reguláciu hmotnosti, ochranu pred kardiovaskulárnymi ochoreniami, ochranu pred krehnutím ciev, protizápalovú aktivitu, prevenciu pred neurodegeneratívnymi ochoreniami či ochranu pred vírusovými a bakteriálnymi infekciami. Konzumácia čerstvého ovocia a zeleniny bohatých na vitamíny A, C, E,  $\beta$ -karotén a flavonoidy predstavuje ochranu proti rakovine pľúc, prs, prostaty alebo hrubého čreva. Flavonoidy sa používajú aj ako chemoterapeutické činidlá [10].

### 2.2.3 Polyfenoly

Heterogénna skupina bioaktívnych látok, ktoré sú produkované ako sekundárne metabolity rastlín. Z chemického hľadiska sem patria látky, ktoré majú vo svojej štruktúre aspoň jeden benzénový kruh, ktorý je substituovaný jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami a funkčným bočným reťazcom [11,12].

Účinok polyfenolov je založený na ich antioxidantnej a protizápalovej aktivite. Štúdie, ktoré boli vykonané in vitro na ľudských bunkových kultúrach, ako aj na zvieratách, potvrdzujú ich protektívny účinok proti chronickým ochoreniam. Z nich je možné menovať napríklad kardiovaskulárne choroby, diabetes mellitus, rakovinu, neurodegeneratívne ochorenia ako Alzheimer a Parkinson či ochorenia pľúc a pečene [11,13,14].

Bol preukázaný aj vplyv na zloženie a funkčnosť mikróflóry v tráviacom trakte, či ako prevencia pri dentálnych ochoreniach [12].

Kvalitným zdrojom polyfenolov je napríklad hrozno a červené víno [12].

## 2.2.4 Taníny

Taníny alebo tiež triesloviny, sú heterogénnou skupinou fenolických látok, ktoré sa prirodzene vyskytujú v rastlinnej ríši ako sekundárne metabolity. Ich úlohou je regulovať rast rastlín a tiež chrániť pred prípadnou konzumáciou predátorom, pretože rastlinné tkanivá, v ktorých sa nachádzajú triesloviny, sú nepožiteľné. Táto skupina látok sa rozlišuje rôznymi chemickými štruktúrami, avšak má jednu spoločnú vlastnosť, a to viazať a zrážať proteíny. Taníny sa rozdeľujú do troch skupín, ktorými sú hydrolyzovateľné taníny, kondenzované taníny a flototaníny. Prvé dve skupiny trieslovín sa vyskytujú len v suchozemských rastlinách, zatiaľ čo tretia skupina sa nachádza len v hnedých morských riasach. Bohatým zdrojom tanínov sú obilniny, liečivé rastliny, čaje, ale aj rôzne druhy ovocia ako banány, jablká, ostružiny či hrozno. Vo všeobecnosti platí, že najväčšie množstvo tanínov sa nachádza v nových listoch a kvetoch, teda v zraniteľných častiach rastliny. Jednotlivé druhy rastlín obsahujú taníny líšiace sa nielen chemickými štruktúrami, ale aj ich množstvom v rastline. Podmienkami, ktoré ovplyvňujú túto variabilitu sú napr. rôzne rastové štádiá a rastové podmienky ako je teplota, intenzita svetla dopadajúceho na rastlinu alebo dostatok živín [15,16].

## 2.3 Charakterizácia prírodných extraktov

Extrakty je možné charakterizovať prostredníctvom niekoľkých rýchlych a jednoduchých metód. Medzi obľúbené metódy patria nielen chromatografické, ale predovšetkým spektrofotometrické.

### 2.3.1 UV–VIS spektrofotometria

Predstavuje metódu, ktorej podstatou je absorpcia UV a VIS žiarenia (200–800 nm) zriedenými roztokmi molekúl. V priebehu samotného merania prechádza žiarivý tok cez kvetu so vzorkou. Prejdený žiarivý tok je ochudobnený o odrazené, rozptýlené a absorbované žiarenie. Nakoľko sa rozptyl a odraz žiarenia zanedbávajú, predpokladá sa, že za ochudobnenie žiarivého toku je zodpovedná absorpcia. Relatívnu časť prejdeného žiarenia vyjadruje transmitácia, ktorá sa udáva v percentách. Vo výpočtoch sa však zvykne používať absorbanca, čo je záporný dekadický logaritmus transmitácie. Koncentráciu zriedeného roztoku vypočítame na základe Lambert–Beerovho zákona zobrazeného Rovnicou 2, kde  $\epsilon_\lambda$  je molárny absorpčný koeficient ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  je látková koncentrácia ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a  $l$  je hrúbka absorbujúcej vrstvy (cm) [17].

$$A = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (2)$$

## 2.4 UV žiarenie

Solárne elektromagnetické spektrum je zložené zo širokého spektra lúčov, vrátane UV žiarenia. UV žiarenie sa rozdeľuje na UVA (320–400 nm), UVB (290–320 nm) a UVC (200–280 nm). UVC žiarenie, ktoré je považované za veľmi poškodzujúce, je úplne absorbované zemskou atmosférou. UV žiarenie, ktoré dosahuje zemský povrch, je UVB a UVA. UVA žiarenie je ďalej možné rozdeliť na UVA I, alebo tiež ďaleké UVA (340–400 nm), a UVA II, označované aj ako blízke UVA (320–340 nm) [18,19].

Expozícia UVA a UVB žiareniu môže byť príčinou podráždenia pokožky, spálenia, ba dokonca rakoviny kože. Ako ochrana pred nepriaznivými účinkami UV žiarenia sa používa oblečenie, okuliare a opaľovacie krémy [18,20].

UV žiarenie má okrem negatívnych účinkov aj pozitívny vplyv na ľudské zdravie. Z týchto benefitov môžeme menovať napr. produkciu vitamínu D v pokožke, ktorá je sprostredkovaná UVB žiarením, zvýšenie melanínu v pokožke pri opaľovaní, zlepšenie psoriázy a atopickej

dermatídy. Vystavenie UV žiareniu znižuje tlak a dokonca môže zlepšiť náladu pomocou uvoľnenia endorfínov [20].

## **2.5 UV filtre**

Na základe mechanizmu účinku rozdeľujeme UV filtre na chemické a fyzikálne [19]. Ideálny UV filter by mal absorbovať UVA aj UVB žiarenie, dobre prilnúť k pokožke a byť vodoodolný [18].

### **2.5.1 Chemické UV filtre**

Tento typ filtrov je široko používaný v opaľovacích prípravkoch. Z chemického hľadiska sa jedná o aromatické zlúčeniny konjugované najčastejšie s karbonylovou skupinou. Chemické UV filtre pracujú na princípe absorpcie UV žiarenia o vysokej intenzite, pričom dochádza k excitácii elektrónu zo základného stavu do excitovaného stavu. Tieto filtre môžu byť klasifikované na základe chemickej štruktúry alebo podľa ich absorpčného spektra [18,19,21].

Medzi organické UV filtre poskytujúce ochranu proti UVB žiareniu patrí napríklad PABA, oktokrylén, fenybenzimidazol-sulfónová kyselina. Filtre poskytujúce ochranu proti UVA žiareniu sú napríklad oxybenzón, dioxybenzón či avobenzón [22]

Prebiehajúce výskumy naznačujú, že ako organické UV filtre majú veľký potenciál antioxidanty [18].

Schopnosť organických UV filtrov absorbovať UVA a UVB žiarenie sa využíva aj v priemyselnej výrobe, kde sú tieto látky používané ako prísady do polymérov, z ktorých sa vyrábajú produkty ako obalové materiály, sklo, farby a lepidlá. Jedná sa o produkty, ktoré podliehajú fotodegradácii, a preto je ich potrebné chrániť pred UV žiarením [23].

Aj napriek ich rozsiahlemu používaniu v produktoch chrániacich proti UV žiareniu, boli zaznamenané ich vedľajšie účinky, ako napríklad narušenie endokrinného systému či zvýšenie rizika rakoviny pľs. Na základe toho bola v Európskej legislatíve pre kozmetické výrobky v prílohe VI upravená maximálna povolená koncentrácia organických UV filtrov vo výrobkoch osobnej starostlivosti. Povolená koncentrácia sa pohybuje v rozmedzí 4 až 10 % hm. v závislosti od typu zlúčeniny [21].

### **2.5.2 Fyzikálne UV filtre**

Fyzikálne UV filtre fungujú na princípe odrazu alebo rozptylu UV žiarenia, a to v celom rozsahu UV spektra. Medzi nechemické blokátory patria anorganické mikročastice  $\text{TiO}_2$  alebo  $\text{ZnO}$ . Oxid zinočnatý poskytuje dobrú ochranu proti UVA, zatiaľ čo oxid titaničitý zabezpečuje výbornú ochranu proti UVB. Ďalším fyzikálnym blokátorom je oxid železitý, ktorý sa vďaka červenému sfarbeniu, ktoré je podobné prirodzenému sfarbeniu kože, používa na maskovanie nepriehľadným častic  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$ . Výhodou anorganických UV flitrov je, že nedráždia pokožku, a tak sú vhodné pre deti a alergikov. Naopak nevýhodou je ich fotoreaktivita a fakt, že pre dosiahnutie požadovaného účinku je potrebné aplikovať vyššiu hustotu častíc [19,22].

## **2.6 Prírodné UV filtre**

Biologicky aktívne látky z prírodných zdrojov sú často používané v prípravkoch určených k ochrane proti slnečnému žiareniu na doplnenie fotoprotektívneho účinku syntetických zlúčenín a k zvýšeniu fotostability. Príklady takýchto prírodných látok sú uvedené v Tabuľka 3. K synergickému účinku prispievajú najmä antioxidanty zahŕňajúce predovšetkým fenoly, askorbát a tokoferoly. Tieto zlúčeniny majú schopnosť vychytávať vytvorené voľné radikály spôsobené UV žiarením v koži, a tak zabraňovať ich reakciám s proteínmi, DNA či membránovými lipidmi. [24,20].

Prírodné látky sú však čoraz viac skúmané aj ako potenciálna alternatíva syntetických organických zložiek opaľovacích prípravkov určených k topickej aplikácii. Nevýhodou týchto organických komponent je obmedzená fotostabilita a vytváranie fotoindukovaných reaktívnych druhov [25].

Zapuzdrením účinných zložiek z prírodných látok sa zvýši ich účinnosť prostredníctvom zvýšenia absorpcie alebo rozptylu UV žiarenia, zníži sa toxicita, zvýši stabilita a ich vlastnosti uvoľňovania sú regulované [25].

## 2.7 SPF

K vyjadreniu účinnosti opaľovacieho prípravku voči UVB žiareniu sa používa označenie SPF („sun protection factor“). SPF udáva pomer času potrebného na ožarovanie slnečným žiarením, kým nedôjde k vzniku erytému na pokožke, ktorá je chránená opaľovacím prípravkom k času potrebnému k vzniku erytému nechránenej pokožky [19].

Ochranu kože pred účinkami ultrafialového žiarenia znázorňuje Rovnica 3 [26].

$$\text{SPF} = \frac{\text{minimálna eryt. dávka v pokožke s ochranou}}{\text{minimálna eryt. dávka v pokožke bez ochrany}} \quad (3)$$

Jednoduchou a spoľahlivou in vitro metódou je možné stanoviť SPF. Pre výpočet sa používa Mansurova rovnica, Rovnica 4, do ktorej sú dosadené absorbancie zriedených roztokov v rozmedzí 290–320 nm s krokom 5 nm [27].

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad (4)$$

Kde CF je korekčný faktor (10), EE ( $\lambda$ ) je erytmogénny účinok žiarenia pri odpovedajúcej vlnovej dĺžke, Abs ( $\lambda$ ) je spektrofotometrická absorbanca vzorky pri odpovedajúcej vlnovej dĺžke. Hodnoty EE×I sú konštanty, ktoré zobrazuje Tabuľka 2 [28].

Tabuľka 2: Hodnoty konštant EE×I pre slnečné žiarenie s vlnovými dĺžkami 290–320 nm s krokom 5 nm [28]

$\lambda$ [nm]	290	295	300	305	310	315	320
EE×I	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0837	0,0180



Tabuľka 3: Vybrané druhy rastlín s fotoprotektívnymi účinkami [20]

Názov rastliny	Botanický názov	Používané časti rastliny	Typ zlúčeniny	Hlavný efekt	Biologický účinok
Bazalka pravá	<i>Ocimum basilicum</i>	listy	neuveденé	NF	UV absorbér
Borovica prímorská	<i>Pinus pinaster</i>	ihličie	fenolické zlúčeniny, polyfenoly, deriváty prokyanidínu	SPE	redukuje erytém kože indukovaný UVB, zachytáva voľné radikály
Broskyňa obyčajná	<i>Prunus persica</i>	kvety	kaempferolové glykozidové deriváty	SPE	inhibuje vznik poškodení vyvolaných UVB/UVC, antioxidant
Brusnica čučoriedková	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>	plody	polyfenoly, anthokyaniny	SPE	znižuje tvorbu ROS vyvolanú UV žiarením, utlmuje UVA, ktorá spôsobuje peroxidáciu membránových lipidov a intracelulárneho GSH
Citrónovník pomarančový	<i>Citrus sinensis</i>	plody	cyanidínové 3–glykozidy	A, SPE	ochraňuje pokožku pred poškodením vyvolaným UV, antioxidant
Čajovník čínsky	<i>Camellia sinensis</i>	neuveденé	polyfenoly	A, SPE	protirakovinový, protizápalový účinok, fotostabilizačná kapacita
Čeruška siata	<i>Nigella sativa L.</i>	semená	neuveденé	NF	potenciálny UV absorbér
Ďatelina lúčna	<i>Trifolium pratense</i>	neuveденé	izoflavonoidové zlúčeniny	SPE	chráni pred zápalom vyvolaným UV žiarením
Fialka trojfarebná	<i>Viola tricolor</i>	neuveденé	flavonoidy	NF	ochrana pred slnečným žiarením, SPF > 20
Gaštan jedlý	<i>Castanea sativa</i>	listy	neuveденé	A	antioxidant
Ginko dvojľaločné	<i>Ginkgo biloba</i>	zelené listy	neuveденé	A, SPE	antioxidant, znižuje počet spálení indukovaných UV žiarením

Granátovník púnsky	<i>Punica granatum</i>	plody, kôra	anthokyanidíny, hydrolizovateľné taniny	SPE	znižuje počet dimérov v pokožke indukovaných UVB
Kapara trnitá	<i>Capparis spinosa</i>	kvetné púčiky	fenolické zlúčeniny	A, SPE	antioxidant, redukuje vznik kožného erytému indukovaného UVB
Kávovník	<i>Coffea genus</i>	zelené zrníčka	lipidová frakcia	NF	UV absorbér, emolient
Nechtík lekársky	<i>Calendula officinalis</i>	kvety	polyfenoly, flavonoidy	SPE	zabraňuje oxidačnému stresu indukovaného UV žiarením
Pestrec mariánsky	<i>Silybum marianum</i>	semená	flavonolignany	A, SPE	inhibuje poškodenia vyvolané UVB, antioxidant
Plesnivec alpský	<i>Leontopodium alpinum</i>	neuveденé	deriváty luteínu	NF	UV absorbér
Púpava lekárska	<i>Taraxacum officinale</i>	listy a kvety	neuveденé	A, NF, SPE	potenciálny UV absorbér, inhibuje poškodenia vyvolané UVB, antioxidant
Ryža siata	<i>Oryza sativa</i>	ryžové otruby	GAMMA–oryzanol, inozitol, mastné kyseliny	A, SPE	antioxidant, UVA absorbér
Vinič hroznorodý	<i>Vitis vinifera</i>	semená	polyfenoly	SPE	zachytáva voľné radikály, znižuje oxidačný stres, zabraňuje lipidovej peroxidácii vyvolanej UVB a UVC
Vres obecný	<i>Calluna vulgaris</i>	celá rastlina	polyfenoly, flavonoidy	SPE	zamedzuje poškodeniam kože a pôsobí ako prevencia kožných ochorení vyvolaných UV žiarením

Vysvetlivky: Prirodzený UV filter (NF), antioxidant (A), synergické fotoprotektívne účinky (SPE)

## 2.8 Prírodné látky potenciálne obsahujúce UV filtre

### 2.8.1 Káva

Kávovník patrí do čeľade *Rubiaceae*, rod *Coffea*. Najvýznamnejšie hospodárske druhy sú *Coffea arabica*, *C. liberica* a *C. robusta*. Jedná sa o nízky strom, ktorý vo voľnej prírode dorastá do výšky 7,6 m, avšak pri komerčnom pestovaní sa udržiava vo výške 150–185 cm. To zabezpečuje jednoduchší zber a tiež optimálny tvar stromu. Kávovník sa pestuje v tropických krajinách medzi obratníkmi Raka a Kozorožca. Do tejto oblasti spadajú krajiny ako Brazília, Stredná Amerika, Západná India, Jáva, Sumatra, Etiópia, Nigéria, Libéria a Južná Arábia. Ideálna nadmorská výška pre rast kávovníka je 600–1 200 m, pričom platí, že čím je nadmorská výška vyššia, tým je aj kvalita kávy vyššia. Obmedzujúcim faktorom pri raste rastliny je neschopnosť odolávať mrazom. Preto je optimálna teplota pre pestovanie kávovníka v rozmedzí 30 až 40 °C s úhrnom zrážok 150–200 cm. Rastlina začína produkovať plody vo veku 3–5 rokov a produkcia trvá 30 až 40 rokov [29,30].

Kávové zrnká sú pri spracovaní zbavené oplodia, prípadne aj osemenia. V surovej káve sa nachádza 0,9 až 2,6 % kofeínu, 30 % ostatných látok rozpustných vo vode, 8 až 17 % tuku. Kofeín obsiahnutý v kávových zrnkách má euforizujúci účinok a uľahčuje asociáciu myšlienok. Konzumentom citlivým na srdce a krvný obeh sa odporúča požívať kávu bez kofeínu [30].

#### 2.8.1.1 Zber a fermentácia kávových bobúľ

Zrelé plody, tzv. kávové čerešne, môžu byť zbierané ručne alebo sa striasajú. Dužina sa odstraňuje najčastejšie mokrou úpravou, a to tak, že plody sa vnesú do flotačnej suspenzie. Dobré plody klesnú na dno, zatiaľ čo menej kvalitné plávajú na povrchu a dochádza k ich sťahovaniu. Následne sa kvalitné plody rozdrvia a tým dôjde k uvoľneniu hlavného podielu dužiny a osemenia. Zvyšky, ktoré aj naďalej lipnú, sú zmäkčené 1 až 2 dňovou fermentáciou v kadiach. Ďalším krokom je pranie, počas ktorého sa oddelí väčšia časť šupky semena. Na záver sa semená usušia na vzduchu alebo v mechanických sušiacich jednotkách [30].

Druhou možnosťou úpravy plodu je tzv. suchá úprava, ktorá je založená na sušení plodov na vzduchu za viacnásobného obracania. Obal, ktorý sa stane krehkým sa môže rozbiť medzi valcami. Zrná je možné zo zmesi získať preosievaním [30].

#### 2.8.1.2 Praženie zelenej kávy

Dodaná surová káva sa čistí od cudzích prímiesí ako drevo, kovové častice, kamienky a prach. Pre získanie kávovej arómy sa zrnká pražia pri atmosférickom tlaku, pričom začínajúca teplota produktu je asi 100 °C a končiaca teplota cca 200 °C. Pôsobením vnútorného tlaku vodnej pary a plynov vznikajúcich pražením sa zrnká nafúknu na dvojnásobok svojho pôvodného objemu, dôjde k uvoľneniu vonkajšej blanky a farba zrníek sa zmení na tmavohnedú. Vlastná kávová aróma vzniká karbonylamino–reakciami v priebehu Maillardovej reakcie [30].

Praženie kávy môže prebiehať kontinuálne alebo diskontinuálne. K praženiu sa používa plyn, výhrevný olej, prípadne elektrina. Samotné praženie trvá 1,5 až 10 minút a prebieha v bubnových, odstredivých alebo fluidných pražičoch [30].

Periodické praženie prebieha v panve, ktorá rotuje okolo vertikálnej osi. V dôsledku pôsobiacej odstredivej sily je káva pohýnaná po špirálovitej dráhe, kde ešte dochádza k usmerňovaniu pomocou prstencov lamiel. Pražiaci plyn sa privádza do stredu panvy a je odsávaný spod veka, čo zabezpečuje intenzívne premiešanie plynu s kávou. V závislosti od výsledného upraženia kávy sa volí množstvo kávy, teplota a čas praženia. Pokiaľ sa jedná o praženie v krátkom čase, je nutné dosiahnuť vysokú rýchlosť prúdenia na povrchu kávy. Praženie končí dávkovaným rozstrekovaním vody pri vopred zvolenej teplote alebo čase.

Potom dochádza k zníženiu rotujúcej panvy, čo vytvorí štrbinu, ktorou pražená káva padá na prstencové sito. Vďaka prísunu vonkajšieho vzduchu sa prechladená káva ochladí na teplotu okolia. Po ochladnutí sa káva z chladiaceho prstenca vyprázdňuje do odkamienkovača. Odpadové plyny použité k praženiu sú mechanicky zbavené prachu a znova zohriate v plynovej peci na požadovanú teplotu, odkiaľ sú pomocou ventilátorov opäť vháňané do panvy [30].

V priebehu kontinuálneho praženia je prívod pražiacich plynov a chladiaceho vzduchu podobný ako pri šaržovom pražení, avšak káva je dopravovaná a pražená v rotujúcom bubne. K chladeniu sa používa pásový chladič alebo princíp fluidizácie. Potom, ako je dosiahnutá konečná teplota praženého materiálu, je možné vstreknúť vodu na predchladenie, čím sa zároveň ukončí praženie. V procese kontinuálneho praženia sa na odkamienkovanie používajú šikmé kmitajúce sitá, pomocou ktorých sú ťažké cudzie predmety posúvané k hornému okraju, kde sa odstraňujú [30].

### 2.8.2 Zelená káva

Vo všeobecnosti biochemické zloženie zelených kávových zŕn ovplyvňuje senzorické vlastnosti kávy po jej upražení. Pokiaľ zrnko obsahuje vysoké množstvo trigonelínu a kyseliny 3,4-dekafenoylchinovej, je považované za vysokokvalitné. Naopak vysoké hodnoty kafoylchinónových kyselín a feruoylchinónových kyselín a ich oxidačných produktov sú spájané s nízkou kvalitou zrnka, a teda aj s horšou chuťou kávy [31].

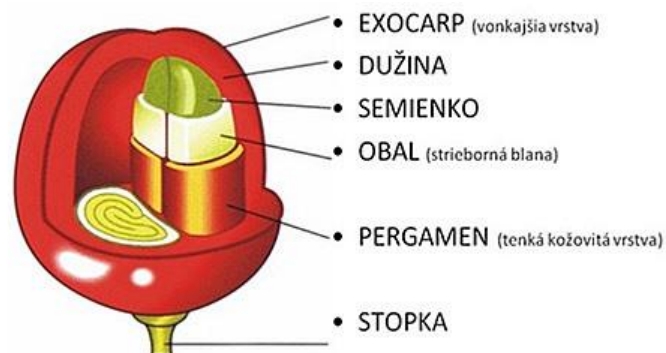
Zlúčeniny ako kyselina chlorgénová či trigonelín nielenže prispievajú k chuti kávy, ale majú taktiež antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti [31].

### 2.8.3 Cascara

Je získavaná ako vedľajší produkt pri výrobe kávy z kávovej čerešne. Kávová čerešňa zobrazená na Obrázok 2 sa skladá zo šupky (perikarp), ktorá je červenej farby. Pod ňou sa nachádza nažltlá vláknitá dužina (vonkajší mezokarp), ktorá je sladká. Dužina obaľuje tenkú vrstvu slizu, ktorá sa nazýva pektínová vrstva. Pod ňou sa nachádza pergamen (endokarp), ktorý je nasledovaný striebornou blankou. Vo vnútri čerešne je umiestnené kávové zrnko (endosperm). Ako cascara sa nazýva prvá dvojvrstva čerešne tvorená perikarpom a vonkajším mezokarpom [32].

Dužina z kávovej čerešne obsahuje značné množstvo fenolických zlúčenín, trieslovín a kofeínu, a teda pozostáva z podobných zložiek ako kávové zrnko [32].

Používa sa na prípravu stimulujúceho a osviežujúceho nápoja, ktorý má antioxidačné účinky [32].



Obrázok 2: Plod kávovníka [33]

## 2.9 Enkapsulácia

Princípom enkapsulácie je zapuzdrenie bioaktívnych zložiek do častíc. V priebehu deja dochádza k zachyteniu aktívnej látky druhou látkou, nazývanou tiež ako matrica alebo nosný materiál, ktorá pôsobí ako fyzická bariéra [34,35].

Cieľom enkapsulácie je zvýšenie stability aktívnych zložiek v priebehu spracovania, skladovania a zamedzenie nežiadúcich interakcií s kyslíkom, kyselinami alebo enzýmami. Slúži tiež ako ochrana pred svetlom, teplom a vlhkosťou [36].

Materiály používané ako matrica musia byť biologicky odbúrateľné a byť schopné vytvoriť bariéru medzi vnútornou fázou a jej okolím. Najpoužívanejšími materiálmi slúžiacimi ako matrice sú polysacharidy. Vhodné sú však aj bielkoviny a lipidy [34].

Výber vhodného polyméru pre danú bioaktívnu látku je nevyhnutný pre optimálne vlastnosti konečného produktu, pretože polyméry môžu mať rozdielnu kapacitu a účinnosť zapuzdrenia či kompatibilitu. Príkladom vhodne zvoleného kompatibilného polyméru k enkapsulácii buniek je alginát. Od materiálu, ktorý je použitý ako matrica, je teda závislá stabilita a uvoľňovanie enkapsulovaných látok [36].

Vzhľadom na rôzne fyzikálno–chemické požiadavky materiálov, ktorými sú molekulová hmotnosť, polarita alebo rozpustnosť, je nutné k zapuzdreniu použiť vhodný typ enkapsulácie. Najpoužívanejšími metódami sú vďaka ich nenáročným postupom a uplatneniu v priemyselnom meradle odparovanie rozpúšťadla a sušenie rozprašovaním. Ďalšími používanými metódami sú elektrosprejovanie, lyofilizácia, extrúzia, ktoré využívajú rôzne podmienky ako teplota, tlak, pH, rozpúšťadlá, a tak menia aj konečné vlastnosti enkapsulovaných produktov [34,36].

Enkapsulácia nachádza uplatnenie v rôznych oblastiach ako farmácia, potravinárstvo, poľnohospodárstvo, kozmetika či textilný priemysel. V potravinárskom priemysle sa používa k maskovaniu nepríjemných chutí alebo vôní, k stabilizácii zložiek potravín a k zvýšeniu ich biologickej dostupnosti [34,36].

## 2.10 Nanotechnológie v kozmetike

Jeden z prvých priemyslov, ktorý zaviedol pri vývoji produktov nanotechnologické princípy bol práve kozmetický. So zvyšujúcim sa záujmom o nanotechnológie sa museli prehodnotiť a upraviť otázky súvisiace s registráciou, označovaním, terminológiou, bezpečnosťou, životným prostredím a patentovými právami tak, aby sa týkali aj nanomateriálov. Avšak pojem nanomateriály v kozmetickom priemysle nie je vôbec jednoznačný, pretože definícia tohto pojmu sa neustále vyvíja. Pre medzinárodné zjednotenie definície bola zavedená norma ISO/TS 27687:2008. Taktiež v roku 2014 FDA vydala usmernenie, ktoré pomáha zabezpečiť jasnosť v regulačných nariadeniach FDA ohľadom nanomateriálov použitých v kozmetickom priemysle. Podľa týchto nariadení sa za nanomateriály považujú materiály, ktoré majú v rozsahu 1 až 100 nm aspoň jeden vonkajší alebo vnútorný rozmer, alebo sa v tomto rozmedzí pohybuje ich povrchová štruktúra. Za nanomateriál sa tiež považuje samotný materiál alebo konečný výrobok, ktorý vykazuje vlastnosti a javy, ktoré sa dajú pripísať jeho rozmerom [37,38].

Najpoužívanejším spôsobom použitia materiálov sú dermálne aplikácie [38]. Vo všeobecnosti sa nanomateriály v kozmetike používajú na zlepšenie dodania kozmetických prísad do pokožky. Ďalším dôvodom je zvýšenie stability účinných komponentov, ktoré by inak mohli podliehať rozkladu [37].

## 2.11 Nanočastice

Predstavujú štruktúry, ktoré majú aspoň jeden rozmer v rozsahu 1 až 100 nm [39]. Na základe ich veľkostí, tvarov a vlastností sa radia do skupín zahŕňajúcich fullerény, kovové, keramické a polymérové častice. Vzhľadom na ich veľkú plochu povrchu a malú veľkosť sa vyznačujú jedinečnými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. Ich reaktivita je daná tvarom, štruktúrou a veľkosťou. Čo sa optických vlastností týka, tie sú taktiež dané veľkosťou samotných nanočastíc, ktoré sú schopné absorbovať vo VIS oblasti. V závislosti od veľkosti vytvárajú rôzne zafarbenia koloidov [40].

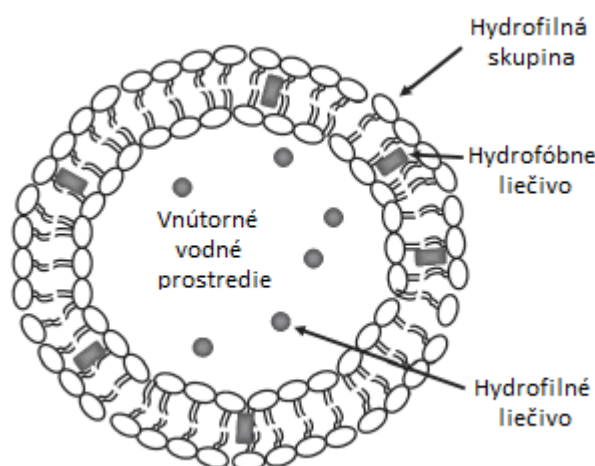
Vzhľadom na svoje vlastnosti sa stali vhodnými kandidátmi pre rôzne aplikácie. Nanočastice sa bežne využívajú v každodenne používaných prípravkoch. Typickým príkladom sú opaľovacie krémy obsahujúce nanočastice  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$ , ktoré pôsobia ako UV filtre alebo zubné pasty obsahujúce  $\text{TiO}_2$  a silikáty [41].

Ďalšie možnosti uplatnenia našli vo farmaceutických výrobkoch, elektronike a fotonike. Kvôli ich fyzikálno–chemickým vlastnostiam je nutné stanoviť ich možný toxický účinok na ľudské zdravie [39].

### 2.11.1 Lipozómy

Lipozómy sú vezikulárne útvary, ktoré sa používajú na prepravu hydrofóbných a hydrofilných látok [42]. Slovo lipozóm je odvodené z dvoch gréckych slov: Lipos, teda tuk a Soma, ktoré znamená telo [43]. V roku 1965 bol Banghamom a jeho spolupracovníkmi prvýkrát popísaný postup prípravy lipozómov hydratáciou tenkého lipidového filmu. Táto metóda sa používa aj v súčasnosti [44].

Ich štruktúra je znázornená na Obrázok 3. Membrána pozostáva z lipidovej dvojvrstvy nepriepustnej pre ióny a veľké dipóly ako sacharidy a proteíny. Na základe obmedzenej permeability sú enkapsulované látky chránené pred vplyvmi okolia. Veľkosť lipozómov sa pohybuje v rozmedzí 30 nm do niekoľkých mikrónov. Mechanizmus vzniku lipozómov je založený na hydrofilno–hydrofóbnej interakcii medzi fosfolipidmi a molekulami vody [45].



Obrázok 3: Zobrazenie štruktúry lipozómu, prevzaté a upravené z [46]

Vlastnosti fosfolipidovej dvojvrstvy sú určené rôznymi faktormi, no predovšetkým zložením materiálu, ktorý bol na ich prípravu použitý. Dôležitú úlohu zohráva štruktúra fosfolipidov, pričom nenasýtený fosfatidylcholín tvorí omnoho permeabilnejšie a menej stabilné dvojvrstvy oproti nasýteným fosfolipidom s dlhými acylovými reťazcami. Zloženie fosfolipidov sa môže v prírodných látkach značne líšiť, a to najmä v obsahu fosfatidylcholínu. Ako prírodný zdroj lecitínu sa používa predovšetkým vaječný žltok a sójové bôby [44].

Vlastnosti lipozómov ako biokompatibilita, biodegradácia a nízka toxicita z nich robia ideálne nosičové systémy pre biologicky aktívne látky s využitím v potravinárstve, kozmetike, farmaceutike či tkanivovom inžinierstve [45,47].

### **2.11.1.1 Delenie lipozómov**

Lipozómy je možné na základe veľkosti a vlastností rozdeliť do 5 skupín.

- Malé unilamelárne vezikuly (SUV)

Vezikuly tvorené jedinou lipidovou dvojvrstvou, ktorej priemer je <50 nm. Značné zakrivenie membrány spôsobuje vysoké membránové napätie, čím sa SUV líšia od iných typov lipozómov. Tento typ lipozómov je po fyzikálno–chemickej stránke nestabilný pre ich vysoký stupeň deformácie membrány. Ich použitie môže byť obmedzené nielen zvýšenou priepustnosťou membrány pre hydrofilné molekuly, ale aj zvýšenou náchylnosťou k interakciám s veľkými molekulami [48].

- Veľké unilamelárne vezikuly (LUV)

LUV sa vďaka väčšiemu priemeru (>50 nm) a nízkemu membránovému napätiu vyznačujú vyššou stabilitou. Tieto unilamelárne vezikuly obsahujú vysoký podiel vody, a teda sú vhodné ako nosiče pre hydrofilné látky [48].

- Veľké oligolamelárne vezikuly (OLV)

Vezikuly sú tvorené niekoľkými vrstvami membrán. Silná vrstva lipidov spôsobuje pomalšie uvoľňovanie enkapsulovanej látky, čo je možné využiť pre podanie vyšších dávok a predĺženie terapeutického účinku. OLV vznikajú ako vedľajšie produkty pri príprave LUV [48].

- Veľké multilamelárne vezikuly (MLV)

Jedná sa o mnohvrstvé vezikuly, ktoré obsahujú veľký počet lipidových dvojvrstiev. To spôsobuje pomalé uvoľňovanie hydrofilného liečiva. Veľkosť tohto typu lipozómov sa pohybuje v rozmedzí 100–1 000 nm. Pomer hydrofilného liečiva k lipidom v MLV je kvôli vysokému obsahu membránových lipidov pomerne nevýhodný, avšak predstavuje výhodu pre lipofilné látky [48].

- Multivezikulárne vezikuly (MVV)

Tento typ lipozómov predstavuje jedna väčšia vezikula, v ktorej je enkapsulované väčšie množstvo menších vezikúl. MVV taktiež vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe iných typov lipozómov, predovšetkým pri výrobe MLV [48].

### **2.11.2 Materiály používané na prípravu častíc**

Pre prípravu lipozómov sa používajú fosfolipidy a cholesterol. Okrem základných komponentov môžu byť pridané ďalšie zložky, ako napr. PHB.

#### **2.11.2.1 Lecitín**

Fosfatidylcholin alebo tiež lecitín, je prírodný fosfolipid nachádzajúci sa vo všetkých bunkových membránach cicavcov [49]. Bohatým zdrojom lecitínu je vaječný žltok. Ďalšou formou výroby lecitínu je rafinácia prírodných olejov, predovšetkým sójového. Takýto spôsob umožní získať lecitín z rastlinných surovín za nízke náklady [50].

#### **2.11.2.2 Cholesterol**

Cholesterol je jednou z hlavných stavebných zložiek živočíšnych plazmatických membrán, kde zabezpečuje integritu a organizáciu membrány. Zohráva tiež kľúčovú rolu pri syntéze steroidných hormónov, vitamínu D a žlčových kyselín [51]. Pri príprave nanočastíc sa používa najmä kvôli jeho schopnosti zlepšiť stabilitu lipidovej dvojvrstvy a znížiť priepustnosť vo vode rozpustných molekúl cez membránu [52].

### **2.11.2.3 Poly(3-hydroxybutyrát)**

PHB patrí do skupiny biopolymérov, ktoré sú syntetizované rôznymi druhmi baktérií. PHB je akumulovaný v podobe intracelulárnych granúl, ktoré slúžia ako rezervný zdroj energie. K syntéze dochádza v prípade, ak sú baktérie vystavené enviromentálnemu stresu a podmienkam bohatých na zdroj uhlíka, no chudobných na iné živiny [53,54,55]. PHB sa vyznačuje vysokou kryštalinitou, relatívne vysokou teplotou topenia a dobrou hydrolytickou stabilitou. Vlastnosti ako biodegradabilita a biokompatibilita z neho robia atraktívnu látku používanú v biomedicínskych aplikáciách a tkanivovom inžinierstve [54,56].

### **2.11.3 Metódy prípravy častíc**

Pre enkapsuláciu je možné použiť viacero postupov, ktoré sú však založené na rovnakom princípe. Najskôr dochádza k vytvoreniu kvapôčky aktívnej látky, ktorá je následne pomocou rozličných fyzikálno-chemických procesov obalená nosičom [57].

Správne zvolená metóda prípravy lipozómov závisí na nasledujúcich parametroch: 1) fyzikálno-chemické vlastnosti materiálu, ktorý má byť enkapsulovaný, 2) povaha prostredia, v ktorom sú lipozómy rozptýlené, 3) účinná koncentrácia enkapsulovanej látky a jej potenciálna toxicita, 4) optimálna veľkosť, 5) polydisperzita a skladovateľnosť vezikúl pre zmysluplnú aplikáciu, 6) reprodukovateľnosť a produkcia bezpečných a účinných lipozómov [43].

#### **2.11.3.1 Hydratácia lipidovej vrstvy**

V prvom kroku dochádza k rozpusteniu lipidov pomocou organického rozpúšťadla, ktoré predstavuje najčastejšie chloroform alebo chloroform:metanol. Typický lipidový roztok sa pripravuje rozpustením 10 až 20 mg lipidu na 1 ml organického rozpúšťadla. Následne dochádza k odpareniu organického rozpúšťadla pomocou rotačnej vákuovej odparky, pričom dôjde k vzniku tenkého lipidového filmu na stenách banky s guľatým dnom. Pridaním vodného média dochádza k hydratácii lipidového filmu. Miešaním prostredníctvom rotačnej odparky bez vákuua dochádza k vzniku MLV [43].

#### **2.11.3.2 Sonikácia**

Predstavuje metódu, pri ktorej sú vytvárané SUV s priemerom 15–50 nm. Proces sonikácie je možný dvomi spôsobmi, a to sonikáciou pomocou sondy a sonikáciou v kúpeli [43,58].

Pri sonikácii pomocou sondy sa používajú sonikačné prístroje so sondou, ktorých hrot dodáva lipidovej suspenzii vysokú energiu. Nevýhodou je, že dodaním vysokej energie dochádza k prehrievaniu lipidovej suspenzie, čo spôsobuje degradáciu. Ako riešenie toho problému sa používajú sonikačné prístroje s chladiacim kúpeľom. Sonikácia sa prevádza tak, že do suspenzie je ponorený hrot sondy a následne spustený ultrazvuk. Výsledkom je mierne zakalená suspenzia [43].

Ďalšou nevýhodou je prítomnosť MLV spolu so SUV, a tiež uvoľňovanie titánových častíc zo sondy do suspenzie, ktoré sa však dajú odstrániť centrifugáciou [43,58].

Pri sonikácii v kúpeli je lipidová suspenzia umiestnená vo valci, ktorý sa vloží do kúpeľového sonikátora. Výhodou je jednoduchšia kontrola teploty suspenzie v porovnaní s použitím sondy [58].

## **2.12 Charakterizácia častíc**

Častice je vhodné ďalej charakterizovať podľa rôznych kritérií. Medzi stanovované veličiny patrí veľkosť častíc, stabilita, enkapsulačná účinnosť, stanovenie obsahu fosfolipidov, stanovenie reziduálneho chloroformu [59,60]. Pre stanovenie bezpečnosti častíc je potrebné overiť aj ich cytotoxicitu [61].



### 2.12.1 Enkapsulačná účinnosť

Enkapsulačná účinnosť je definovaná ako množstvo enkapsulovanej látky v porovnaní s množstvom látky použitej na enkapsuláciu a je znázornená v Rovnici 5 [62,63].

$$\text{Enkapsulačná účinnosť}(\%) = \frac{c_{\text{celková}} - c_{\text{uvoľnená}}}{c_{\text{celková}}} \cdot 100 \quad (5)$$

Účinnosť zapuzdrenia enkapsulovaných látok je daná ich hydrofilnými a lipofilnými vlastnosťami a tiež ich tendenciou interagovať s dvojvrstvou membrány [63].

Množstvo uvoľňujúcej sa látky predstavuje vplyvajúci faktor na aktiváciu imunitných buniek po preniknutí látok cez pokožku [64].

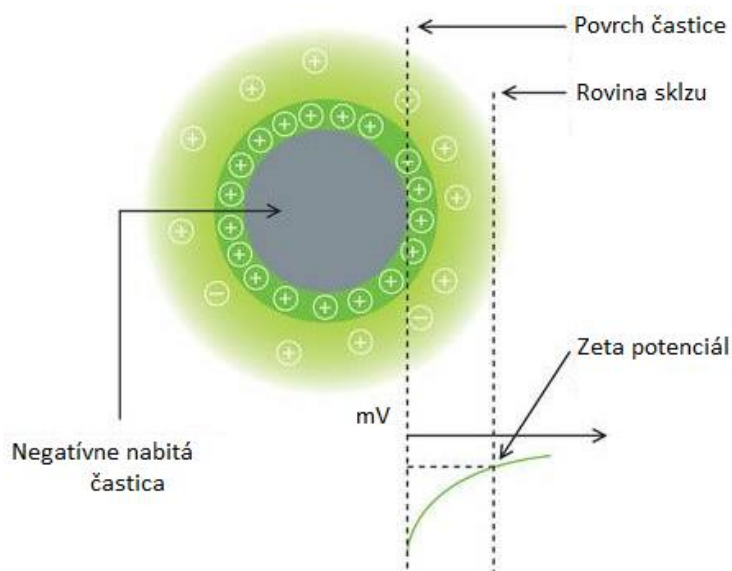
### 2.12.2 Charakterizácia častíc pomocou dynamického rozptylu svetla

Veľkosť častíc v submikrónovej oblasti je možné stanoviť pomocou metódy DLS (dynamického rozptylu svetla). Jedná sa o neinvazívnu metódu, ktorá je založená na princípe merania fluktuácie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja okolo jej priemernej hodnoty. Fluktuácie súvisia s interferenčným zoslabovaním a zosilňovaním svetla rozptýleného na nestacionárnych časticách disperznej fázy, ktoré podliehajú Brownovmu pohybu. Vo všeobecnosti platí, že čím je pohyb častíc rýchlejší, tým rýchlejšie sa mení aj intenzita rozptýleného žiarenia, a teda, že rýchlosť zmien je priamo závislá na pohybe molekuly. Následne je možné dopočítať veľkosť častíc pomocou translačného difúzneho koeficientu  $D$  pomocou Stokesovej–Einsteinovej rovnice [65].

Markantný vplyv na stanovenie veľkosti častíc má meracia kyveta. Po naplnení kyvety vzorkou by sa v nej nemali vyskytovať mikrobublinky ani prachové častice. Ich prítomnosť môže narušiť alebo prekryť signál analytu, čím dochádza k značnému skresleniu výsledkov [65].

### 2.12.3 Charakterizácia stability častíc

Stabilitu častíc je možné stanoviť na základe hodnoty zeta potenciálu, čo je potenciál nachádzajúci sa na rovine sklzu medzi časticou a združenou dvojvrstvou s obklopujúcim rozpúšťadlom, tak ako je znázornené na Obrázok 4. Veľkosť ZP vyjadruje veľkosť potenciálovej bariéry, ktorá vzniká v dôsledku odpudivých síl. Tieto sily zabraňujú priblíženiu dvoch častíc k sebe tak, aby mohli držať pohromade. Ak všetky častice v suspenzii majú vysoký negatívny alebo vysoký pozitívny ZP, tak častice sa budú navzájom odpudzovať a nebude dochádzať k agregácii. V prípade ak hodnoty ZP budú nízke, tak sa častice budú priťahovať a bude dochádzať k vytváraniu zhlukov. Za stabilné sa považujú častice, ktoré sa nachádzajú mimo intervalu +30 až -30 mV. Pokiaľ sa hodnota ZP častice nachádza v tomto intervale častice nie je možné považovať za stabilné [66].



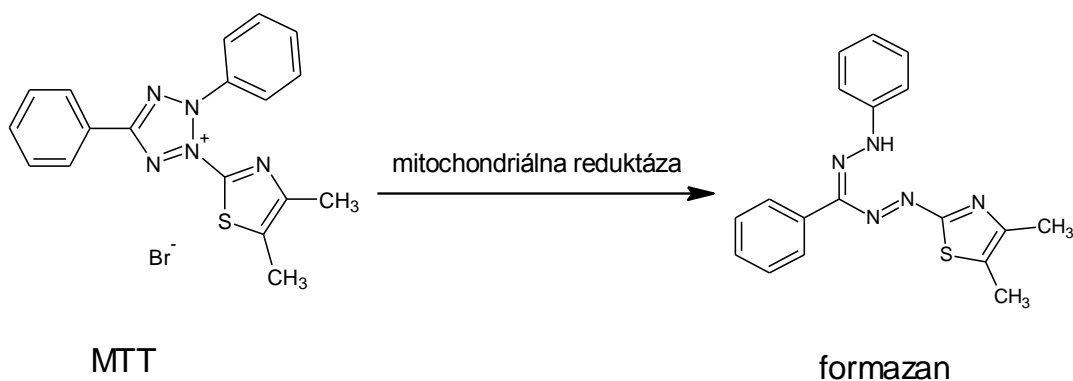
Obrázok 4: Zobrazenie negatívnej častice s jej povrchovým nábojom. Prevzaté a upravené z [67]

#### 2.12.4 Testy cytotoxicity

Systémy bunkových kultúr sú s obľubou používané v tkanivovom inžinierstve, bunkovej biológii, biochémií, pri vývoji liekov či farmakokinetických štúdiách, pretože imitujú stav in vivo [68].

In vitro testovania sa používajú aj k stanoveniu toxicity nanočastíc, čím šetria čas a náklady spojené s testovaním na zvieratách [69].

Pravdepodobne najpopulárnejšia metóda testovania cytotoxicity je tzv. MTT test, ktorý zaviedol Mosmann v roku 1983. Metóda je založená na meraní počtu životaschopných buniek. Princípom testu cytotoxicity pomocou MTT je redukcia MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenylnitroimidazoliumbromidu) na fialové kryštály formazánu, ktorý je nerozpustný vo vodných prostrediach, v ktorých sú bunky kultivované. Schématický princíp je ilustrovaný na Obrázok 5. K redukcii MTT dochádza prostredníctvom bunkovej NAD(P)H oxidoreduktázy, pričom schopnosť redukcie farbiva predstavuje mieru bunkovej metabolickej kapacity a koreluje s počtom buniek. Enzýmy, ktoré zodpovedajú za redukcii farbiva sa nachádzajú hlavne v cytoplazme, plazmatickej membráne a sú spojené s oxidačnou fosforyláciou v mitochondriách. Následne sa pridá SDS (dodecylsírán sodný), ktorý rozpustí formazánové kryštály, čím vznikne číry roztok pripravený k spektrofotometrickému stanoveniu [69,70].



Obrázok 5: Redukcia MTT na formazan, prevzaté a upravené z [71]

### 2.12.5 SOS chromotest

Pre testovanie genotoxicity sa používa SOS chromotest. Test je založený na sledovaní expresie génov indukovaných toxickými činidlami v dôsledku poškodenia DNA. Sledovaná vzorka pôsobí v priebehu testu na geneticky modifikovaný kmeň *E. coli*, ktorý je špecifický tým, že je jeho gén pre  $\beta$ -galaktozidázu spojený s promotormi reparačných génov. Metóda je teda založená na hodnotení expresie galaktozidázy exponovaných kultúr, ktorá odpovedá miere SOS odpovedi. Vyhodnotenie testu sa prevádza spektrofotometricky [72].

### 2.13 Nanovlákná

Pokroky v nanotechnológiách viedli k vytvoreniu ďalších nových materiálov, ktoré sa vyznačujú vysokou produktivitou za nízke náklady. Takýmto typom materiálu sú napr. nanovlákná [73].

Nanovlákná sú materiály, ktorých priemer sa pohybuje v jednotkách nanometrov. Vyznačujú sa veľkým povrchom k jednotke objemu, pričom platí, že plocha, ktorá je vytvorená nanovláknom závisí od priemeru vlákna. Čím je priemer vlákna menší, tým vzniká väčšia plocha povrchu. Pokiaľ je priemer nanovlákná 100 nm, dochádza k vytvoreniu špecifickej povrchovej plochy o 1 000 m<sup>2</sup>/g [74].

Pre výrobu nanovlákní s aplikáciou v medicíne a v kozmetike sa používajú najmä biologicky rozložiteľné polyméry. Do štruktúry nanovlákní môžu byť inkorporované rôzne druhy zlúčenín ako antibiotiká, protinádorové liečivá, proteíny, DNA či RNA [74].

Mechanické vlastnosti nanovlákní sú vynikajúce, za čo vďaka štruktúre netkaných vláknitých membrán a ich ultratenkosti [74].

Vďaka ich jedinečným povrchovým vlastnostiam ponúkajú široké spektrum využitia. S obľubou sa používajú ako obvazy na rany. Použitím takéhoto typu obväzu sa dosahuje rýchle a úplné zahojenie popálenín, chronických rán, a teda porovnateľne lepšie výsledky oproti bežne používaným typom obväzov. Dôležitú úlohu tu zohráva aj pórovitosť samotných vlákní, ktorá umožňuje uchytenie a proliferáciu buniek [73].

#### 2.13.1 Príprava nanovlákní pomocou elektrospinningu

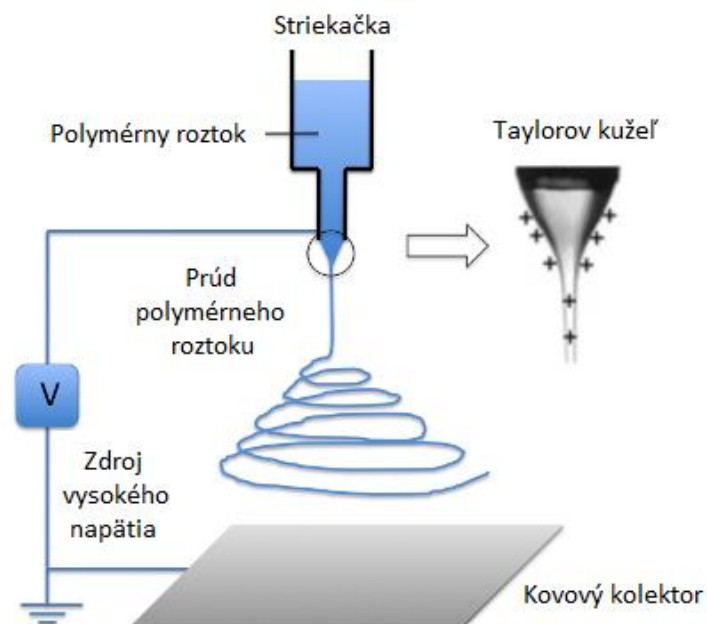
V roku 1902 Morton a Cooley vynali elektrospinningový proces, avšak až v roku 1995 Doshi a Reneker pomocou SEM (skenovacieho elektrónového mikroskopu) zistili, že sa jedná o metódu prípravy nanovlákní a navrhli ich využitie v rôznych oblastiach nevynímajúc odvetvie biomedicínskeho inžinierstva [75].

Elektrospinning predstavuje proces výroby jemných polymérnych vlákní vznikajúcich z kvapaliny prostredníctvom elektrostatickej sily. Aparatúra sa zvyčajne skladá z troch komponentov zobrazených na Obrázok 6. Jednotlivé časti aparatúry sú zdroj vysokého napätia, ihla pripojená k injekčnej striekačke a kovový kolektor. Zdroj vysokého napätia zabezpečuje prítomnosť vysokého elektrického potenciálu medzi ihlou a uzemneným kovovým kolektorom. Na začiatku procesu dochádza k vytvoreniu kvapôčky polymérneho roztoku na špičke ihly v dôsledku povrchového napätia. Po zapojení elektrického potenciálu sa kvapka začne predlžovať a postupne vzniká Taylorov kužeľ. Ďalším zvýšením elektrického potenciálu sa prekoná povrchové napätie a vytvorí sa polymérne vlákno smerom ku kovovému kolektoru. Prúd polymérneho roztoku sa odparovaním rozpúšťadla postupne skoncentruje a dopadá na kolektor v podobe pevného skupenstva [76].

Výhodou metódy je, že je možné pripraviť vlákna aj z termolabilných látok, pretože pri elektrospinningu sa nevyžaduje pôsobenie tepla [77].

Aj napriek tomu, že princíp metódy je jednoduchý, systém je citlivý na množstvo parametrov okolitého prostredia ako vlhkosť či teplota [76].

Technika umožňuje vyrábať nanovlákná z prírodných aj syntetických polymérov [74].

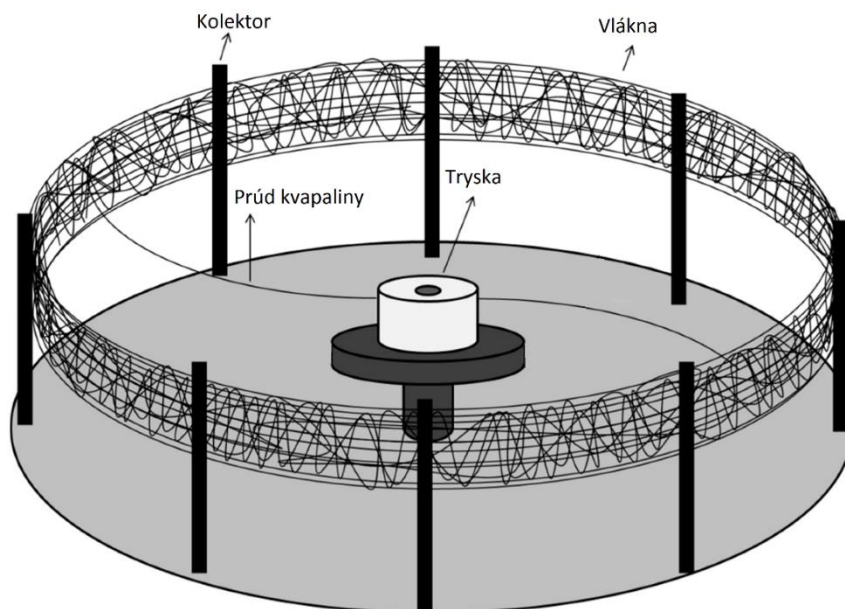


Obrázok 6: Schématické znázornenie procesu elektrosponingu. Prevzaté a upravené z [78]

### 2.13.2 Príprava nanovláknien pomocou forcesponingu

Metóda forcesponingu bola vyvinutá spoločnosťou Lozano za účelom štandardizácie priemeru vlákien, zabránenia tvorby bublín a uľahčenia výroby v makroskopickom meradle. Na rozdiel od elektrosponingu, ktorý využíva elektrostatické sily, je forcespinning založený na odstredivých silách. Schéma forcesponingu je zobrazená na Obrázok 7. Roztok polyméru je zahriaty nad teplotu topenia a následne sa privádza do zvlákňovacej trysky s mnohými otvormi. Tryska sa otáča vysokou rýchlosťou, pričom dosahuje až 20 000 ot/min. Polymér je vyháňaný cez otvory trysky vzniknutou odstredivou silou a v podobe polymérnych vlákien dopadá na kolektor. Jednou z výhod metódy je, že vodivosť či dielektrická konštanta materiálu nezohrávajú úlohu pri procese zvlákňovania, a teda sa zvyšuje spektrum použiteľných látok. Z materiálov, ktoré sa úspešne používajú na tvorbu nanovláknien je možné menovať celulózu, PA, PET, PAN, PLA, PEO, PTFE či PVDF [79,80].

Vlastnosti vznikajúcich nanovláknien je možné korigovať pomocou mnohých premenných ako rýchlosť otáčania trysky, teplota zvlákňovacej trysky a vzduchu vo vnútri zariadenia, vzdialenosť kolektora či typ polyméru a jeho koncentrácia [80].



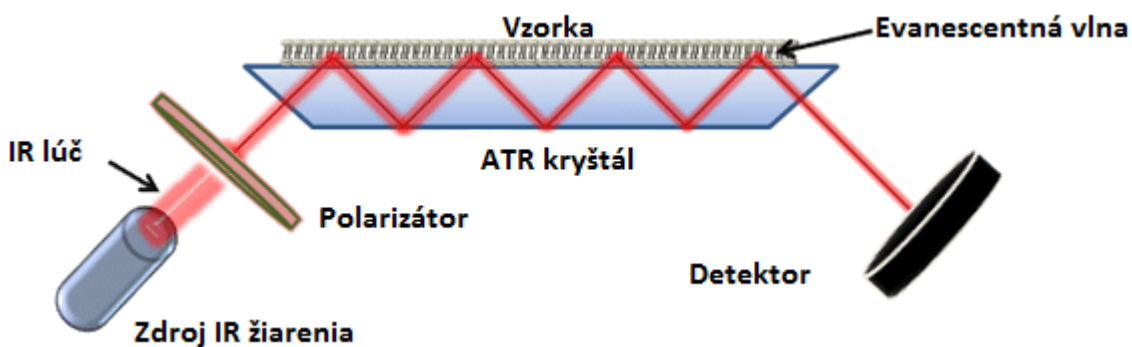
Obrázok 7: Schématické znázornenie aparatury pri forcespinning, prevzaté a upravené z [75]

### 2.13.3 Charakterizácia vlákien pomocou FTIR–ATR

Infračervená spektroskopia je nedeštruktívna analytická metóda poskytujúca informácie o zložení vzorky. Princípom metódy je interakcia IR žiarenia so študovanou látkou. Pod pojmom IR žiarenie sa rozumie elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnočtu 12 500 až  $20\text{ cm}^{-1}$  a vlnových dĺžok 800 nm až 1 mm. Pre kvantifikáciu chemickej štruktúry má význam predovšetkým stredná infračervená oblasť s vlnočtom  $4\,000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ . Energia IR fotónov vedie k zmene vibračného či rotačného stavu molekuly v závislosti od zmien dipólových momentov molekúl. Výstupom metódy je infračervené spektrum študovanej látky, ktoré znázorňuje závislosť priepustnosti (transmitácie) či absorpcie na vlnočte či vlnovej dĺžke [81].

ATR (Attenuated Total Reflection), teda technika zoslabeného úplného odrazu, je založená na jednoduchom alebo viacnásobnom úplnom odraze žiarenia a je ilustrovaná na Obrázok 8. K odrazu dochádza na fázovom rozhraní meracieho kryštálu s dostatočne vysokým indexom lomu a meranej vzorky. Na planárny kryštál lichobežníkového tvaru sa nanáša vzorka. Zväzok lúčov je pomocou sústavy zrkadiel vedený ku kryštálu tak, aby uhol dopadu na fázovom rozhraní zabezpečil úplný odraz. Prienik evanescentnej vlny (penetračná hĺbka) do povrchu vzorky je v jednotkách  $\mu\text{m}$ . Z toho vyplýva, že je možné charakterizovať len veľmi tenké povrchové vrstvy vzorky na kryštáli [81].

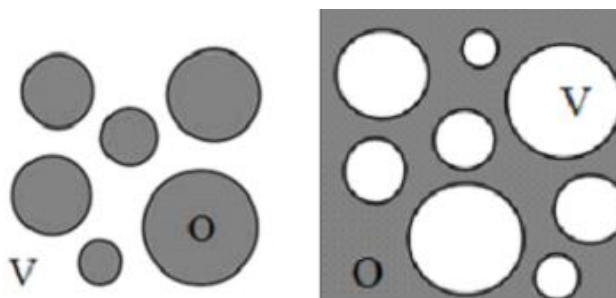
V prípade, ak vzorka absorbuje žiarenie o určitej frekvencii, tak táto zložka bude v totálne odrazenom žiarení zoslabená. Na ATR spektrum danej vzorky má vplyv vlnová dĺžka IR žiarenia, pomer indexu lomu meranej vzorky a meracieho kryštálu, uhol dopadu lúčov na fázové rozhranie a kontakt medzi vzorkou a kryštálom [81].



Obrázok 8: Princíp metódy FTIR ATR. Prevzaté a upravené z [82]

## 2.14 Emulzie

Emulzie sú, tak ako ilustruje Obrázok 9, dvojfázové systémy pozostávajúce zo vzájomne nemiešateľných alebo obmedzene miešateľných kvapalín, pričom jedna je v druhej rozdispergovaná v podobe jemných kvapôčok. Fáza, ktorá je rozptýlená vo forme jemných kvapôčok sa nazýva rozptýlená fáza. Ako kontinuálnu fázu označujeme prostredie, v ktorom sa nachádza rozptýlená fáza. Rozlišujeme dva základné typy emulzií, a to olej vo vode (O/V) a voda v oleji (V/O) [24].



Obrázok 9: Emulzia olej vo vode (vpravo), emulzia voda v oleji (vľavo). Prevzaté a upravené z [83].

Emulzie sú termodynamicky nestabilné systémy, ktoré podliehajú Brownovmu pohybu, Van der Waalsovým silám a sedimentácii. Van der Waalsove sily sa uplatňujú ako nežiadúce intermolekulárne príťažlivé sily medzi časticami čo spôsobujú ich agregáciu [24,84].

Smer sedimentácie závisí od rozdielu hustôt častíc. Častice, ktoré majú vyššiu hustotu než je hustota disperzného prostredia sa pohybujú v smere gravitačného zrýchlenia. Naopak častice, ktorých hustota je nižšia sa pohybujú proti smeru gravitačného zrýchlenia. Tento jav nazývame vyvstávanie tuku [85].

Najbežnejší spôsob stabilizácie emulzií je pridanie emulgátora do systému. Neiónové emulgátory sa vyznačujú afinitou k olejovej aj vodnej fáze emulzie, a tak zvyšujú jej stabilitu. Emulgátory je pre zvýšenie účinku možné navzájom kombinovať [24].

### 2.14.1 Hydrofilno–lipofilná rovnováha

V roku 1950 bol zavedený systém HLB, „Hydrophilic–Lipophilic Balance“. Úlohou systému je uľahčiť prípravu emulzií tak, že pomocou systému priradíme číslo ku komponentu či kombinácii komponentov, ktoré majú tvoriť olejovú fázu. Na základe získaného čísla následne určíme vhodný typ emulgátora alebo kombináciu emulgátorov. V prípade lipofilných emulgátorov je ich HLB číslo menšie ako 9,0. Hydrofilné emulgátory majú HLB číslo väčšie ako 11,0. Emulgátory, ktorých HLB číslo sa pohybuje v rozmedzí 9–11 sa označujú ako stredné. V Tabuľka 4 je uvedené použitie jednotlivých emulgátorov podľa ich HLB čísla [24,86].

Tabuľka 4: Použitie emulgátorov na základe HLB systému. Prevzaté z [86]

Rozmedzie HLB čísla	Použitie
4–6	Emulgátory pre emulzie V/O
7–9	Zmäčadlá
8–18	Emulgátor pre emulzie O/V
13–15	Detergenty
10–18	Solubilizátory

## 2.14.2 Suroviny používané na prípravu emulzie

Pre prípravu emulzií typu O/V je možné použiť nasledujúce látky:

### 2.14.2.1 Glycerín

Je priehľadná, bezfarebná látka bez zápachu. Glycerín je miesiteľný s vodou a alkoholom, čiastočne rozpustný v acetóne a v podstate nerozpustný v chloroforme. Glycerín sa používa ako rozpúšťadlo, sladidlo, zmäkčovadlo, lubrikant a konzervant. V kozmetických produktoch sa používa najmä ako humektant a tiež pre jeho protektívne vlastnosti [24].

### 2.14.2.2 Euxyl K 703

Euxyl je tekutá konzervačná látka, ktorá sa používa v kozmetickom priemysle pre výrobu produktov šetrných voči pokožke. Typickým príkladom využitia je výroba opaľovacích prípravkov. Má biostatický účinok voči širokému spektru baktérií, kvasiniek a plesní [87].

### 2.14.2.3 Cetylalkohol

Je látka používaná v kozmetických výrobkoch predovšetkým kvôli schopnosti zmäkčovať pokožku a nechty. Cetylalkohol pôsobí tiež ako emulzný stabilizátor. Pri izbovej teplote sa cetylalkohol vyskytuje v pevnom skupenstve v podobe vločiek. Používa sa na prípravu detských krémov, rúžov, šampónov, deodorantov a antiperspirantov [88].

### 2.14.2.4 Dimethikon

Polydimethylsiloxan alebo tiež dimethikon, je nepolárna látka. Pre vytvorenie emulzie s vo vode nerozpustným dimethikomom je nutná emulzifikácia za tepla. Tiež je potrebné použiť vhodný stabilizátor emulzie [24].

### 2.14.2.5 Emulgátory

Prítomnosť emulgátora ovplyvňuje distribúciu častíc v emulzii a tiež zabraňuje agregácii olejových kvapôčok, ktoré by viedli k vytvoreniu rozhrania olej–voda. Rozlišujeme 4 typy emulgátorov, a to v závislosti od ich iónových vlastností: neiónové, aniónové, kationové a amfoterné. Neiónové emulgátory sa používajú na stabilizáciu emulzií a tiež ako solubilizačné činidlá pre potravinárske výrobky a kozmetické prípravky. Aniónové emulgátory, ako napr. SDBS (dodecylbenzénsulfonát sodný) majú vlastnosť stabilizovať emulzie [89].

### 2.14.2.6 Oleje

Oleje a vosky sa používajú v rôznych kozmetických výrobkoch ako pleťové krémy, pleťové vody a v prípravkoch pre starostlivosť o pery. Uplatnenie si našli najmä kvôli ich výbornej kožnej tolerancii a ochranným vlastnostiam. V závislosti od typu kozmetického výrobku sa obsah olejov a voskov pohybuje od nízkych hodnôt zastúpenia až po takmer 100 %. Z chemického hľadiska sa jedná o nasýtené uhľovodíky, pričom dĺžka uhľovodíkového reťazca je zväčša C16 a viac. V kozmetických výrobkoch sa používajú oleje a vosky vysoko rafinované a vysoko kvalitné. Oleje a vosky používané v európskych kozmetických produktoch sú

farmaceutickej triedy v rámci špecifikácie Európskeho liekopisu a v úplnom súlade s kozmetickými predpismi Európskej únie [90].

#### **2.14.2.7 Homosalát**

Je organický UV filter, ktorý absorbuje najmä UVB žiarenie. Homosalát sa s obľubou používa na zvýšenie SPF, pričom jeho povolená koncentrácia v kozmetickom priemysle pre opaľovacie prípravky je 10 % [24].

#### **2.14.3 Suroviny používané na prípravu gélov**

Okrem vyššie zmieneného glycerínu, euxyulu K 703 a homosalátu je pri príprave gélov možné použiť nasledujúce látky.

##### **2.14.3.1 Allantoín**

Látka sa používa v prípravkoch po opaľovaní, pretože má protizápalové a antioxidačné účinky. Taktiež má schopnosť zvlhčovať pokožku, a tak zmiernovať pocit tepla a napätie, ktoré erytém vyvoláva [24].

##### **2.14.3.2 Carbomer**

Jedná sa o syntetické zahusťovadlo, ktoré sa používa na prípravu vodných gélov [24].

##### **2.14.3.3 Polysorbát**

Je viskózna kvapalina, ktorej obchodný názov je TWEEN 20. Polysorbát je neiónový detergent, ktorý sa používa ako emulgačné činidlo pre prípravu stabilných emulzií typu O/V [91].

##### **2.14.3.4 Nikotínamid**

Nazývaný aj ako niacín, teda vitamín B<sub>3</sub> sa s obľubou používa v kozmetickom priemysle, pretože zvyšuje biosyntézu lipidov, a tak posilňuje bariérovú funkciu pokožky. V kombinácii s glycerínom výrazne zlepšuje klinický stav suchej kože [24].

#### **2.14.4 Charakterizácia stability emulzie**

Emulzie majú tendenciu sa destabilizovať procesom nazývaným fázová separácia. Tá je spôsobená najmä rozdielnou hustotou hlavných komponentov. Rýchlosť oddelenia zložiek závisí od ich hustoty, viskozity, veľkosti častíc a gravitačného zrýchlenia. Prvé tri parametre je možné korigovať v procese tvorby emulzií rôznymi postupmi. Avšak pohyb častíc spôsobený gravitáciou je časovo náročný proces. Pre získanie informácií o stabilite emulzie sa preto používajú metódy, ktoré urýchľujú tento proces. Použitím analytickej centrifúgy dochádza k urýchleniu procesu separácie fáz, pričom je možné riadiť teplotu a rýchlosť odstredenia. Centrifúga tiež umožňuje presné a selektívne monitorovanie pohybu častíc cez meraciu celu v reálnom čase. Princípom metódy je zavedenie tekutej vzorky do priehľadnej meracej cely, ktorá je následne umiestnená do centrifúgy. Prenos svetla cez celu je v priebehu analýzy meraný ako funkcia času a pohybu častíc buď smerom nahor alebo nadol. Analytická centrifúga tak poskytuje informácie o rýchlosti a rozsahu sedimentácie v emulzii [84].

Vzájomný vzťah medzi rýchlosťou oddeľovania a veľkosťou častíc, hustotou fáz a ich viskozitou popisuje Stokesov vzťah znázornený v Rovnici 6 [84].

$$v_{\text{vyvstávania tuku}} = \frac{g 2r^2 (\rho_{\text{dispergovanej fáze}} - \rho_{\text{kontinuálnej fáze}})}{9\eta} \quad (6)$$

Kde  $v_{\text{vyvstávania tuku}}$  popisuje rýchlosť pohybu olejovej kvapky smerom nahor,  $g$  je gravitačné zrýchlenie,  $r$  je polomer olejovej kvapky,  $\rho$  je hustota príslušnej dispergovanej fáze (olejovej) a kontinuálnej fáze a  $\eta$  je viskozita kontinuálnej fáze [84].



Na základe rýchlosti usadzovanie v dôsledku pôsobenia odstredivej sily je následne možné odhadnúť rýchlosť separácie za štandardných skladovacích podmienok, kedy na emulziu pôsobí gravitačná sila. V prípade, že platí Stokesov zákon a závislosť je lineárna, je k odhadnutiu rýchlosti separácie fáz potrebné poznať len rýchlosť sedimentácie pri zvolenom odstredivom zrýchlení [85].

### **3 CIELE PRÁCE**

Hlavným cieľom práce bolo testovanie vhodných štruktúr a aktívnych zložiek pre prípravu prírodných UV filtrov. Za týmto účelom boli vykonané nasledujúce čiastkové kroky:

- Literárna rešerš zameraná na prehľad prírodných UV filtrov a prípravu nanomateriálov.
- Optimalizácia metód prípravy nanočastíc a nanovlákien.
- Funkcionalizácia nanoštruktúr vybraných typov prírodných UV filtrov, charakterizácia SPF faktora.
- Testovanie pripravených UV filtrov in vitro a in vivo.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité humánne bunky

Pre stanovenie cytotoxicity boli použité bunky HaCaT Human keratinocytes cell line, permanent cell line, pochádzajúce zo zdravého darcu mužského pohlavia, zo zbierky bunčných klutúr Cell Lines Service, Eppelheim (Nemecko).

### 4.2 Použité chemikálie

- Folin–Ciocalteu činidlo – p.a., LachNer (ČR)
- Uhličitan sodný – p.a., LachNer (ČR)
- Kyselina gallová – Sigma–Aldrich (SRN)
- Dusičnan sodný – p.a., LachNer (ČR)
- Chlorid hlinitý – p.a., LachNer (ČR)
- Hydroxid sodný – p.a., LachNer (ČR)
- Katechin – Sigma–Aldrich (SRN)
- Etanol – p.a., LachNer (ČR)
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid) diammonium salt) – Sigma–Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný – Sigma–Aldrich (SRN)
- Trolox – Sigma–Aldrich (SRN)
- Metanol – p.a., LachNer (ČR)
- Chloroform – VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine – for microbiology, Sigma–Aldrich (SRN)
- Cholesterol – Sigma–Aldrich (SRN)
- Polyhydroxybutyrát – HYDAL 7-12/4, FCH VUT v Brne (ČR)
- Tetraethylamonium bromide – Sigma–Aldrich (UK)
- Thiokyanatan amónny – LACHEMA, o.p., Brno
- Hexahydrát chloridu železitého – p.a., LachNer (ČR)
- Allantoin powder – ACE Trade spol. s.r.o., Ústí nad Orlicí (ČR)
- Nicotinamid – ACE Trade spol. s.r.o., Ústí nad Orlicí (ČR)
- Carbomer 980 – Sino Lion (USA)
- Polysorbát 80 – RNDr. Jan Kulich s.r.o., Hradec Králové (ČR)
- Cetylalkohol – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
- Glycerin bezvodý p.a. – LachNer (ČR)
- Dimetikon 350 cs – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
- Ercawax MB1 – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
- Vazelína biela – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
- Euxyl K 703 – Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt (DE)
- Homosalate – ACE Trade spol. s.r.o., Ústí nad Orlicí (ČR)
- DMEM with High Glucose, with 4.0 mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate – BioTech (CZ)
- Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
- MTT – Duchefa Biochemie (NL)
- Trypsin – Versene EDTA, P-Lab (CZ)
- FBS fetálne bovinné sérum – HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)

- Chlorid sodný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Antibiotic-Antomycotic 100X(Biosera), Biotech (SRN)
- Komerčný kit SOS-CHROMOTESTTM, EBPI (CAN)

Ostatné použité chemikálie boli čistoty p.a. a boli získané od bežných distribútorov.

#### 4.3 Prístroje a pomôcky

- Electric Coffee Grinder SCG 1050BK, SENCOR
- ELISA ReaderBio Tek ELx808 (USA)
- Thermo Spectronic Helios Delta (USA)
- Vortex, Vitrum, Heidolph Reax top (SRN)
- Centrifúga Boeco U–32R, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Mikro 120 Centrifuge, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Centrifuge Z36HK, LaborTechnik HERMLE (Nemecko)
- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandeline (SRN)
- Rotačná vákuová odparka RV–ML, IKA Werke (SRN)
- Rotačný zvlákňovací prístroj (prototyp)
- Pumpa New Era Pump Systems model NE–300, SpringePump (USA)
- CellCulture CO<sub>2</sub> Inkubátor, ESCO (SRN)
- Inverzný biologický mikroskop I-101 L–Scientific, Laboserv (ČR)
- Biohazard box, model Airstream, trieda II, ESCO (SRN)
- Koloidný DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (SRN)
- FTIR–ATR spektrometer Nicolet iS 50 FT–IR (USA)
- Sun Protection Diagnostic SP 37 – Courage + Khazaka Electronic GmbH (Nemecko)

#### 4.4 Materiály použité ako vzorky

- Káva pražená – Rodinná káva, Znojmo
- Káva nepražená – Rodinná káva, Znojmo
- Cascara – Coffee Cherry, Honduras San Jose

#### 4.5 Príprava extraktov kávy

##### 4.5.1 Extrakcia do etanolu

Do Erlenmeyerových baniek bolo navážené po 1 g vzoriek kávy, ktoré boli zaliate koncentračnou radou etanolu (0 až 96 % etanolu) a ponechané na trepačke k extrakcii za laboratórnej teploty po dobu cca 24 hodín. Po uplynutí doby bol supernatant zliaty, v prípade potreby boli vzorky stočené v centrifúge. Takýmto spôsobom boli pripravené vzorky praženej kávy (PK), zelenej kávy (ZK) a cascary (C).

##### 4.5.2 Extrakcia podľa Folcha

Navážka 1 g vzorky bola po rozotrení v trecej miske premiestnená do Erlenmeyerovej banky a bolo k nej pridaných 40 ml extrakčnej zmesi, Folchovo činidlo, ktoré tvorilo chloroform a metanol v pomere 2 : 1. Zmes bola ponechaná 1 hodinu na trepačke extrahovať. Následne bola zmes prefiltrovaná cez hladký filter, k tuhému podielu bolo pridaných 25 ml extrakčnej zmesi a zmes bola ponechaná ďalších 30 minút na trepačke. Po uplynutí doby bola zmes opäť prefiltrovaná. Kvapalné podiely boli spojené a bol k nim pridaný jedennásobok destilovanej

vody. Zmes bola odstredená (3 500 ot/min, 5 minút). Chloroformová vrstva bola odpipetovaná a prefiltrovaná cez bezvodý síran sodný. Filtrát bol preliaty do banky s guľatým dnom a chloroform bol odparený na vákuovej odparke. Takto pripravené extrakty boli následne rozpustené v minimálnom množstve chloroformu, prepipetované do vopred zvážených skúmaviek typu Eppendorf a chloroform bol ponechaný k odpareniu. Skúmavky boli opäť zvážené a uchovávané pri teplote  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6 Všeobecná charakteristika prírodných látok

Pri všeobecnej charakteristike vybraných prírodných látok bolo nevyhnutné stanoviť ich koncentráciu polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu. Všeobecná charakteristika bola vykonaná spektrofotometrickou metódou. Pre všeobecnú charakteristiku boli pripravené extrakty vybraných vzoriek o koncentrácii  $1\text{ g}/10\text{ ml}$ .

##### 4.6.1 Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov

K  $1\text{ ml}$  Folin-Ciocalteuovho činidla zriedeného vodou v pomere  $1 : 9$  bol pridaný  $1\text{ ml}$  vody a  $50\text{ }\mu\text{l}$  vzorky. Roztok bol premiešaný pomocou vortexu a po  $5\text{ minútach}$  bol pridaný  $1\text{ ml}$  nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Po premiešaní a  $15\text{ minútovom}$  státi bola meraná absorbancia pri  $750\text{ nm}$ . Ako kalibračný roztok bola použitá kyselina gallová v koncentračnom rozmedzí  $0,1\text{--}0,7\text{ mg/ml}$ . Koncentrácia polyfenolov vo vzorkách bola vypočítaná pomocou nasledujúcej rovnice kalibračnej krivky.

$$\begin{aligned} A &= 1,1994 \cdot c \\ R^2 &= 0,976 \end{aligned} \tag{7}$$

##### 4.6.2 Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov

Do skúmavky s  $0,5\text{ ml}$  stanovovanej vzorky bolo pridané  $1,5\text{ ml}$  destilovanej vody a  $0,2\text{ ml}$   $5\%$  roztoku  $\text{NaNO}_2$ . Obsah bol premiešaný a ponechaný  $5\text{ minút}$  stáť. Potom bolo pridané  $0,2\text{ ml}$   $10\%$  roztoku  $\text{AlCl}_3$ , obsah bol premiešaný a ponechaný  $5\text{ minút}$  stáť. Bolo pridané  $1,5\text{ ml}$  roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentrácii  $1\text{ mol/l}$  a  $1\text{ ml}$  destilovanej vody, po premiešaní bola zmes ponechaná  $15\text{ minút}$  stáť. Po uplynutí doby bola meraná absorbancia pri  $510\text{ nm}$  oproti destilovanej vode. Pre kalibráciu bol pripravený roztok katechínu v koncentračnom rozmedzí  $0,05\text{--}0,3\text{ mg/ml}$ . Katechín bol rozpúšťaný v etanole. Koncentrácia flavonoidov vo vzorkách bola vypočítaná pomocou nasledujúcej rovnice kalibračnej krivky.

$$\begin{aligned} A &= 2,6194 \cdot c \\ R^2 &= 0,9961 \end{aligned} \tag{8}$$

##### 4.6.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

ABTS bolo rozpustené v destilovanej vode na koncentráciu  $c = 7\text{ mmol/l}$ . Radikálový anión  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  bol získaný reakciou s  $2,45\text{ mmol/l}$  peroxodisíranom draselným. Roztok bol najmenej  $12\text{ hodín}$  ponechaný v tme pri laboratórnej teplote. Pred použitím bol  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  zriedený etanolom na absorbanciu približne  $A = 0,700$  pri  $\lambda = 734\text{ nm}$  oproti etanolu. Do zúženej kyvety bol napipetovaný  $1\text{ ml}$   $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , bolo pridaných  $10\text{ }\mu\text{l}$  extraktu a bol zaznamenaný pokles absorbancie v  $10\text{ minútach}$ . Blank pozostával z  $1\text{ ml}$   $\text{ABTS}^{\cdot+}$  a  $10\text{ }\mu\text{l}$  destilovanej vody. Pre kalibráciu bol pripravený roztok Troloxu v koncentračnom rozmedzí  $50\text{--}400\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Antioxidačný účinok vzoriek bol vypočítaný pomocou nasledujúcej rovnice kalibračnej krivky.

$$A = 0,0012 \cdot c \quad (9)$$

$$R^2 = 0,9883$$

#### 4.7 Meranie UV spektra pomocou nanofotometra

Bolo premerané absorpčné spektrum pre každú vzorku, a to v rozsahu 200–800 nm. Ak sa jednalo o extrakty získané pomocou Folchovej metódy, tak bol najskôr odparený chloroform a následne bola vzorka etanolom nariadená na koncentráciu 200 µg/ml a premeraná proti blanku (etanol). V prípade častíc boli vzorky rozsuspendované v destilovanej vode opäť na koncentráciu 200 µg/ml, ako blank slúžila destilovaná voda.

##### 4.7.1 Výpočet SPF

Pre výpočet SPF bolo potrebné vzorky nariediť etanolom na koncentráciu 200 µg/ml. Následne boli z nameraných spektier vybrané hodnoty absorbancií pre hodnoty vlnovej dĺžky v rozmedzí 290–320 nm s krokom 5 nm. Hodnoty boli následne použité pre výpočet SPF podľa Mansurovej rovnice uvedenej v bode 2.7.

#### 4.8 Stanovenie tanínov

Bol pripravený pufor, ktorý obsahoval 0,20 M ľadovej kyseliny octovej a 0,17 M chloridu sodného rozpustených v 250 ml destilovanej vody a jeho pH bolo upravené na hodnotu 4,9. Takto pripravený pufor bol použitý na prípravu zásobného roztoku albumínu zo slepačieho vajička o koncentrácii 1 mg/ml. Ďalej bol pripravený roztok do 250 ml odmernej banky, ktorý obsahoval 5% TEA a 1 % SDS. Ako posledný roztok bol pripravený 0,01 M chlorid železitý, ktorý bol rozpustený v 0,01 M HCl a destilovanej vode. Pre extrakciu bol použitý 50% metanol. Do centrifúgačných skúmaviek boli napipetované 2 ml roztoku albumínu a 1 ml vzorky. Obsah skúmavky bol premiešaný pomocou vortexu a uschovaný po dobu 24 hodín v chladničke. Po uplynutí požadovanej doby boli vzorky scentrifúgované pri 3 000×g po dobu 15 minút a supernatant bol zliaty. K precipitátu, ktorý sa vytvoril na dne skúmavky, boli pridané 4 ml SDS/TEA a precipitát bol rozsuspendovaný. Ďalej bol pridaný 1 ml roztoku chloridu železitého a po uplynutí 15 minút bola zmeraná absorbancia pri 510 nm. Ako blank bol použitý chlorid železitý v SDS/TEA. Pre výpočet koncentrácie tanínov bola použitá Rovnica 10.

$$A = 0,8725 \cdot c \quad (10)$$

$$R^2 = 0,9798$$

#### 4.9 Príprava nanočastíc z vodných extraktov metódou sonikácie

Bol pripravený zásobný roztok lecitínu v chloroforme o koncentrácii 100 mg na 1 ml chloroformu a zásobný roztok cholesterolu 10 mg na 0,1 ml chloroformu. Do kadičky s 10 ml destilovanej vody boli pipetované objemy zásobných roztokov, ktoré odpovedali 90 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu. V prípade nanočastíc s prídavkom PHB bol objem pipetovaného roztoku lecitínu upravený na množstvo odpovedajúce 70 mg a zvyšných 20 mg bolo nahradených odpovedajúcim množstvom 4% roztoku PHB. Takto pripravená vzorka bola sonikovaná pod tyčovým ultrazvukom po dobu 4×15 sekúnd pri intenzite 90 % za súčasného chladenia vo vodnom kúpeli. Po sonikácii bola kadička umiestnená do vodného kúpeľa na magnetickú miešačku s ohrevom a bol odparený chloroform pri teplote 50 °C za súčasného miešania.

#### 4.10 Príprava nanočastíc z olejových extraktov metódou sonikácie

Na základe navážky oleja v skúmavke typu Eppendorf bol pridaný odpovedajúci objem destilovanej vody do kadičky. Podľa navážky bol pipetovaný objem odpovedajúci 90 mg

zásobného roztoku lecitínu, 10 mg zásobného roztoku cholesterolu. V prípade nanočastíc s prídavkom PHB bol objem odpovedajúci 20 mg zo zásobného roztoku lecitínu nahradený odpovedajúcim objemom 4% roztoku PHB. Nasledujúci postup bol zhodný s postupom pri príprave nanočastíc z vodných extraktov uvedeným v bode 4.8.

#### **4.11 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nanočastíc**

Z každého typu pripravených nanočastíc bolo odpipetované po 1 ml do skúmaviek typu Eppendorf, ktoré boli odstredené na ultracentrifúge pri 11 000 rpm po dobu 60 minút. Supernatanty boli prepipetované do čistých skúmaviek typu Eppendorf a použité k stanoveniu uvoľnených polyfenolov v supernatante. Enkapsulačná účinnosť (%) bola prepočítaná ako podiel enkapsulovaných látok k celkovému množstvu látok v samotných extraktoch.

#### **4.12 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS**

Pripravené roztoky nanočastíc boli zriedené 100krát destilovanou vodou. Do kyvety bol napipetovaný 1 ml zriedených lipozómových častíc a pomocou prístroja Malvern Zetasizer ZS bola zmeraná distribúcia a priemerná hodnota veľkosti častíc.

#### **4.13 Stanovenie stability častíc pomocou zeta potenciálu**

Roztoky nanočastíc boli 100krát zriedené destilovanou vodou. Do kyvety bolo napipetované množstvo 1 ml takto zriedeného roztoku častíc a bol vložený elektródový nástavec. Následne bol pomocou prístroja Malvern Zetasizer ZS meraný ZP. Na základe nameraných hodnôt ZP bola odvodená stabilita častíc. Častice, ktorých ZP sa nachádzal mimo intervalu  $-30$  až  $+30$  mV boli považované za stabilné.

#### **4.14 Štúdium krátkodobej stability častíc**

Krátkodobá stabilita častíc bola stanovená na základe množstva uvoľnených polyfenolov v čase 0, 5, 10, 20, 30 a 60 minút v prostredí etanolu. 1 ml roztoku častíc bol scentrifugovaný pri 11 000 rpm po dobu 60 minút. Supernatant bol odpipetovaný a precipitát bol rozsuspendovaný v 1 ml 96% etanolu. Vzorka bola vždy pred odberom scentrifúgovaná pri 14 000 rpm po dobu 3 minút. Množstvo uvoľnených polyfenolov bolo stanovené podľa postupu v bode 4.6.1.

#### **4.15 Štúdium dlhodobej stability častíc**

Pre stanovenie dlhodobej stability častíc boli častice uchovávané vo vodnom prostredí pri teplote  $+4$  °C. Ich dlhodobá stabilita bola vypočítaná na základe uvoľneného množstva polyfenolov z častíc. Množstvo voľných polyfenolov v roztoku hneď po enkapsulácii bolo brané ako počiatočná hodnota, ktorá bola odpočítaná od hodnoty zmeranej po 4 týždňoch skladovania. Uvoľnené množstvo polyfenolov bolo stanovené podľa bodu 4.6.1.

#### **4.16 Príprava PHB nanovlákieň**

Pre prípravu vlákieň bol pripravený 4% zásobný roztok PHB. K odpovedajúcemu naváženému množstvu PHB bol pridaný chloroform a zmes bola umiestnená do vodného kúpeľa na magnetickej miešačke s ohrevom až do úplného rozpustenia PHB.

##### **4.16.1 Príprava nanovlákieň pomocou forcespinningu**

Zásobný roztok PHB bol pomaly prikvapkovaný do stredu rotora. V prípade vlákieň s olejovým extraktom bolo navážené množstvo olejového extraktu rozpustené v zásobnom roztoku PHB a pridané k odpovedajúcemu objemu roztoku PHB tak, aby výsledná koncentrácia oleja bola 1 mg/ml. Vzniknuté vlákna, ktoré boli zachytávané na tyčiach boli zozbierané do sterilnej Petriho misky. Vzniknuté vlákna svojou štruktúrou pripomínali vatú.

#### **4.16.2 Príprava nanovlákien pomocou elektrospinningu**

Striekačka naplnená zásobným roztokom PHB bola umiestnená do pumpy. Na koniec striekačky a tiež na kolektor boli pripevnené elektródy zdroja vysokého napätia. Striekačka bola umiestnená tak, aby vzdialenosť medzi ňou a kolektorom bol 12 cm. Prietok v pumpe bol nastavený na 6 ml/hod a bol spustený zdroj vysokého napätia (15 kV). Pri príprave vlákien s obsahom olejových extraktov bola navážka rozpustená v troche zásobného roztoku a pridaná k odpovedajúcemu množstvu roztoku PHB tak, aby výsledná koncentrácia bola 1 mg/ml. Vzniknutá textília bola tenká, pevná, no zároveň krehká.

#### **4.17 Antioxidačná aktivita nanovlákien**

Z každého typu pripravených vlákien a netkaných textílií bol vystrihnutý štvorec s plochou cca 1 cm<sup>2</sup>. Nakoľko sa hrúbka vlákien a textílií líšila boli produkty zvážené. Do skúmavky typu Eppendorf bolo napipetované 2 ml roztoku ABTS, do ktorého bolo vlákno ponorené. Po uplynutí 10 minút bol sledovaný pokles absorpcie podľa postupu uvedenom v bode 4.6.3.

#### **4.18 Štúdium krátkodobej stability vlákien**

Štúdium krátkodobej stability vlákien bolo vykonané na dvoch modelových prostrediach, voda a etanol. 1 cm<sup>2</sup> skúmaného vlákna s obsahom olejových extraktov z praženej kávy, zelenej kávy a cascary pripravených pomocou forcespinningu, bol ponorený do 2 ml vybraného prostredia. Po uplynutí doby 0, 5, 10, 20, 30 a 60 minút bolo stanovené množstvo uvoľnených polyfenolov podľa postupu v bode 4.6.1. Rovnaký postup bol zopakovaný pre 1 cm<sup>2</sup> netkanej textílie s obsahom olejových extraktov z praženej kávy, zelenej kávy a cascary pripravených pomocou elektrospinningu.

#### **4.19 Štúdium dlhodobej stability vlákien**

U pripravených vlákien, ktoré boli po dobu 1 mesiaca uchovávané za laboratórnej teploty v Petriho miskách, bola stanovená antioxidačná aktivita uvoľnených látok. Tá bola porovnaná s čerstvo pripravenými vzorkami. Antioxidačná aktivita látok uvoľnených z vlákien po mesačnom skladovaní bola stanovená podľa postupu v bode 4.6.3.

#### **4.20 Charakterizácia vlákien pomocou metódy FTIR–ATR**

Vlákná pripravené z PHB s olejovými extraktmi boli charakterizované pomocou metódy FTIR–ATR za nastavených podmienok:

- jednodrazový diamantový ATR nástavec,
- background: vzduch,
- meranie: rozlíšenie 8, priemer 64 skenov

#### **4.21 Testy cytotoxicity a genotoxicity**

##### **4.21.1 Kultivácia keratinocytov**

Kultivácia keratinocytov HaCaT prebiehala v kultivačných nádobách v kultivačnom médiu (DMEM with High Glucose, with 4.0 mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate). Nádoby boli uchovávané v kultivačnom termostate pri teplote 37 °C s 5% obsahom CO<sub>2</sub>. V priebehu výmeny média, ktoré bolo skladované v chladničke pri teplote 4 °C, bolo nutné médium najskôr ohriať, aby nedošlo k teplotnému šoku buniek. Pred samotnou výmenou média bol pod inverzným mikroskopom skontrolovaný stav buniek, ich príľnavosť ku dnu nádoby, a tiež prítomnosť kontaminácie. Do kultivačnej nádoby bolo pipetovaných 5 ml kultivačného média, pričom výmena média prebiehala za sterilných podmienok.



#### 4.21.2 MTT test

Cytotoxicita vybraných druhov častíc a vlákien bola študovaná na ľudských keratinocytoch, nakoľko pripravené nanomateriály majú potenciálne využitie v kozmetike ako UV filtre. Koncentrácie častíc, ktoré boli pre test vybrané, sa pohybovali v rozmedzí koncentrácií 2–14 %.

Najskôr bolo do jamiek v 96–jamkovej mikrotitračnej doštičky napipetovaných 100 µl bunečnej kultúry a bola ponechaná rasti v termostate po dobu 24 hodín v kultivačnom médiu.

Testované častice boli zriedené 1:1 sterilnou vodou, prefiltrované cez sterilný filter (200 nm) a kultivačným médiom zriedené na koncentráciu 2–14 %. Z takto pripravených vzoriek bolo do každej jamky pridaných 100 µl. Ako kontrola bolo použité kultivačné médium a ako negatívna kontrola bol použitý etanol.

Po 24 hodinách bolo do každej jamky pridaných 20 µl MTT, ktoré bolo rozpustené v PBS na koncentráciu 2,5 mg/ml a sterilizované mikrofiltráciou. Doštičky boli kultivované po dobu 3 hodín. Po uplynutí doby bolo do každej jamky pridaných 100 µl 10% SDS rozpusteného v PBS z dôvodu zvýšenia rozpustnosti tmavo fialových kryštálikov formazanu. Doštičky boli skladované v tme po dobu 24 hodín. Cytotoxicita bola vyhodnotená spektrofotometricky na ELISA Readeri pri použití vlnovej dĺžky 543 nm. Pre vyhodnotenie cytotoxicity boli hodnoty absorbancií porovnávané s hodnotami absorbancie blanku (kultivačné médium). V prípade, ak absorbancia vzorky klesla pod 60 % z absorbancie kontroly, bola vzorka vyhodnotená ako cytotoxická.

Pre stanovenie cytotoxicity vlákien bola použitá 6–jamková doštička. Testované vlákna boli zväžené, uschované do skúmaviek typu Eppendorf a sterilizované UV žiarením v laminárnom boxe po dobu 20 minút.

#### 4.21.3 Stanovenie koncentrácie lipidov pomocou Stewartovej metódy

Stewartova metóda bola použitá na stanovenie lipidov, ktoré v priebehu MTT testu pôsobia na keratinocyty. Do 15 ml centrifugačnej skúmavky bolo napipetovaných 50 µl roztoku častíc a 450 µl destilovanej vody. Do skúmavky boli ďalej pripipetované 2 ml roztoku ferothiokyanátu amónneho, ktorý bol zložený z 0,1 M chloridu železitého a 0,4 M thiokyanatanu amónneho. Následne boli pridané 3 ml chloroformu. Obsah skúmavky bol premiešaný pomocou vortexu po dobu 20 s a stočený na centrifúge pri otáčkach 1 000 rpm po dobu 5 minút. Pre spektrofotometrické stanovenie koncentrácie lipidov bola odobraná spodná chloroformová fáza a zmerané v sklenenej kyvete pri  $\lambda=450$  nm. Pre kalibráciu bol použitý chloroformový roztok lecitínu v koncentračnom rozmedzí 0–0,24 mg/ml. Koncentrácia lipidov vo vzorkách bola vypočítaná na základe nasledujúcej kalibračnej rovnice

$$\begin{aligned} A &= 3,8591 \cdot c \\ R^2 &= 0,9927 \end{aligned} \tag{11}$$

#### 4.21.4 SOS chromotest

Pre stanovenie genotoxicity bol použitý komerčný kit EBPI SOS–CHROMOTEST™. Postup stanovenia bol prevedený podľa doporučenia výrobcu.

Lyofilizovaná kultúra baktérií *E coli* bola kultivovaná v komerčnom živnom médiu pri 37 °C po dobu 12–16 hodín. Po uplynutí tejto doby bola kultúra zriedená novým médiom na cca 10 ml na obsorbanciu 0,08 pri  $\lambda=630$  nm.

Do jamiek mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 10 µl vzorky, ktorých koncentrácie boli 25, 12,5, 6,25 a 3,125 %. Ako pozitívna kontrola bol použitý roztok štandardného mutagénu 4-NQO (4-nitroquinolin1-oxid) v rôznych koncentráciách, pričom najvyššia bola 10 µg/ml.

Ako negatívna kontrola bola použitá voda. Následne bolo do každej jamky pridaných 100  $\mu$ l nariadenej suspenzie s bunkami a doštička bola inkubovaná po dobu 2 hodín pri teplote 37 °C.

Po inkubácii bolo do každej jamky pridaných 100  $\mu$ l lyofilizovanej alkalickej fosfatázy rozpustenej v modrom chromogénnom činidle a bola zmeraná absorbanca pri 405 a 630 nm. Potom bola mikrotitračná doštička inkubovaná 90 minút pri 37 °C, aby došlo k vyvíjaniu farby. Po 60 minútach bol do jamiek pridaných 50  $\mu$ l „stop“ roztoku. Opäť bola zmeraná absorbanca pri 405 a 630 nm.

#### **4.22 Príprava emulzie typu O/V a gélov**

Následujúci postup je pre prípravu 100 ml emulzie. Najskôr je nutné pripraviť zvlášť vodnú a zvlášť olejovú fázu. Na prípravu vodnej fáze bolo do kadičky pridaných 84,0 ml destilovanej vody, 3,0 ml 85% glycerínu (2,6 ml 100% glycerínu a 0,4 ml destilovanej vody) a 0,5 ml euxylu K 703. Pre prípravu olejovej fáze bolo do kadičky navážených 2,5 g Ercawaxu BM1, 3,0 g cetylalkoholu, 1,5 g bielej vazelíny a napipetované 4,0 ml parafínového oleja a 1,5 ml dimethikonu. Obe fáze boli zahriaté vo vodnom kúpeli na teplotu 75–80 °C. Po dosiahnutí požadovanej teploty bola k vodnej fáze za neustáleho miešania postupne pridaná olejová fáza. V priebehu miešania bola kadička so vzniknutou emulziou chladená vo vodnom kúpeli až po dobu, kým teplota emulzie bola 20 °C. Vznikuté emulzie boli uchovávané v 50 ml centrifúgačných skúmavkách pri laboratórnej teplote.

Príprava gélu prebiehala pri laboratórnej teplote. Pre prípravu 20 ml gélu bolo potrebné do kadičky navážiť 0,2 ml glycerínu, 0,02 g allantoínu, 0,18 g nikotinamidu a pridať 0,2 ml euxylu K 703, 0,2 ml polysorbátu 80 a 19 ml destilovanej vody. V prípade emulzií a gélov s časticami alebo homosalátom bolo príslušným objemom aktívnej látky nahradené množstvo z destilovanej vody. Všetky látky boli premiešané a bolo pridaných 0,2 g carbomeru. Následne bola zmes miešaná pokiaľ nevznikol gél. Gél bol uchovávaný v 50 ml centrifúgačných skúmavkách pri laboratórnej teplote.

#### **4.23 Stanovenie SPF emulzií a gélov**

10 mg emulzie bolo navážených do skúmavky typu Eppendorf a bol pridaný 1 ml etanolu. Následne boli vzorky nariadené na koncentráciu 200  $\mu$ g/ml. Boli zmerané ich absorpčné spektrá na UV–VIS spektrofotometry v rozmedzí vlnových dĺžok 290–320 nm s krokom 5 nm podľa postupu v bode 4.7.1 a vyhodnotené podľa Rovnice 4.

#### **4.24 Stavanie stability emulzie pomocou analytickej centrifúgy**

Pomocou analytickej centrifúgy bola zistená dlhodobá stabilita pripravených emulzií. Celkovo prebehli 3 stupne testovania. Najskôr bol prístroj nastavený na 2 000 rpm po dobu 3,5 hodín. Ďalším stupňom bolo nastavenie prístroja na 2 000 rpm po dobu 17 hodín. Nakoniec bol prístroj nastavený na 4 000 rpm po dobu 6 hodín. Všetky testovania prebiehali pri teplote 25 °C.

#### **4.25 Testovanie vybraných emulzií na respondentoch**

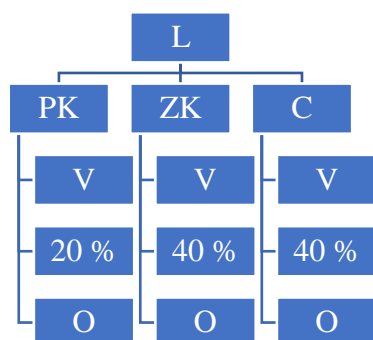
Pre testovanie emulzií boli vybrané 3 druhy emulzií, a to samotný základ (krém č. 1), emulzia s 10 % homosalátu (krém č. 2) a emulzia so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy + zakonzentrovanými prázdnyimi lipozómami s PHB + zakonzentrovanými lipozómami s PHB so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy+ 10 % homosalátu (krém č. 3).

Testovanie prebiehalo tak, že najskôr bolo respondentom stanovené SPF ich pokožky pomocou prístroja SUN PROTECTION DIAGNOSTIC SP 37, ktorý bol nastavený na čas slnenia 30 minút, na kontinentálne podnebie do nadmorskej výšky 1 000 m a na fototyp II. Po nastavení bola sonda prístroja prikladaná k pokožke, pričom bolo nutné dbať na obmedzenie prístupu svetla. Potom boli na predlaktí účastníkov pomocou filtračného papiera s rozmerom 2×5 cm

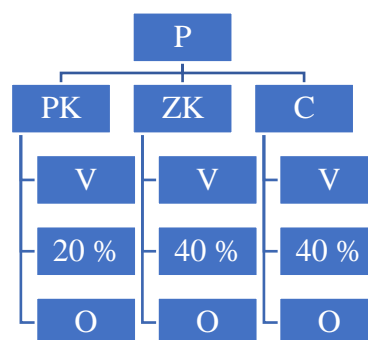
vyznačené 4 plochy, na ktoré sa následne aplikovali emulzie. Jedna z plôch slúžila ako referenčná, a teda na ňu nebol aplikovaný žiaden krém. Následne boli respondenti požiadaní o vyplnenie krátkeho dotazníka, ktorý je uvedený v Príloha 1.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci práce boli z dôvodu väčšej prehľadnosti zavedené skratky pre extrakty a častice pripravené z týchto extraktov. Extrakty sa začínajú veľkými začiatočnými pímenami daného materiálu, z ktorého bol extrakt pripravený, napr. extrakt z praženej kávy bude mať skratku PK. Ak sa jedná o vodný extrakt bude skratka vyzeráť PK–V, ak olejový tak PK–O a ak etanolový tak je tam uvedené o koľko percent etanolu išlo. Ak by bol pre prípravu extraktu použitý 20% etanol tak skratka bude mať tvar PK–20 %. V prípade, ak sa jedná o častice s enkapsulovanými extraktmi, tak je pred skratku extraktu zavedené označenie, ktoré určuje typ častice. Ak sa jedná o lipozómy, do ktorých je enkapsulovaný vodný extrakt z praženej kávy bude skratka vyzeráť L–PK–V, ak o lipozómy s PHB tak bude vyzeráť P–PK–V. Tieto skratky sú použité najmä v tabuľkách a v popisoch obrázkov. Súhrn udáva Obrázok 10 a Obrázok 11.



Obrázok 10: Súhrn členenia skratiek pre lipozómy



Obrázok 11: Súhrn členenia skratiek pre lipozómy s PHB

### 5.1 Všeobecná charakteristika extraktov

V rámci práce boli z vybraných látok pripravené vodné, etanolové a olejové extrakty. Pre extrakciu olejov bola použitá metóda podľa Folcha uvedená v kapitole 4.5.1. Príprava vodných a etanolových extraktov je uvedená v kapitole 4.5. Pripravené extrakty boli charakterizované z hľadiska celkového obsahu polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnej aktivity, a tiež bolo stanovené ich SPF. V prípade olejových extraktov bola sledovaná aj výťažnosť extrakcie.

#### 5.1.1 Obsah polyfenolov v extraktoch

Množstvo polyfenolov bolo stanovené podľa postupu uvedenom v bode 4.6.1. Koncentrácia polyfenolov v jednotlivých extraktoch bola vypočítaná na základe Rovnice 7. Meranie bolo pre každú vzorku trikrát zopakované a pre výpočet bola použitá ich priemerná hodnota. Koncentrácia polyfenolov bola prepočítaná na 1 g vzorky.

Celkový obsah polyfenolov v pripravených extraktoch je uvedený v Tabuľka 5. Najvyšší obsah polyfenolov mali extrakty z praženej kávy. Celkovo najvyšší obsah polyfenolov zo všetkých vzoriek mal olejový extrakt z praženej kávy, ktorého hodnota bola 194,07 mg/g. Z etanolových extraktov mal najviac polyfenolov 60% etanolový extrakt z praženej kávy, ktorý činil 56,11 mg/g. Z extraktov zo zelenej kávy mal najvyšší obsah 40% etanolový extrakt, a to 27,32 mg/g. Z extraktov z cascary mal najviac polyfenolov vodný extrakt, ktorého hodnota bola 45,98 mg/g.

#### 5.1.2 Obsah flavonoidov v extraktoch

Na základe postupu uvedenom v bode 4.6.2 bolo spektrofotometricky stanovené množstvo flavonoidov v extraktoch. Každý extrakt bol zmeraný trikrát a z priemeru bola vypočítaná

koncentrácia flavonoidov na základe Rovnice 8. Koncentrácia flavonoidov bola prepočítaná na 1 g vzorky.

Prehľad obsahu flavonoidov stanovených v pripravených extraktoch je uvedený v Tabuľka 5. Celkovo najvyšší obsah flavonoidov bol stanovený v olejovom extrakte z praženej kávy, ktorý bol 448,82 mg/g. Z etanolových extraktov bol najvyšší obsah flavonoidov stanovený v 60% etanolovom extrakte zo zelenej kávy, ktorý činil 35,36 mg/g. Z extraktov z praženej kávy bolo najviac flavonoidov stanovených v 40% etanolovom extrakte z praženej kávy, ktorého hodnota bola 32,50 mg/g. Z pripravených extraktov z cascary bol najvyšší obsah flavonoidov stanovený v 40% etanolovom extrakte, a to 20,00 mg/g.

### **5.1.3 Antioxidačná aktivita extraktov**

Vo všetkých typoch pripravených extraktov bola tiež stanovená antioxidačná aktivita. Stanovenie bolo prevedené podľa postupu v bode 4.6.3. Každý extrakt bol opäť premeraný trikrát a z priemeru bola po dosadení do Rovnice 9 vypočítaná koncentrácia antioxidantov. Koncentrácia antioxidantov v extraktoch bola prepočítaná na 1 g vzorky.

Prehľad obsahu stanovených antioxidantov vo vzorkách je uvedený v Tabuľka 5. Celkovo najvyšší obsah antioxidantov bol stanovený v olejovom extrakte z praženej kávy, ktorý činil 258,24 mg/g. Z etanolových extraktov bolo najviac antioxidantov stanovených v 20% etanolovom extrakte z cascary, a to 41,71 mg/g. V extraktoch z praženej kávy bolo najviac antioxidantov stanovených v 60% etanolovom extrakte, ktorý činil 28,26 mg/g. Z extraktov zo zelenej kávy mal najviac antioxidantov 20% etanolový extrakt, ktorého hodnota bola 8,48 mg/g.

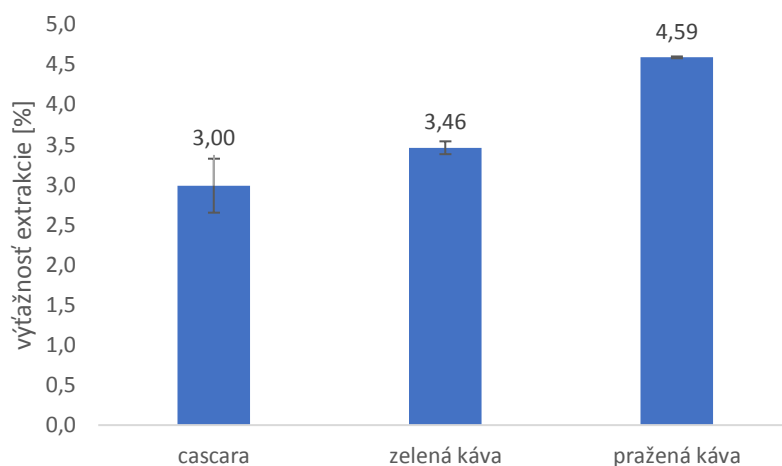
Tabuľka 5: Prehľad obsahu polyfenolov, flavonoidov a antioxidantov vo vzorkách

Extrakt		Koncentrácia polyfenolov [mg/g]	Koncentrácia flavonoidov [mg/g]	Antioxidačná aktivita [mg/g]
<b>vodné</b>	PK	41,60±0,30	26,12±0,51	20,63±0,64
<b>etanolové</b>	PK-20 %	42,85±0,65	28,38±0,81	6,26±0,34
	PK-40 %	47,82±1,05	32,50±0,33	20,37±1,16
	PK-60 %	56,11±0,50	32,45±0,39	28,26±0,30
	PK-80 %	42,15±0,15	24,67±0,79	20,93±1,63
	PK-90 %	17,22±0,45	15,44±0,16	5,49±0,17
	PK96 %	9,78±0,34	21,73±0,45	5,62±0,81
<b>olejové</b>	PK	194,07±7,05	448,82±70,54	258,24±1,96
<b>vodné</b>	ZK	18,51±1,85	28,08±1,70	5,50±0,75
<b>etanolové</b>	ZK-20 %	24,97±1,00	31,12±2,39	8,48±0,23
	ZK-40 %	27,32±0,84	33,59±0,62	6,60±0,02
	ZK-60 %	16,11±0,76	35,36±3,08	7,75±0,21
	ZK-80 %	5,41±0,33	32,01±2,09	2,17±0,29
	ZK-90 %	1,25±0,32	7,64±0,45	0,17±0,04
	ZK-96 %	0,72±0,07	7,52±0,03	0,25±0,04
<b>olejové</b>	ZK	9,94±2,82	36,39±4,32	12,87±1,39
<b>vodné</b>	C	45,98±0,35	17,69±0,41	40,96±1,21
<b>etanolové</b>	C-20 %	36,52±0,30	19,28±0,45	41,71±1,54
	C-40 %	40,48±0,85	20,00±0,92	40,88±0,71
	C-60 %	27,35±0,86	14,54±0,41	31,17±0,25
	C-80 %	9,81±0,26	6,68±0,62	15,17±0,58
	C-90 %	4,77±0,15	3,49±0,02	4,52±0,17
	C-96 %	3,15±0,05	2,50±0,13	2,65±0,11
<b>olejové</b>	C	6,77±2,32	15,30±4,69	6,41±0,78

#### 5.1.4 Výťažnosť olejových extraktov

Výťažnosť extraktov pripravených metódou podľa Folcha bola stanovená ako percento hmotnosti extraktu k pôvodnej navážke danej vzorky.

Z Obrázok 12 je zrejmé, že najvyššie percento výťažnosti bolo dosiahnuté pri praženej káve, kde výťažok činil 4,59 %. Najnižšia výťažnosť bola zaznamenaná v prípade olejového extraktu z cascary, kde bol výťažok stanovený na 3,00 % z celkovej pôvodnej navážky.



Obrázok 12: Výťažnosť extrakcie podľa Folcha

### 5.1.5 Stanovenie SPF extraktov

SPF všetkých pripravených extraktov bolo stanovené na základe postupu uvedenom v bode 4.7. Tabuľka 6 uvádza stanovené SPF pre všetky pripravené extrakty. Najvyššie SPF bolo stanovené pre 40% etanolový extrakt zo zelenej kávy s hodnotou 30,679. Veľmi podobné SPF boli stanovené pre 20% etanolový extrakt z praženej kávy a 60% etanolový extrakt zo zelenej kávy, pričom SPF týchto extraktov sa líšilo len o 0,216. Ako najlepší UV filter z extraktov z cascary bol vyhodnotený 40% etanolový extrakt s hodnotou SPF 11,954.

Tabuľka 6: Súhrn SPF extraktov

Extrakt	SPF	Extrakt	SPF	Extrakt	SPF
PK-V	11,706±0,568	ZK-V	18,747±0,199	C-V	8,590±0,243
PK-20 %	23,035±0,582	ZK-20 %	10,073±0,228	C-20 %	11,361±0,244
PK-40 %	16,144±0,902	ZK-40 %	30,679±0,318	C-40 %	11,954±0,435
PK-60 %	14,124±0,284	ZK-60 %	23,251±0,815	C-60 %	8,663±0,222
PK-80 %	12,174±0,617	ZK-80 %	6,473±0,758	C-80 %	5,320±0,322
PK-90 %	14,964±0,371	ZK-90 %	2,964±0,217	C-90 %	7,617±0,354
PK-96 %	5,354±0,048	ZK-96 %	2,835±0,125	C-96 %	5,764±0,325
PK-O	3,702±0,082	ZK-O	0,620±0,080	C-O	0,096±0,002

### 5.2 Obsah tanínov

Na základe postupu uvedenom v bode 4.8 a Rovnice 10 boli stanovené taníny v metanolových extraktoch z praženej, zelenej kávy a cascary. Najnižší obsah tanínov, tak ako uvádza Tabuľka 7, bol stanovený v extrakte zo zelenej kávy, ktorých hodnota bola 2,68 mg/g. Najvyššie množstvo tanínov bolo v extrakte z praženej kávy, ktoré predstavovalo 14,88 mg/g.

Tabuľka 7: Obsah tanínov v extraktoch

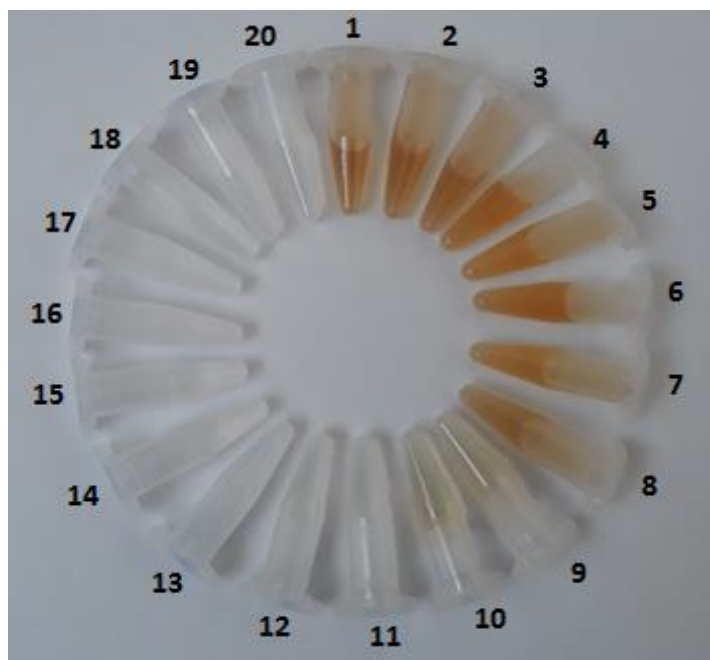
Extrakt	Obsah tanínov [mg/g]
PK	14,88±0,89
ZK	2,68±0,02
C	6,54±0,65

### 5.3 Príprava častíc

V rámci práce boli pripravené 2 druhy častíc, a to lipozómy a lipozómy kombinované s PHB podľa postupu v bode 4.9 a 4.10. Vždy boli okrem častíc s enkapsulovanými látkami pripravené aj samotné častice bez účinných látok. Spolu bolo pripravených 20 typov častíc, ktoré sú zobrazené na Obrázok 13.

Do častíc boli enkapsulované vodné, etanolové aj olejové extrakty. Etanolové extrakty boli vyberané tak, aby mali vysoký obsah polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnú aktivitu, ale najmä SPF.

U pripravených častíc bola charakterizovaná ich enkapsulačná účinnosť, veľkosť, koloidná stabilita v roztoku, krátkodobá a dlhodobá stabilita. Taktiež pomocou MTT testu bola na keratinocytoch otestovaná ich cytotoxicita.



Obrázok 13: Častice zriedené 10krát destilovanou vodou: 1. L-PK-20 %, 2. P-PK-20 %, 3. L-PK-V, 4. L-C-V, 5. L-C-40 %, 6. P-C-V, 7. P-C-40 %, 8. P-PK-V, 9. L-ZK-V, 10. P-ZK-V, 11. P-ZK-40 %, 12. L-ZK-40 %, 13. P-PK-O, 14. L-C-O, 15. L-ZK-O, 16. P-ZK-O, 17. P-C-O, 18. L-PK-O, 19. P-prázdne, 20. L-prázdne

#### 5.3.1 Enkapsulačná účinnosť

Enkapsulačná účinnosť bola stanovená ako rozdiel obsahu polyfenolov v samotnom extrakte pred enkapsuláciou a po enkapsulácii do častíc. Výsledky ilustruje Tabuľka 8. Postup pre stanovenie je uvedený v bode 4.11.

Celkovo najnižšia enkapsulačná účinnosť (%) bola dosiahnutá pri vodných extraktoch zo zelenej kávy, kde v prípade lipozómov dosiahla 15,4 % a v prípade lipozómov s PHB 12,3 %. Naopak najvyššia enkapsulačná účinnosť bola stanovená pri všetkých typoch olejových



extraktov v či už lipozómoch alebo lipozómoch s PHB, pričom sa pohybovala v rozmedzí 95,1–99,2 %.

Tabuľka 8: Enkapsulačná účinnosť pripravených druhov častíc

Typ extraktu	Lipozómy	EÚ [%]	Lipozómy s PHB	EÚ [%]
vodné	PK	41,8±0,7	PK	36,6±0,0
	ZK	15,4±2,1	ZK	12,3±1,3
	C	48,8±0,3	C	47,0±0,7
etanolové	PK–20 %	28,4±1,0	PK–20 %	32,0±0,9
	ZK–40 %	60,1±0,8	ZK–40 %	67,5±0,2
	C–40 %	28,6±0,9	C–40 %	33,8±0,8
olejové	PK	98,8±0,1	PK	99,1±0,2
	ZK	96,3±0,2	ZK	99,2±0,1
	C	92,5±0,6	C	95,1±0,9

### 5.3.2 Veľkosť a koloidná stabilita častíc

Pomocou metódy DLS na prístroji Malvern Zetasizer ZS bola stanovená veľkosť častíc, a tiež polydisperzitný index (PDI). Pracovný postup je uvedený v bode 4.12 a 4.13. Pomocou zeta potenciálu (ZP) bola stanovená koloidná stabilita častíc. Výsledky zo stanovenia veľkosti, PDI a stability častíc v dni prípravy a po uplynutí mesiaca sú prehľadne zobrazené v Tabuľka 9.

Veľkosť častíc v 1. deň sa pohybovala v rozmedzí 148,7 až 1 780,5 nm, kde najmenšia veľkosť bola stanovená pre prázdne lipozómy a najväčšia pre lipozómy so 40% etanolovým extraktom z cascary. PDI sa pohybovalo v rozmedzí 0,167–0,785, kde opäť najmenší polydisperzitný faktor bol stanovený pre prázdne lipozómy a najväčší pre lipozómy so 40% etanolovým extraktom z cascary. Väčšina častíc bola v deň prípravy považovaná za stabilné, pretože ich hodnota ZP sa nachádzala mimo intervalu -30 až 30 mV (viz kapitola 2.12.3). Na hranici stability sa pohybovali lipozómy s vodným extraktom z praženej kávy, ktorých hodnota ZP bola -28,9 mV a lipozómy s olejovým extraktom z praženej kávy, ktorých ZP bol stanovený na -29,7 mV. Naopak najvyššia hodnota ZP bola stanovená u častíc s enkapsulovaným etanolovým extraktom z cascary. Z Tabuľka 9 je zrejmé, že vyššia stabilita bola dosiahnutá u lipozómov s PHB.

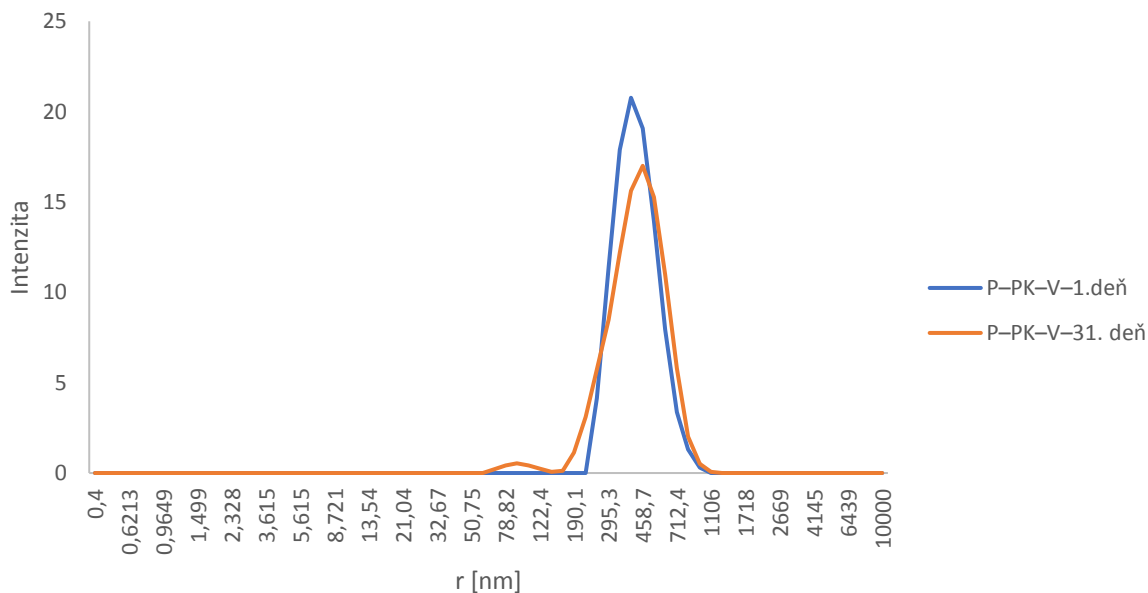
Vo všeobecnosti je možné konštatovať, že po uplynutí doby 31 dní od prípravy častíc vo väčšine z nich došlo k agregácii, čo viedlo k zvýšeniu hodnôt ZP, a teda k zníženiu stability. Aj napriek zväčšeniu priemeru častíc, ktoré viedlo k posunu veľkosti do jednotiek  $\mu\text{m}$ , je možné takéto častice použiť v kozmetickom priemysle. Naopak ich veľkosť môže byť výhodou a môžu byť použité ako abrazívne čiastočky, z ktorých sa po kontakte s pokožkou uvoľní aktívna látka, pričom má spotrebiteľ istotu, že častice nebudú prenikať do buniek. Na hranici stability sa po mesiaci pohybovali lipozómy s vodným extraktom zo zelenej kávy, ktorých ZP sa zvýšil na hodnotu -27,8 mV a lipozómy s olejovým extraktom z praženej kávy s -25,93 a z cascary s 26,3 mV. Za stabilné sa po mesiaci nedajú považovať lipozómy s vodným extraktom z praženej kávy, ktoré mali hodnotu -20,9 mV. Z Tabuľka 9 je viditeľné, že k zníženiu stability

došlo aj u lipozómov s PHB, no všetky typy častíc je aj po mesačnej dobe skladovania možné považovať za stabilné.

Tabuľka 9: Veľkosť, polydisperzita a stabilita pripravených častíc

		1. deň			31. deň		
Lipozómy		d [nm]	PdI	ZP [mV]	d [nm]	PdI	ZP [mV]
	Prázdne	148,7±0,4	0,167±0,007	-41,8±0,8	228,4±1,3	0,370±0,007	-36,0±1,7
vodné	PK	232,6±2,3	0,404±0,010	-28,9±1,1	654,1±32,2	0,867±0,074	-20,9±0,3
	ZK	202,2±7,2	0,313±0,025	-32,3±1,3	198,2±1,7	0,175±0,005	-27,8±0,5
	C	404,3±11,4	0,710±0,089	-46,1±1,0	1110,5±59,5	0,175±0,085	-42,5±1,8
etanolové	PK–20 %	1202,5±18,5	0,470±0,124	-45,7±1,8	944,5±17,1	0,464±0,102	-31,4±1,7
	ZK–40 %	794,6±14,9	0,493±0,027	-47,1±0,3	1004,5±2,5	0,523±0,032	-49,4±1,2
	C–40 %	1780,5±18,5	0,785±0,117	-54,4±0,6	4258,5±35,5	0,515±0,015	-52,2±1,1
olejové	PK	167,2±0,7	0,380±0,003	-29,7±1,1	131,4±4,6	0,337±0,013	-25,93±1,01
	ZK	180,5±0,5	0,341±0,012	-34,7±1,3	130,4±4,1	0,249±0,018	-26,3±0,9
	C	158,8±1,3	0,354±0,017	-41,8±0,8	118,5±5,2	0,220±0,019	-32,3±0,3
		1. deň			31. deň		
Lipozómy s PHB		d [nm]	PdI	ZP [mV]	d [nm]	PdI	ZP [mV]
	Prázdne	326,8±9,5	0,419±0,014	-41,9±0,6	182,9±3,3	0,397±0,034	-40,8±1,5
vodné	PK	409,1±2,1	0,219±0,009	-47,2±1,9	387,5±2,2	0,307±0,036	-36,9±0,6
	ZK	616,1±16,3	0,439±0,021	-43,7±1,2	1319,3±13,3	0,120±0,038	-48,3±0,9
	C	1333,0±47,0	0,715±0,015	-42,9±0,9	819,0±52,8	0,443±0,027	-48,1±1,9
etanolové	PK–20 %	639,8±1,0	0,561±0,052	-45,0±1,0	1031,0±23,8	0,501±0,162	-40,5±0,2
	ZK–40 %	737,3±0,1	0,471±0,077	-46,2±0,4	972,6±33,5	0,566±0,047	-47,0±0,4
	C–40 %	1780,5±18,5	0,785±0,117	-53,4±2,0	2586,5±4,5	1,000±0,000	-48,0±2,3
olejové	PK	202,1±1,1	0,212±0,023	-42,8±1,1	222,0±0,7	0,258±0,013	-41,1±1,9
	ZK	387,1±5,6	0,421±0,010	-44,7±0,6	257,3±5,0	0,253±0,012	-43,4±0,6
	C	326,8±9,5	0,419±0,014	-41,9±0,6	298,3±7,2	0,292±0,023	-40,9±0,3

Na Obrázok 14 je znázornená ukážka pre porovnanie veľkosti častíc v deň prípravy a po 31 dňovom skladovaní. Obrázok 14 znázorňuje lipozómy s PHB s vodným extraktom z praženej kávy. Po uplynutí mesiaca došlo k agregácii častíc, a teda k zvýšeniu veľkosti.



Obrázok 14: Porovnanie veľkosti častíc v 1. deň a v 31. deň pre lipozómi s PHB s vodným extraktom z praženej kávy

### 5.3.3 Krátkodobá stabilita častíc

Krátkodobá stabilita častíc bola stanovená v etanolovom prostredí podľa postupu v bode 4.14. Na základe množstva uvoľnených polyfenolov v jednotlivých odberových časoch, ktoré sú uvedené v Tabuľka 10 môžeme konštatovať, že k uvoľneniu polyfenolov došlo už hneď po pridaní modelového prostredia k časticiam. S narastajúcim časom narastalo aj percento uvoľnených polyfenolov. Celkovo najvyššie množstvo uvoľnených polyfenolov bolo stanovené u častíc s obsahom vodného extraktu zo zelenej kávy, ktoré v prípade lipozómov predstavovalo 75,40 % a v prípade lipozómov s PHB 97,97 %. Taktiež u olejových extraktov bol zaznamenaný mierny nárast uvoľnenia polyfenolov z lipozómov s PHB oproti lipozómom. V prípade olejového extraktu z praženej kávy predstavoval tento nárast zvýšenie o 0,05 % a v prípade olejového extraktu zo zelenej kávy o 1,72 %. Okrem týchto výnimiek môžeme konštatovať, že prídavok PHB znížil množstvo uvoľnených polyfenolov v rovnakom časovom úseku v porovnaní s lipozómami bez PHB.

Tabuľka 10: Krátkodobá stabilita častíc v modelovom prostredí etanol

Množstvo uvoľnených polyfenolov [%]							
lipozómy		0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
vodné	PK	30,60±1,01	34,21±1,75	37,24±1,01	37,27±0,74	39,86±0,22	41,00±1,48
	ZK	56,06±3,63	67,25±0,67	72,73±5,11	73,26±2,11	74,87±5,22	75,40±2,62
	C	9,94±0,84	10,84±0,66	10,54±0,65	10,76±0,80	11,30±0,45	11,57±1,09
etanolové	PK-20 %	22,18±1,55	23,48±0,93	23,99±1,65	24,67±1,92	24,90±2,39	26,53±2,20
	ZK-40 %	13,72±0,89	15,44±1,31	17,89±1,29	18,56±1,44	18,75±0,48	18,93±0,30
	C-40 %	20,40±1,62	25,16±1,66	26,96±1,70	27,92±1,84	29,36±1,92	30,49±3,24
olejové	PK	1,14±0,14	1,85±0,06	1,87±0,18	1,98±0,04	2,03±0,14	2,13±0,11
	ZK	5,00±0,24	7,45±0,48	7,64±1,06	7,83±0,48	7,87±0,56	8,61±0,10
	C	6,16±0,62	15,72±0,25	15,97±0,50	16,23±0,75	17,72±0,25	18,22±0,75
Lipozómy s PHB		0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
vodné	PK	28,96±1,13	30,81±2,57	32,32±2,61	34,59±2,30	34,81±1,66	38,71±0,03
	ZK	59,46±0,58	85,92±7,73	86,88±7,60	95,44±0,85	96,57±0,85	97,97±0,85
	C	7,27±0,25	8,24±0,76	8,41±0,15	9,83±0,64	9,88±0,02	9,93±0,06
etanolové	PK-20 %	2,65±0,57	4,05±0,06	4,32±0,03	4,44±0,57	4,98±0,87	5,01±0,49
	ZK-40 %	5,32±0,56	12,61±1,02	13,86±0,84	15,35±0,66	15,49±0,96	15,90±0,85
	C-40 %	3,54±0,66	9,50±1,21	10,37±0,62	11,81±0,50	13,53±1,62	14,95±0,03
olejové	PK	1,02±0,07	1,72±0,02	1,83±0,13	1,90±0,11	2,11±0,09	2,18±0,07
	ZK	4,79±1,45	6,79±0,47	8,08±0,23	8,83±0,15	9,36±0,66	10,33±0,85
	C	2,18±0,25	7,85±0,73	10,28±1,21	12,38±0,24	14,24±0,00	15,05±0,73

### 5.3.4 Dlhodobá stabilita častíc

Dlhodobá stabilita častíc bola stanovená po 4 týždňoch skladovania na základe postupu uvedenom v bode 4.15 a je zhrnutá v Tabuľka 11. Celkovo k najvyššiemu množstvu uvoľnených polyfenolov po mesačnom skladovaní došlo u oboch typov častíc s obsahom vodných a etanolových extraktov zo zelenej kávy. Najvyššia stabilita enkapsulovaných polyfenolov bola stanovená u oboch typov častíc s obsahom vodného extraktu z cascary. Záporné hodnoty, ktoré sa týkajú olejových extraktov naznačujú, že počas skladovania nedošlo k uvoľneniu polyfenolov z častíc, ale len k degradácii už voľných polyfenolov. Dôvodom mohla byť väčšia schopnosť olejových extraktov enkapsulovať sa do častíc, a teda nižšia tendencia styku olejových extraktov s rozpúšťadlom. Na základe toho mohlo pri štúdiu

dlhodobej stability dôjst' k stanoveniu polyfenolov v roztoku, ktoré v priebehu enkapsulácie neboli zapuzdrené.

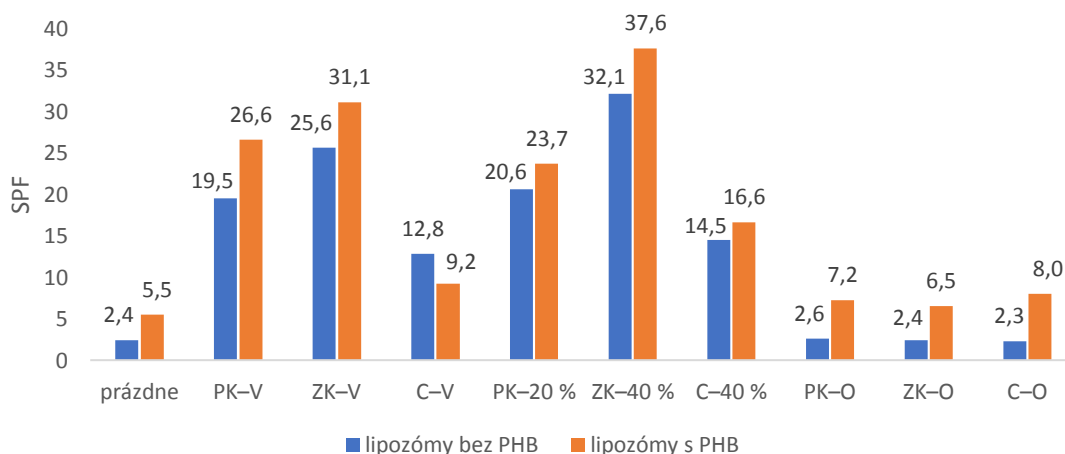
Tabuľka 11: Dlhodobá stabilita častíc vo vodnom prostredí

Extrakt	Lipozómy	Množstvo uvoľnených polyfenolov [%]	Lipozómy s PHB	Množstvo uvoľnených polyfenolov [%]
vodný	PK	53,0±0,0	PK	33,5±1,0
	ZK	98,2±0,0	ZK	76,3±2,5
	C	27,0±1,4	C	25,1±1,6
etanolový	PK-20 %	53,4±0,3	PK-20 %	52,8±1,8
	ZK-40 %	92,3±1,5	ZK-40 %	99,8±4,1
	C-40 %	48,5±1,1	C-40 %	37,1±2,1
olejový	PK	-0,6±0,1	PK	-3,0±0,1
	ZK	-1,1±0,2	ZK	-13,2±0,3
	C	-5,7±1,0	C	-36,9±0,0

### 5.3.5 Stanovenie SPF častíc

SPF pripravených častíc bolo stanovené na základe postupu uvedenom v bode 4.7. Stanovené hodnoty SPF pre pripravené častice sú uvedené v Tabuľka 12. Viditeľnejšie porovnanie SPF častíc s PHB a bez PHB ilustruje Obrázok 15. Bolo stanovené SPF pre samotné častice, kde v prípade prázdnych lipozómov bola stanovená hodnota SPF na 2,4 a v prípade prázdnych lipozómov s PHB na 5,5.

Celkovo najvyššie hodnoty SPF boli stanovené u častíc s obsahom 40% etanolového extraktu zo zelenej kávy. Pre lipozómy s obsahom tohto extraktu bolo SPF 32,1 a pre lipozómy s PHB 37,6. U všetkých lipozómov s PHB, okrem častíc s vodným extraktom z cascary, došlo k nárastu SPF. To môže byť spôsobené tým, že samotné PHB môžu pôsobiť ako UV filter, pretože u lipozómov s PHB bolo SPF zvýšené o 3,1 v porovnaní so samotnými lipozómami, a tak môže dochádzať spolu s extraktami k synergickému účinku.



Obrázok 15: Porovnanie SPF lipozómov s PHB a bez PHB

Tabuľka 12: SPF častíc

Typ extraktu	Lipozómy	SPF	Lipozómy s PHB	SPF
	prázdne	2,4±0,1	prázdne	5,5±0,5
vodné	PK	19,5±3,9	PK	26,6±2,4
	ZK	25,6±3,3	ZK	31,1±3,5
	C	12,8±2,9	C	9,2±0,8
etanolové	PK–20 %	20,6±1,0	PK–20 %	23,7±4,8
	ZK–40 %	32,1±0,6	ZK–40 %	37,6±2,4
	C–40 %	14,5±3,1	C–40 %	16,6±4,0
olejové	PK	2,6±0,4	PK	7,2±0,2
	ZK	2,4±0,3	ZK	6,5±0,2
	C	2,3±0,0	C	8,0±0,4

#### 5.4 Príprava vlákien

V rámci experimentálnej časti práce boli pripravené vlákna pomocou elektrospinningu a forcespinningu. Postup pre prípravu vlákien je uvedený v bodoch 4.16.1 a 4.16.2.

Celkovo bolo pripravených 8 typov vlákien, ktoré sa líšili spôsobom prípravy, a tiež druhom olejového extraktu.

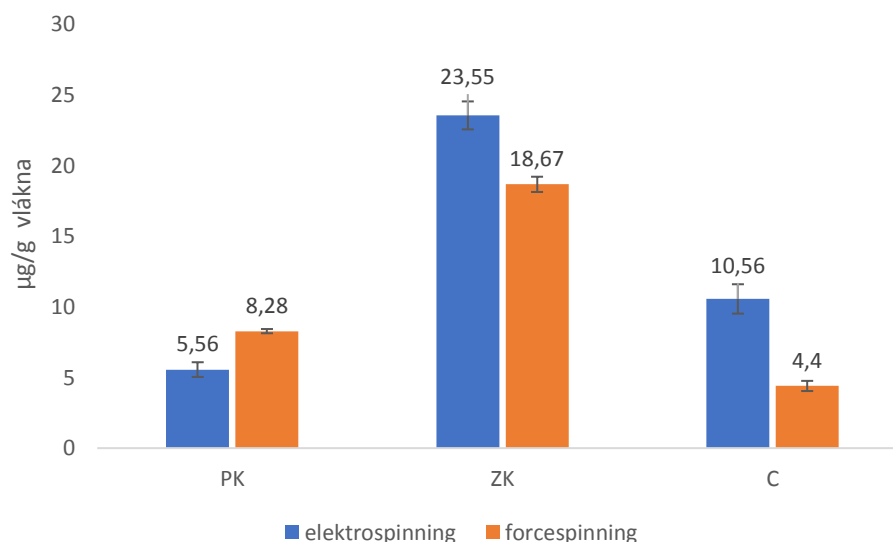
Všetky pripravené vlákna boli uchovávané v Petriho miskách pri laboratórnej teplote. U vlákien bola sledovaná ich antioxidačná aktivita, krátkodobá stabilita v dvoch modelových prostrediach, a to voda a etanol, dlhodobá stabilita a ich cytotoxicita.



Obrázok 16: Porovnanie vlákien: vľavo vlákno pripravené pomocou forcespinningu, vpravo vlákno pripravené pomocou electrospinningu

##### 5.4.1 Antioxidačná aktivita vlákien

Antioxidačný účinok vlákien bol stanovený podľa postupu uvedenom v bode 4.17. Výsledky zo stanovenia antioxidačnej aktivity vlákien uvádza Obrázok 17. Celkovo obsah stanovených antioxidantov vo vláknach bol nízky a bol vypočítaný na  $\mu\text{g/g}$  použitého vlákna, z dôvodu odlišnej hrúbky vlákna pripraveného forcespinningom a textilie pripravenej elektrosinngom. Najvyššie množstvo antioxidantov bolo stanovené vo vláknach s olejovým extraktom zo zelenej kávy, pričom o  $4,88 \mu\text{g}$  sa nachádzalo viac vo vláknach pripravených pomocou elektrosinngom.



Obrázok 17: Antioxidačná aktivita vlákien vzťahovaná na hmotnosť 1 cm<sup>2</sup> vlákna

#### 5.4.2 Krátkodobá stabilita vlákien

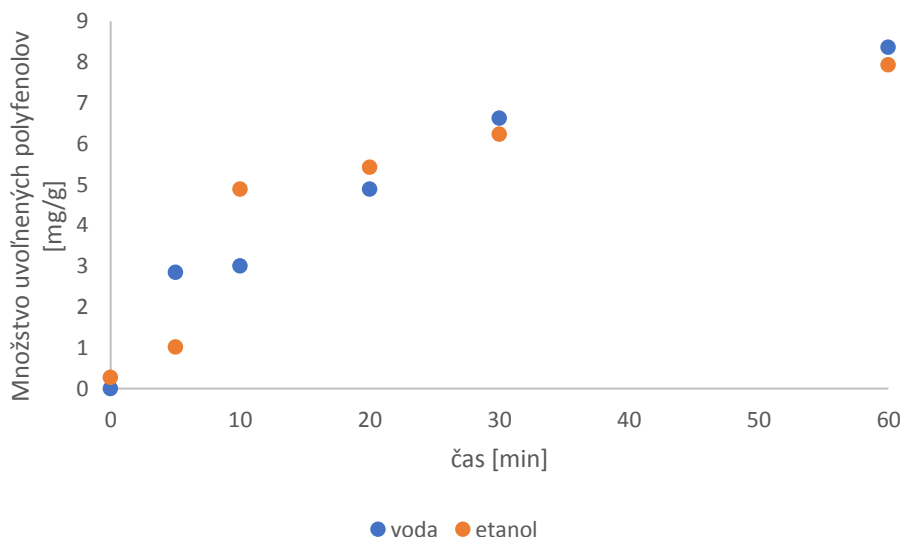
Krátkodobá stabilita vlákien bola stanovená v dvoch modelových prostrediach, ktoré predstavovala voda a etanol. Postup pre stanovenie krátkodobej stability vlákien je uvedený v bode 4.18.

V Tabuľka 13 je zhrnutá krátkodobá stabilita vlákien, teda množstvo uvoľnených polyfenolov v jednotlivých časových intervaloch. Výsledné koncentrácie boli prepočítané na mg/ g vlákna s plochou 1 cm<sup>2</sup>. Z vlákien pripravených pomocou forcespinningu dochádzalo k výrazne pomalšiu uvoľňovaniu polyfenolov ako z vlákien pripravených elektrospinningom. V prípade vlákien pripravených elektrospinningom bolo množstvo uvoľnených polyfenolov vo vodnom a v etanole prostredí porovnateľné. Vždy sa najviac aktívnych látok uvoľnilo z vlákien s extraktom z cascary, potom z vlákien so zelenou kávou a najmenej z vlákien s praženou kávou. U vlákien pripravených forcespinningom bol zaznamenaný rozdiel v uvoľňovaní polyfenolov v závislosti od prostredia. Výnimku tvorili vlákna s extraktom zo zelenej kávy pripravené forcespinningom v modelovom prostredí voda, kde došlo k uvoľneniu až 43,151 mg/g polyfenolov. To môže byť spôsobené tým, že látky obsiahnuté v extrakte zo zelenej kávy majú vyššiu afinitu k vodnému prostrediu, čo potvrdzuje aj fakt, že do etanolu bolo uvoľnených len 2,996 mg/g. V modelovom prostredí etanol z vlákien pripravených pomocou forcespinningu nedošlo v priebehu 0–60 minút k žiadnemu uvoľneniu polyfenolov. Preto bol test krátkodobej stability u tohto typu vlákien zopakovaný aj po 24 hodinách. Po uplynutí tejto doby sa do modelového prostredia uvoľnilo množstvo polyfenolov v rozmedzí 2,585–3,139 mg/g. Vplyv modelového prostredia na množstvo uvoľnených polyfenolov je znázornený na Obrázok 18.

Tabuľka 13: Krátkodobá stabilita vlákien v prostredí voda a etanol

Množstvo uvoľnených polyfenolov [mg/g]									
Prostredie	Metóda	Extrakt	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	24 hod
Voda	Elektrospinning	PK-O	0,000±0,000	2,841±0,387	2,999±0,591	4,892±0,223	6,628±1,894	8,364±0,223	
		ZK-O	10,852±0,202	14,469±6,496	14,728±2,325	15,503±4,564	24,805±0,000	32,556±4,564	
		C-O	7,751±0,000	9,302±1,550	10,852±3,101	11,369±2,923	23,771±0,731	36,432±0,775	
	Forcespinning	PK-O	0,073±0,003	0,327±0,109	0,436±0,000	0,545±0,109	0,763±0,109	0,945±0,109	1,889±0,206
		ZK-O	0,000±0,000	8,091±4,045	9,439±5,046	18,204±2,023	18,879±3,814	20,227±2,023	43,151±5,046
		C-O	0,000±0,000	0,740±0,370	0,924±0,185	1,109±0,370	1,479±0,302	1,972±0,185	4,437±0,604
Etanol	Elektrospinning	PK-O	0,271±0,007	1,017±0,051	4,880±0,407	5,423±0,507	6,236±1,257	7,931±0,203	
		ZK-O	0,775±0,019	16,278±0,060	20,929±0,775	22,479±0,775	23,254±4,651	28,680±0,775	
		C-O	8,440±0,206	26,025±2,110	26,025±2,110	32,355±0,995	32,707±1,055	35,872±1,723	
	Forcespinning	PK-O	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	2,585±0,000
		ZK-O	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	2,996±0,499
		C-O	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	3,139±0,628

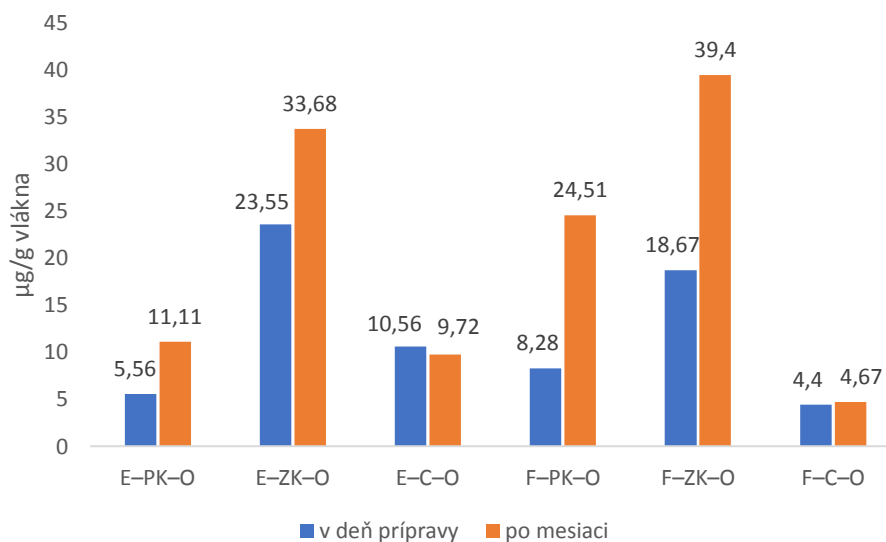




Obrázok 18: Priebeh uvoľňovania polyfenolov z vlákien s obsahom olejového extraktu z praženej kávy priprevených pomocou elektrospinningu v čase

### 5.4.3 Dlhodobá stabilita vlákien

Dlhodobá stabilita vlákien bola stanovená po 4 týždňoch podľa postupu uvedenom v bode 4.19 a je ilustrovaná na Obrázok 19 a zhrnutá v Tabuľka 14. Antioxidačná aktivita látok uvoľnených z vlákien je aj po dlhodobom skladovaní porovnateľná s množstvom uvoľnených látok po príprave. Pomocou prvých písmen v skratke je uvedený spôsob prípravy vlákien. E značí elektrospinning a F forcespinning



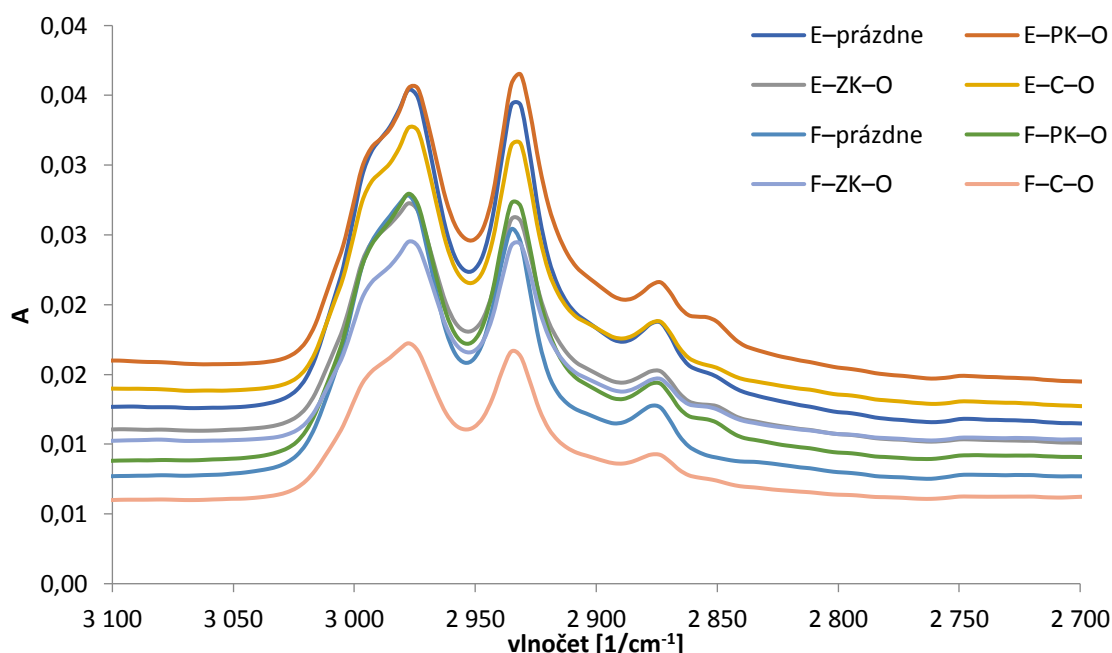
Obrázok 19: Porovnanie antioxidačného účinku látok uvoľnených z vlákien v deň prípravy a po mesačnom skladovaní

Tabuľka 14: Dlhodobá stabilita vlákien

Metóda prípravy	Použitý extrakt	[ $\mu\text{g/g}$ ]
Elektrospinning	PK-O	11,11 $\pm$ 0,25
	ZK-O	33,68 $\pm$ 1,30
	C-O	9,72 $\pm$ 1,13
Forcespinning	PK-O	24,51 $\pm$ 0,80
	ZK-O	39,40 $\pm$ 0,01
	C-O	4,672 $\pm$ 0,179

#### 5.4.4 Charakterizácia vlákien pomocou FTIR-ATR

Na základe nastavených parametrov uvedených v bode 4.20 bola prevedená FTIR-ATR analýza, ktorej výsledok je znázornený v podobe grafu na Obrázok 20. Pomocou FTIR-ATR analýzy mala byť potvrdená prítomnosť olejových extraktov. Obrázok 20 znázorňuje oblasť s jemnými rozdielmi, avšak medzi jednotlivými vzorkami sa nevyskytol žiaden pík, ktorý by naznačoval prítomnosť odlišných skupín. Oblasť 2900–2800  $\text{cm}^{-1}$  je charakteristická pre –C–H v aldehydoch. Pík, ktorý sa nachádza v oblasti 3600–2500  $\text{cm}^{-1}$  je charakteristický pre –OH skupinu karboxylových kyselín. Na základe toho je možné konštatovať, že koncentrácia olejových extraktov bola nízka. Taktiež môžeme potvrdiť, že štruktúra PHB sa v priebehu procesu zvlákňovanie nemení.



Obrázok 20: Výsledky z FTIR-ATR analýzy – porovnanie štruktúry prázdnych PHB vlákien a vlákien s olejovými extraktmi

#### 5.5 MTT test

Cytotoxicita vybraných druhov častíc a vlákien bola testovaná na keratinocytoch, viz Obrázok 21, podľa postupu uvedenom v bode 4.21.2. Pre MTT test boli použité častice s vodnými a etanolovými extraktami, ktoré vykazovali najvyššie SPF. Taktiež boli otestované lipozómy s olejovým extraktom.

Cytotoxicita bola stanovená u vlákien pripravených pomocou elektrospinningu, pretože z týchto vlákien dochádzalo k viditeľne rýchlejšiemu uvoľňovaniu aktívnych látok, ktoré bolo pre test potrebné.

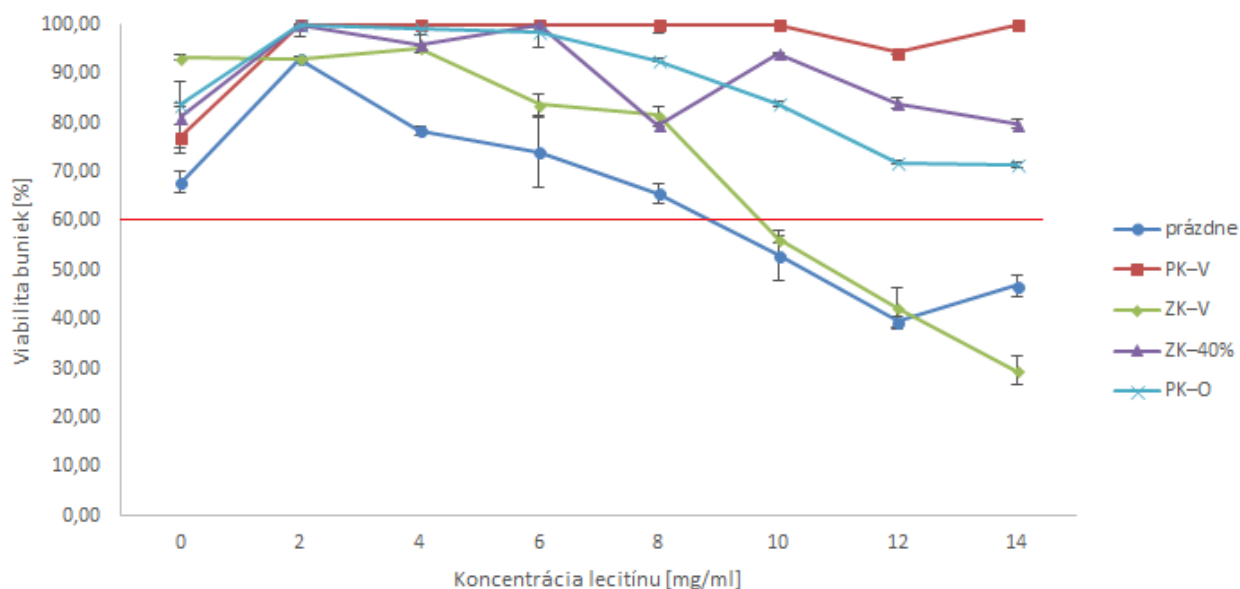


Obrázok 21: Vľavo – inverzný mikroskop s kultivačnou nádobou, vpravo – ľudské keratinocyty pri zväčšení 200×

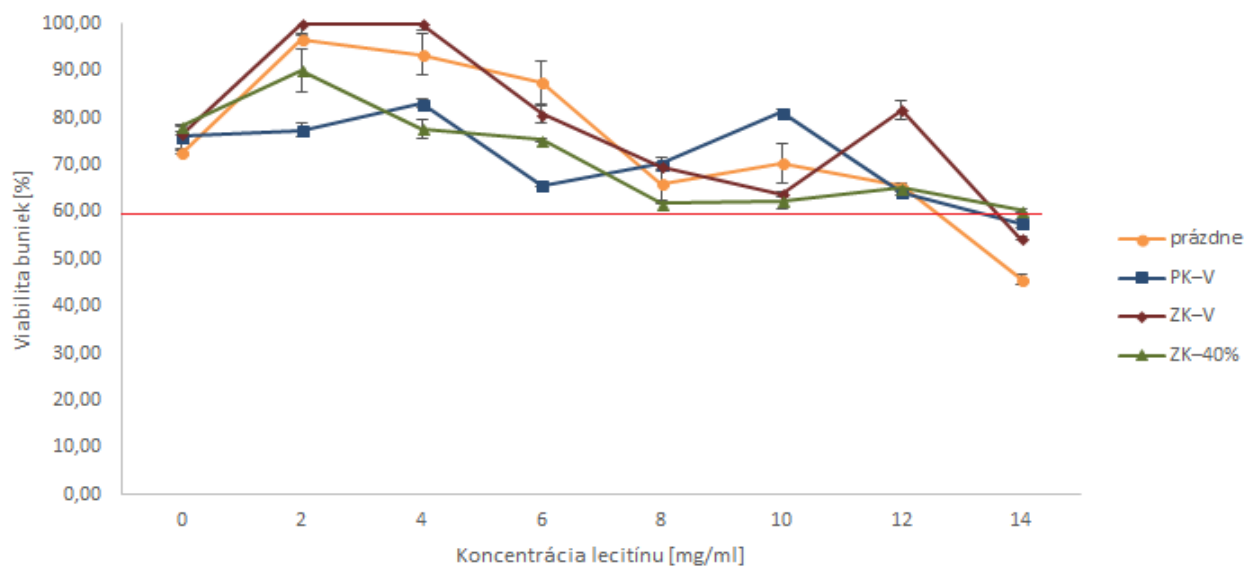
### 5.5.1 Cytotoxicita častíc

Pomocou Stewartovej metódy, ktorej postup je uvedený v bode 4.21.3 bola stanovená koncentrácia lecitínu v testovaných časticích. Jednotlivé koncentrácie sú uvedené v Tabuľka 15 a Tabuľka 16 rovnako ako aj obsah polyfenolov a viabilita buniek. Na Obrázok 22 a Obrázok 23 je graficky znázornená viabilita buniek v závislosti od koncentrácie lecitínu v lipozómoch a lipozómoch s PHB.

Vo všeobecnosti platí, že vzorka nie je považovaná za cytotoxickú, ak viabilita buniek neklesla pod 60 %. Cytotoxicita lipozómov s PHB bola stanovená u prázdnych častíc a častíc s vodným extraktom z praženej a zelenej kávy, pričom sa vzťahovala len pre 14% roztok týchto častíc. Celkovo je však možné konštatovať, že prítomnosť extraktov v časticích priaznivo pôsobila na viabilitu buniek.



Obrázok 22: Závislosť viability buniek v závislosti od množstva lecitínu v lipozómoch



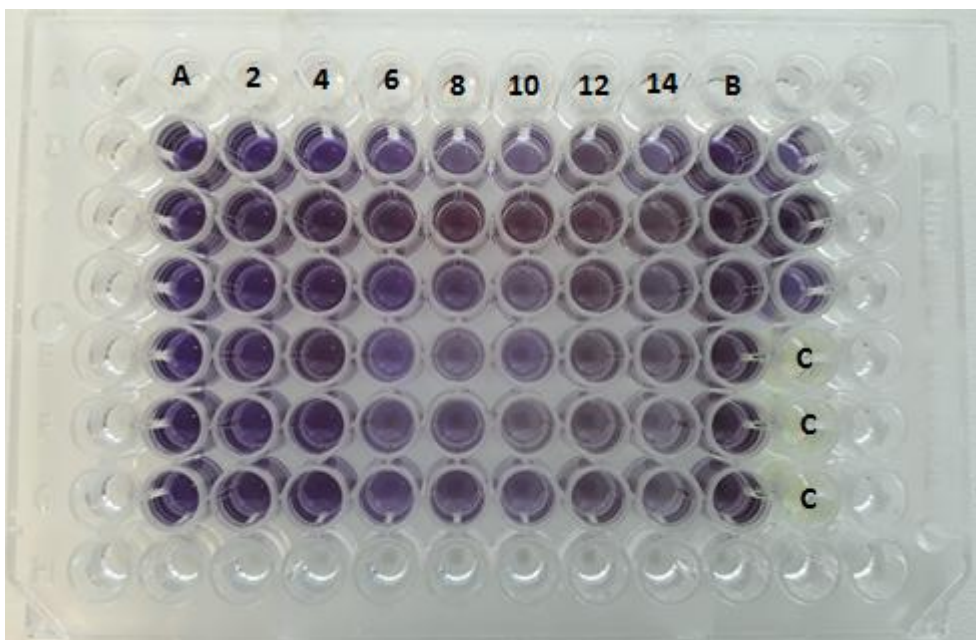
Obrázok 23: Závislosť viability buniek od množstva lecitínu v lipozómoch s PHB

Tabuľka 15: Množstvo lecitínu pre jednotlivé koncentrácie lipozómov pre MTT test

Extrakt	% roztok častíc	Množstvo lecitínu [µg]	Obsah enkapsulovaných polyfenolov [µg]	Viabilita [%]
Prázdne	2	28,40±0,21		93,01±0,93
	4	56,80±0,42		78,44±7,11
	6	85,20±0,62		74,01±1,98
	8	113,60±0,83		65,62±5,25
	10	142,00±1,04		53,03±1,05
	12	170,40±1,24		39,63±2,10
	14	198,80±1,45		46,85±0,47
Pražená voda	2	47,16±0,52	69,50±1,17	100,00±0,10
	4	94,32±1,04	139,00±2,34	100,00±0,49
	6	141,48±1,56	208,50±3,50	100,00±0,49
	8	188,65±2,07	278,01±4,67	100,00±1,66
	10	235,81±2,59	347,51±5,84	100,00±0,00
	12	282,97±3,11	417,01±7,01	94,23±0,49
	14	330,13±3,63	486,51±8,17	100,00±0,69
Zelená voda	2	16,38±0,62	12,47±1,67	93,05±0,43
	4	32,75±1,24	24,95±3,34	95,22±0,29
	6	49,13±1,87	37,42±5,01	83,79±2,17
	8	65,51±2,49	49,89±6,67	81,62±1,74
	10	81,88±3,11	62,36±8,34	56,30±0,72
	12	98,26±3,73	74,84±10,01	42,40±4,20
	14	114,64±4,35	87,31±11,67	29,52±2,89
Zelená 40% etanol	2	10,88±0,31	65,72±0,83	100,00±2,35
	4	21,77±0,62	131,44±1,67	96,00±1,93
	6	32,65±0,93	197,17±2,50	100,00±0,28
	8	43,53±1,24	262,89±3,34	79,59±0,41
	10	54,42±1,56	328,61±4,17	94,07±0,28
	12	65,30±1,87	394,33±5,01	84,00±0,97
	14	76,18±2,18	460,05±5,84	79,72±0,83
Pražená olej	2	55,42±0,10	90,98±0,10	100,00±0,06
	4	110,84±0,20	181,96±0,20	99,24±1,27
	6	166,26±0,29	272,94±0,30	98,60±3,31
	8	221,68±0,39	363,92±0,39	92,75±0,38
	10	277,09±0,49	454,89±0,49	83,91±0,45
	12	332,51±0,59	545,87±0,590	71,95±0,32
	14	387,93±0,68	636,85±0,69	71,44±0,45

Tabuľka 16: Množstvo lecitínu pre jednotlivé koncentrácie lipozómov s PHB pre MTT test

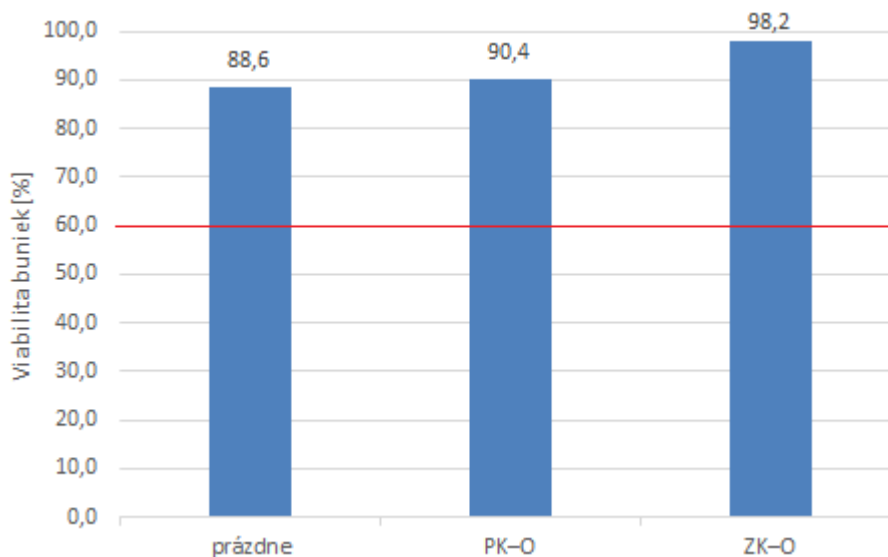
Extrakt	% roztok častíc	Množstvo lecitínu [mg]	Obsah enkapsulovaných polyfenolov [ $\mu$ g]	Viabilita [%]
Prázdne	2	19,90 $\pm$ 0,21		96,73 $\pm$ 0,96
	4	39,80 $\pm$ 0,42		93,46 $\pm$ 4,23
	6	59,70 $\pm$ 0,62		87,50 $\pm$ 4,42
	8	79,60 $\pm$ 0,83		65,92 $\pm$ 3,65
	10	99,51 $\pm$ 1,04		70,39 $\pm$ 4,23
	12	119,41 $\pm$ 1,24		65,58 $\pm$ 0,58
	14	139,31 $\pm$ 1,45		45,77 $\pm$ 1,15
Pražená voda	2	22,91 $\pm$ 0,52	60,40 $\pm$ 2,04	77,36 $\pm$ 1,55
	4	45,81 $\pm$ 1,04	120,79 $\pm$ 4,09	83,05 $\pm$ 0,78
	6	68,72 $\pm$ 1,56	181,19 $\pm$ 6,13	65,72 $\pm$ 0,26
	8	91,63 $\pm$ 2,07	241,59 $\pm$ 8,18	70,25 $\pm$ 1,42
	10	114,53 $\pm$ 2,59	301,98 $\pm$ 10,22	81,24 $\pm$ 0,52
	12	137,44 $\pm$ 3,11	362,38 $\pm$ 12,26	64,30 $\pm$ 0,65
	14	160,35 $\pm$ 3,63	422,78 $\pm$ 14,31	57,57 $\pm$ 0,91
Zelená voda	2	2,49 $\pm$ 0,42	9,87 $\pm$ 1,09	100,00 $\pm$ 2,36
	4	4,98 $\pm$ 0,83	19,74 $\pm$ 2,18	100,00 $\pm$ 1,58
	6	7,46 $\pm$ 1,24	29,62 $\pm$ 3,27	80,76 $\pm$ 1,96
	8	9,95 $\pm$ 1,66	39,49 $\pm$ 4,36	69,76 $\pm$ 0,65
	10	12,44 $\pm$ 2,07	49,36 $\pm$ 5,45	63,87 $\pm$ 0,52
	12	14,93 $\pm$ 2,49	59,23 $\pm$ 6,54	81,68 $\pm$ 2,09
	14	17,41 $\pm$ 2,90	69,10 $\pm$ 7,62	54,32 $\pm$ 0,39
Zelená 40% etanol	2	17,93 $\pm$ 0,10	73,79 $\pm$ 0,17	90,05 $\pm$ 4,52
	4	35,86 $\pm$ 0,21	147,59 $\pm$ 0,33	77,65 $\pm$ 1,94
	6	53,80 $\pm$ 0,31	221,38 $\pm$ 0,50	75,32 $\pm$ 0,39
	8	71,73 $\pm$ 0,42	295,17 $\pm$ 0,67	61,84 $\pm$ 0,12
	10	89,66 $\pm$ 0,52	368,96 $\pm$ 0,83	62,40 $\pm$ 1,68
	12	107,59 $\pm$ 0,62	442,76 $\pm$ 1,01	65,12 $\pm$ 0,78
	14	125,52 $\pm$ 0,73	516,55 $\pm$ 1,17	60,34 $\pm$ 0,39



Obrázok 24: Mikrotitračná doštička po MTT teste častíc: A – kontrola nárastu buniek (médium), B – kontrola prostredia vehicle control, C – kontrola usmrtenia buniek (v 40% etanole), 2 – 14 je percento častíc v roztoku

### 5.5.2 Cytotoxicita vlákien

Pomocou MTT testu, ktorého postup je uvedený v bode 4.21.2, bola stanovená cytotoxicita vlákien pripravovaných elektrospinningom. Testované vlákna obsahovali olejový extrakt zo zelenej a z praženej kávy. Pre porovnanie bola stanovená aj cytotoxicita vlákien bez enkapsulovanej účinnej látky. Z Obrázok 25 je viditeľné, že všetky typy testovaných vlákien nie sú cytotoxické, pretože viabilita buniek sa pohybovala v rozmedzí 88,6 – 98,2 %.



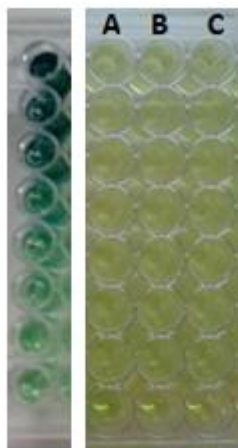
Obrázok 25: Viabilita buniek pre vlákna pripravené elektrospinningom

### 5.6 SOS chromotest

Na základe postupu uvedenom v bode 4.21.4 bol vykonaný test genotoxicity pre prázdne lipozómy a lipozómy s enkapsulovanými 20% etanolovým extraktom z praženej kávy, 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy a 40% etanolovým extraktom z cascary. Rovnako bol

SOS chromotest vykonaný pre kombinované častice s 20% etanolovým extraktom z praženej kávy, 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy a 40% etanolovým extraktom z cascary.

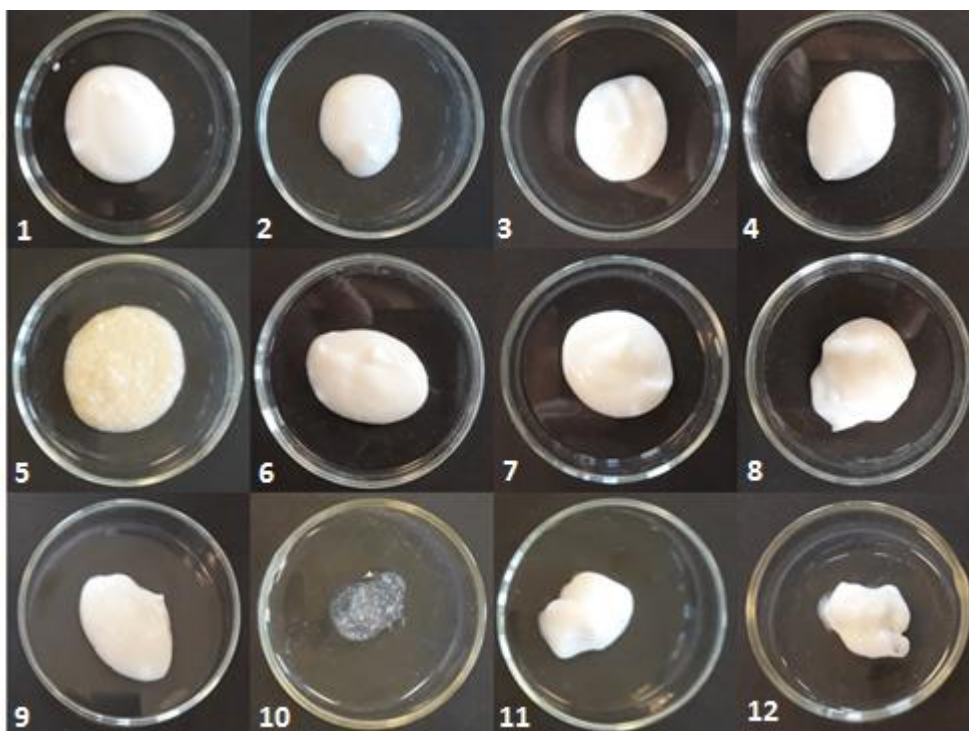
Žiadna z testovaných vzoriek nebola vyhodnotená ako genotoxická.



Obrázok 26: Vľavo – štandard po ukončení SOS chromotestu, vpravo – častice použité pre SOS chromotest A – PK-20%, B – ZK-40%, C – C-40%

### 5.7 Príprava emulzií a gélov

V rámci diplomovej práce bolo spolu vytvorených 13 druhov emulzií typu O/V a 3 druhy gélov. Postup pre prípravu emulzií aj gélov je uvedený v bode 4.22. Vždy bol vytvorený základ či už emulzie alebo gélu bez ďalších prídavkov. Vybrané druhy emulzií a gélov sú zobrazené na Obrázok 27. Ďalej boli vytvorené emulzie s 5 a 10% obsahom organického UV filtra homosalát a gély s 5% obsahom homosalátu. Taktiež boli pripravené gély a emulzie buď len s prídavkom častíc, extraktu alebo ich kombinácia, prípadne boli pre vyššiu účinnosť doplnené o homosalát.



Obrázok 27: Vybrané druhy emulzií a gélov: 1. Emulzia – základ + 5 % homosalát, 2. Emulzia + 10 % homosalát, 3. Emulzia + L-prázdne, 4. Emulzia + P-prázdne, 5. Emulzia + P-ZK-40 %, 6. Emulzia + L-ZK-40 %, 7. Emulzia + P-ZK-40 %, 8. Emulzia + L-ZK-40 %, 9. Emulzia + P-ZK-40 %, 10. Emulzia + L-ZK-40 %, 11. Emulzia + P-ZK-40 %, 12. Emulzia + L-ZK-40 %



8. Emulzia + ZK-40 % + P-prázdne + P-ZK-40 %, 9. Emulzia + extrakt zo ZK-40 % + P-prázdne + P-ZK-40 %, 10. Gél základ, 11. Gél + 5 % homosalát, 12. Gél + zakocentrovane P-prázdne + zakocentrovane P-ZK-40 % + 5 % homosalát

### 5.7.1 Stanovenie SPF emulzií a gélov

Na základe pracovného postupu uvedenom v bode 4.7 bolo stanovené SPF pripravených emulzií, a tiež gélov. Okrem emulzií uvedených v Tabuľka 17 boli pripravené aj emulzie s obsahom lipozómov s vodným extraktom zo zelenej kávy a s lipozómami s PHB s enkapsulovaným vodným extraktom zo zelenej kávy. Avšak tento typ emulzií sa javil hneď po ukončení prípravy ako nestabilný, pretože došlo k viditeľnému oddeleniu fáz, a tak neboli použité pre ďalšie stanovenie.

Tabuľka 17 uvádza súhrn stanoveného SPF pre pripravené emulzie. Najnižšie SPF bolo stanovené pre samotný základ emulzie a emulziu s prázdnyimi lipozómami, ktorých hodnoty boli 0,00, a teda nemali žiaden účinok. Najviac v UV oblasti absorbovala emulzia s 10 % homosalátu, ktorej SPF bolo stanovené na 4,72. Taktiež bola účinná emulzia so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy + zakocentrovanyimi lipozómami so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy + zakocentrovanyimi lipozómami s PHB so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy+ 10 % homosalátu, ktorej SPF bolo stanovené na 3,94.

Tabuľka 17: SPF emulzií

Pridané účinné zložky	SPF
Základ	0,00±0,03
5 % homosalátu	2,42±0,04
10 % homosalátu	4,72±0,03
L-prázdne	0,00±0,09
L-ZK-40 %	0,21±0,03
P-prázdne	1,13±1,01
P-ZK-40 %	0,15±0,04
ZK-40 % + P-prázdne + P-ZK-40 %	2,12±0,66
ZK-40 % + zakocentrovane P-prázdne + zakocentrovane P-ZK-40 %	0,20±0,01
ZK-40 % + zakocentrovane P-prázdne + zakocentrovane P-ZK-40 % + 5 % homosalátu	1,85±0,06
ZK-40 % + zakocentrovane P-prázdne + zakocentrovane P-ZK-40 % + 10 % homosalátu	3,94±0,07

Z pripravených gélov, tak ako je možné vidieť v Tabuľka 18, mal najvyššie SPF gél s 5 % homosalátu, a to 2,30. SPF gélu so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy + zakocentrovanyimi lipozómami so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy + zakocentrovanyimi lipozómami s PHB so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy+ 5 % homosalátu bolo určené na 1,84. V prípade gélov, v porovnaní s emulziami, v UV oblasti absorboval aj samotný základ gélu, ktorého hodnota bola 0,75.

Tabuľka 18: SPF gélov

Pridané účinné zložky	SPF
Základ	0,75±0,05
5 % homosalátu	2,30±0,09
zakoncentrované P-prázdne + zakoncentrované P-ZK-40 % + 5 % homosalátu	1,84±0,01

Rovnako ako v prípade gélov, tak aj emulzií je stanovené SPF minimálne, a je možné predpokladať vyššiu účinnosť voči UVB žiareniu. Dôvodom je to, že pri stanovení nemusela byť odobraná časť produktu s homogénne rozdistribúovanými účinnými látkami.

### 5.7.2 Stanovenie stability emulzií

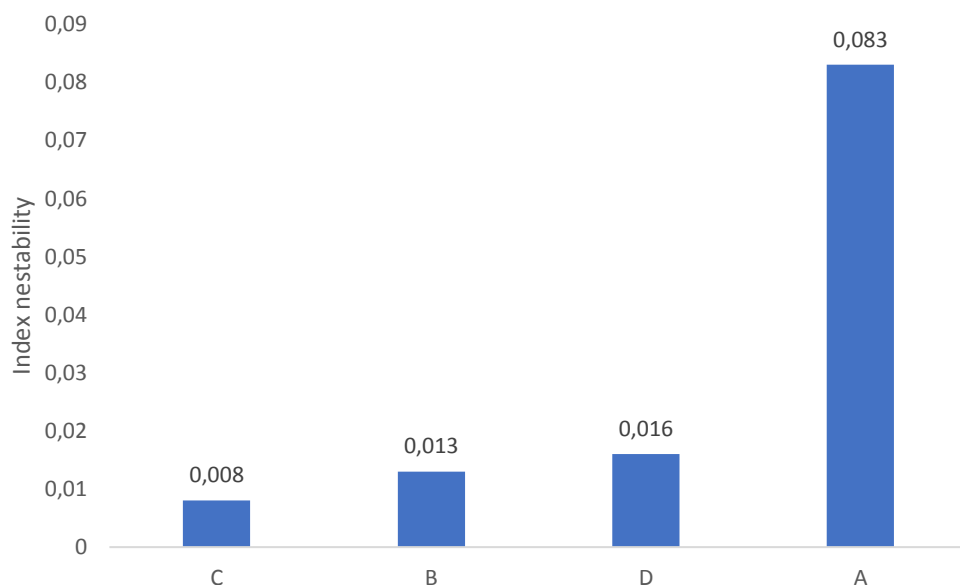
Pomocou analytickej centrifúgy bola sledovaná sedimentačná stabilita, kde pri všetkých testovaných vzorkách boli sledované rôzne prejavy nestability. Testovanie prebiehalo postupne v troch krokoch podľa postupu uvedenom v bode 4.24. Najskôr bola stabilita emulzií preverená pri 2 000 rpm po dobu 3,5 hodiny, kde sa vzorky významne nemenili a boli stabilné. Ďalším krokom bolo stanovenie stability pri 2 000 rpm po dobu 17 hodín. Vo vzorkách už boli pozorované isté náznaky nestability. Na základe toho bol vykonaný aj tretí krok stanovenia stability, a to pri 4 000 rpm po dobu 6 hodín, kde boli prejavy nestability zo všetkých troch stanovení najvýraznejšie. Výstupom sú grafy znázorňujúce transmisný profil vzorky v rôznych častiach kvety v čase a tiež index nestability pre tretí krok testovania, teda 6 hodín pri 4 000 rpm. Index nestability vypovedá o nestabilite vzorky, to znamená, že čím je vyšší, tým je vzorka menej stabilná. Tabuľka 19 uvádza zloženie jednotlivých emulzií a indexy nestability uvádza Obrázok 29.



Obrázok 28: Vzorky v kvetách pripravené na stanovenie stability pomocou analytickej centrifúgy

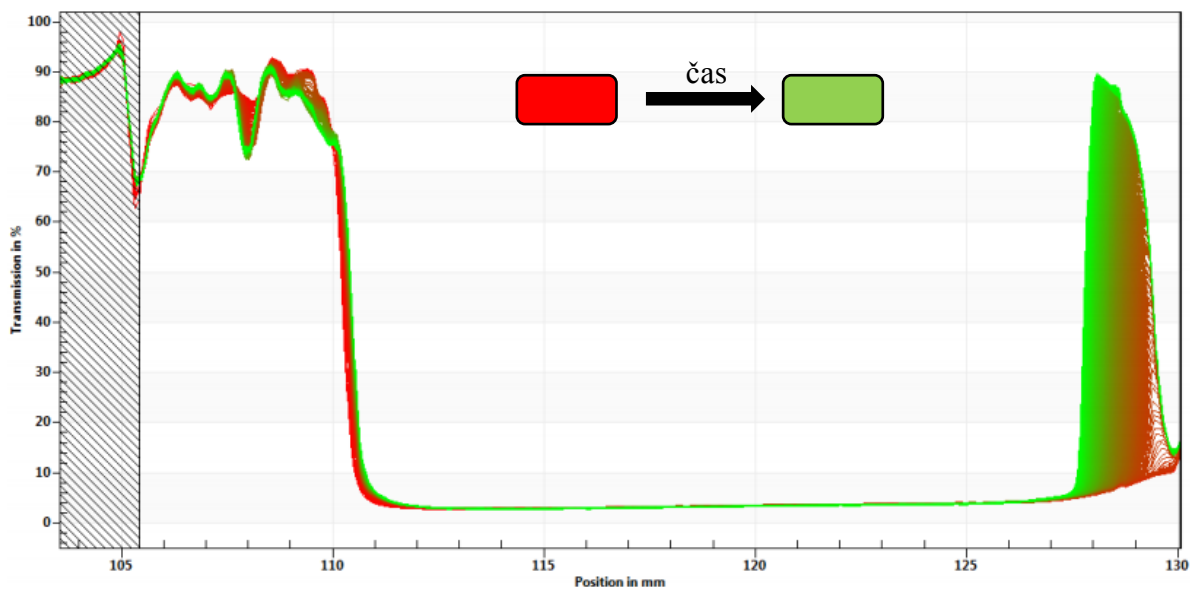
Tabuľka 19: Označenie emulzií a ich zloženie

Označenie emulzie	Zloženie emulzie
A	Základ
B	Základ + 10 % homosalát
C	ZK-40 % + zakoncentrované P-prázdne + zakoncentrované P-ZK-40 % + 10 % homosalátu
D	ZK-40 % + zakoncentrované P-prázdne + zakoncentrované P-ZK-40 %

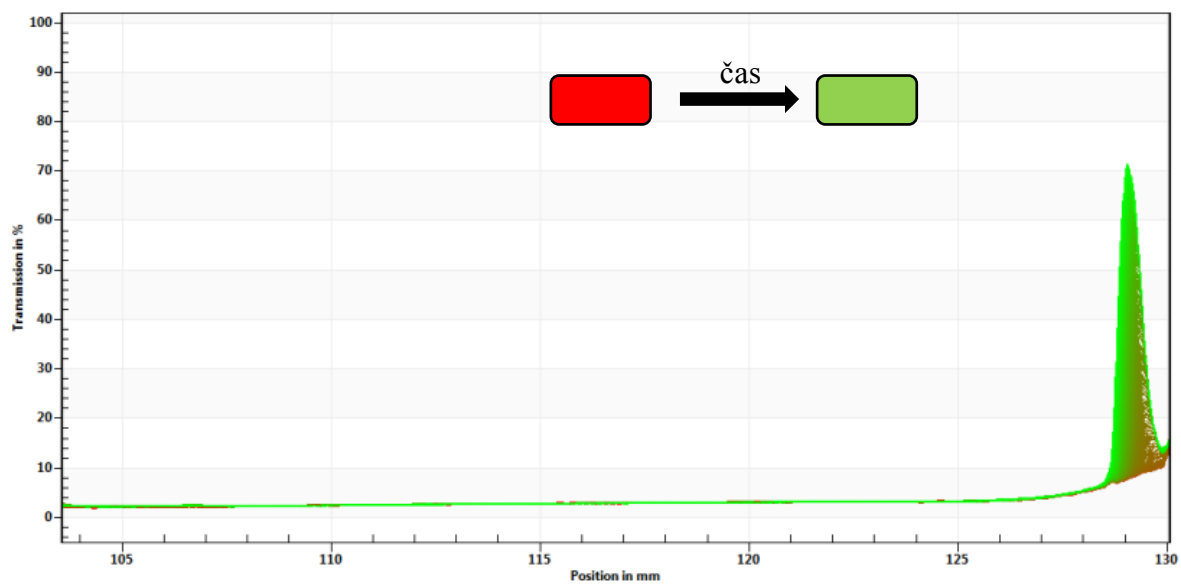


Obrázok 29: Hodnoty indexu nestability

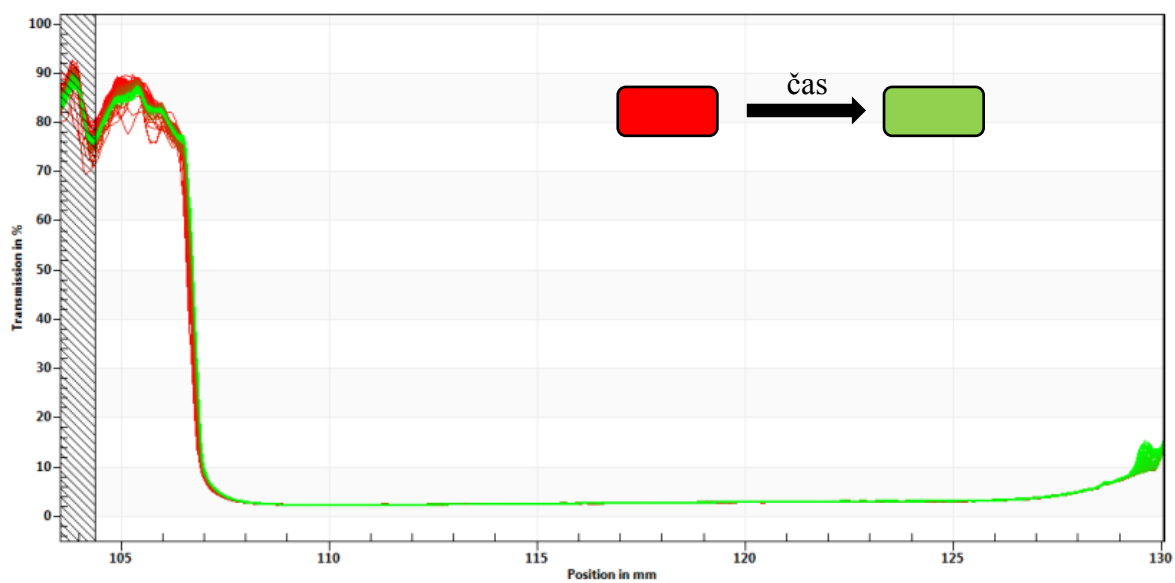
Najvyšší index nestability a teda najnižšiu stabilitu mala vzorka A, ktorá predstavovala samotný základ emulzie a jej index nestability bol 0,083. Vzorky C, B a D mali veľmi podobný index nestability, pričom najvyššia stabilita bola stanovená pre vzorku C s indexom 0,008. Grafy znázorňujúce závislosť transmitácie na polohe v kyvete sú uvedené na Obrázok 30, Obrázok 31, Obrázok 32 a Obrázok 33. Všetky testované emulzie boli vyhodnotené ako stabilné.



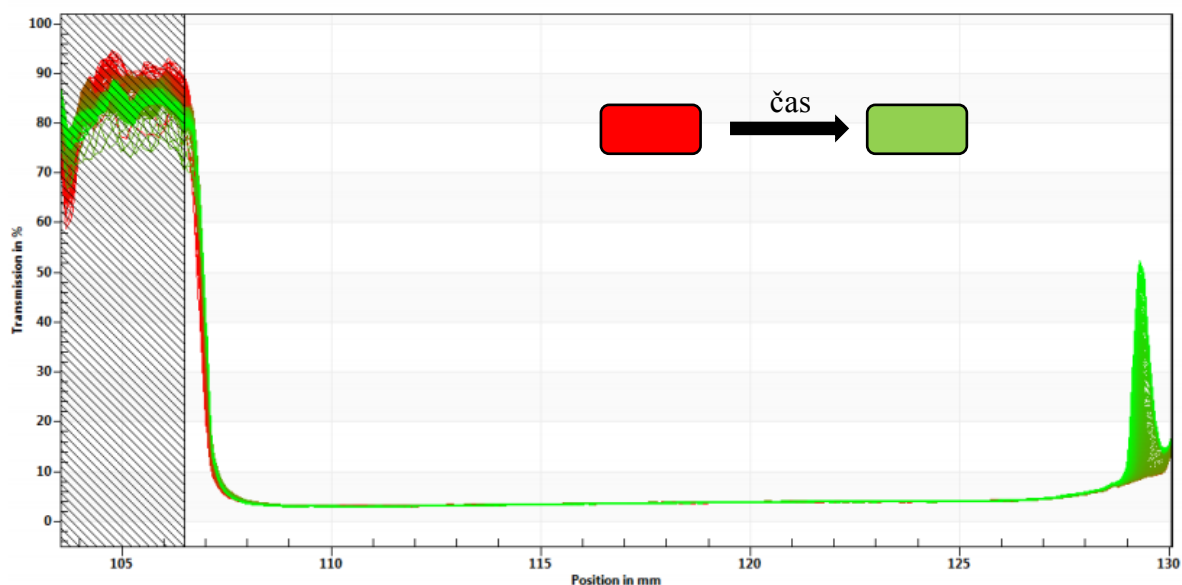
Obrázok 30: Graf závislosti transmitácie na polohe v kyvete pre vzorku A



Obrázok 31: Graf závislosti transmitácie na polohe v kvete pre vzorku B



Obrázok 32: Graf závislosti transmitácie na polohe v kvete pre vzorku C

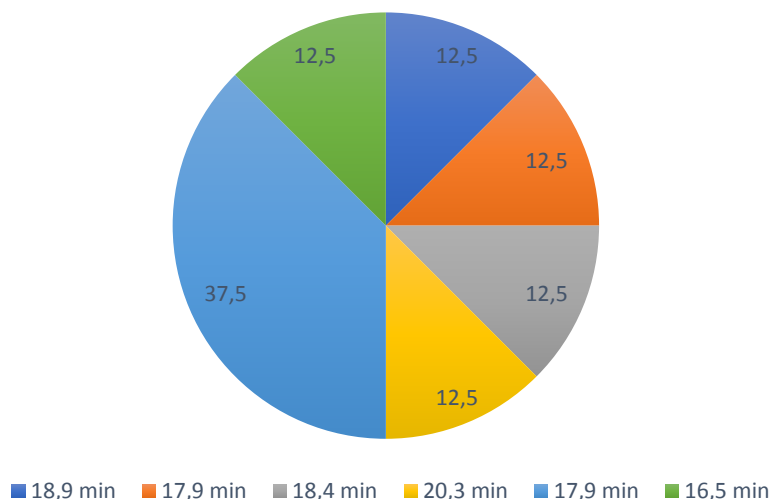


Obrázok 33: Graf závislosti transmitácie na polohe v kvete pre vzorku D

### 5.7.3 Dermatologické testovanie vybraných typov emulzií

Na základe postupu uvedenom v bode 4.25 bolo najskôr stanovené prirodzené SPF uchádzačov pomocou prístroja SUN PROTECTION DIAGNOSTIC SP 37. Z nameraných výsledných hodnôt bol vypočítaný priemer, ktorý bol prevedený na percentá.

Z Obrázok 34 je vidieť, že odporúčaná dĺžka pobytu na slnku bez opaľovacieho prípravku sa pohybuje v rozmedzí 16,5 až 20,3 minút. Najviac dobrovoľníkov, teda 37,5 %, môže pobudnúť bez ochrany na slnečnom žiarení po dobu 18,9 minúty.



Obrázok 34: Prirodzené SPF pokožky respondentov

Vyhodnotenie údajov o účastníkoch je zhrnuté v

Tabuľka 20. Testovania sa zúčastnilo 8 žien vo veku 19–30 rokov. 25,0 % zúčastnených uvádzalo, že má normálny typ kože, zatiaľ čo 75,0 % uviedlo, že ich koža je zmiešaného typu. Sklon k podráždeniu bol v 62,5 % zaznamenaný ako malý. 75,0 % respondentov uviedlo, že ich koža je stredne dehydratovaná. Fototyp kože všetkých dobrovoľníkov bol stanovený na II. typ. Na otázku pravidelného používania hydratačných produktov 62,5 % účastníkov uvádza, že

takéto produkty používa len v prípade potreby, zatiaľ čo 37,5 % tieto produkty používa pravidelne. Až 87,5 % opýtaných uviedlo, že produkty s SPF používa len cez leto.

Tabuľka 20: Vyhodnotenie dotazníka – údaje o respondentoch

<b>Pohlavie</b>			
<i>Žena</i>	8	<i>Muž</i>	0
<b>Vek</b>			
<i>19–25</i>	75,0 %	<i>26–30</i>	25,0 %
<i>31–35</i>	0,0%		
<b>Váš typ kože</b>			
<i>Normálna</i>	25,0 %	<i>Mastná</i>	0,0 %
<i>Suchá</i>	0,0 %	<i>Zmiešaná</i>	75,0 %
<b>Popíšte Vaše problémy – sklony k podráždeniu</b>			
<i>Žiadne</i>	25,0 %	<i>Stredne</i>	12,5 %
<i>Málo</i>	62,5 %	<i>Veľmi</i>	0,0 %
<b>Popíšte Vaše problémy – nadmerná dehydratácia</b>			
<i>Žiadna</i>	0,0 %	<i>Stredne</i>	75,0 %
<i>Málo</i>	25,0 %	<i>Veľmi</i>	0,0 %
<b>Aký je Váš fototyp kože?</b>			
<i>Fototyp I.</i>	0,0 %	<i>Fototyp III.</i>	0,0 %
<i>Fototyp II.</i>	100,0 %	<i>Fototyp IV.</i>	0,0 %
<b>Používate pravidelne hydratačné produkty?</b>			
<i>Pravidelne</i>	37,5 %	<i>Takmer nikdy</i>	0,0 %
<i>V prípade potreby</i>	62,5 %	<i>Nepoužívam vôbec</i>	0,0 %
<b>Používate pravidelne produkty s SPF faktorom?</b>			
<i>Používam denne</i>	0,0 %	<i>Takmer nikdy</i>	12,5 %
<i>Len cez leto</i>	87,5 %	<i>Nepoužívam vôbec</i>	0,0 %

Hodnotenie emulzií podľa jednotlivých definovaných kritérií je zhrnuté v Tabuľka 21. K vyhodnoteniu bol použitý poradový test analogicky ako pri senzorickej analýze, hodnotenie bolo od 1 do 5 (1 najlepší, 5 najhorší, viz Príloha 1).

V hodnotení lepivosti testovaných krémov bol ako najlepší vyhodnotený krém č. 2, ktorý 50,0 % respondentov ohodnotilo známkou 1. Najhoršie bola vyhodnotená vzorka č. 1, ktorú 25,0 % respondentov označilo známkou 4. V hodnotení vstrebateľnosti krémov najlepšie dopadol krém č. 1, ktorý 62,5 % účastníkov označilo známkou 1, ako najhorší bol označený krém č. 3, ktorý ako jediný zo vzoriek bol oznámkovaný č. 4, a to 12,5 % zúčastnených. V hodnotení rozštiepatelnosti vzoriek boli všetky 3 emulzie vyhodnotené podobne, avšak najlepšia rozštiepatelnosť bola vyhodnotená pre vzorku č. 2, ktorú oznámkovalo č. 1 62,5 % účastníkov. V hodnotení parfumácie najlepšie dopadol krém č. 1, ktorý bol oznámkovaný len známkou 1 a 2, a to 75,0 a 25,0 % zúčastnených. Najhoršie hodnotenie získala emulzia č. 3, ktorú až 37,5 % účastníkov ohodnotilo známkou 5. Naopak najlepšie hydratačné vlastnosti mala vzorka č. 3, ktorú 62,5 % respondentov ohodnotilo známkou 1. Krémy č. 1 a 2. dosiahli veľmi podobné výsledky, ktoré sa líšili minimálne. V hodnotení vzhľadu krémov bol ako najlepší vyhodnotený krém č. 2, ktorý bol hodnotený len známkou 1 a 2, a to 62,5 a 37,5 % účastníkov. Čo sa vzhľadu týkalo, bol ako najhorší vyhodnotený krém č. 1, ktorý bol ako jediný zo vzoriek hodnotený aj známkou 4, a to 25,0 % respondentov.

Tabuľka 21: Vyhodnotenie dotazníka – hodnotenie emulzií

<b>Hodnotenie lepiivosti krémov</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	0,0 %	1	50,0 %	1	37,5 %
2	37,5 %	2	37,5 %	2	50,0 %
3	37,5 %	3	12,5 %	3	12,5 %
4	25,0 %	4	0,0 %	4	0,0 %
5	0,0 %	5	0,0 %	5	0,0 %
<b>Hodnotenie vstrebateľnosti krému</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	62,5 %	1	50,0 %	1	62,5 %
2	25,0 %	2	50,0 %	2	12,5 %
3	12,5 %	3	50,0 %	3	12,5 %
4	0,0 %	4	0,0 %	4	12,5 %
5	0,0 %	5	0,0 %	5	0,0 %
<b>Hodnotenie rozštiepatelnosti krému</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	50,0 %	1	62,5 %	1	50,0 %
2	37,5 %	2	25,0 %	2	25,5 %
3	12,5 %	3	12,5 %	3	25,5 %
4	0,0 %	4	0,0 %	4	0,0 %
5	0,0 %	5	0,0 %	5	0,0 %
<b>Ako hodnotíte parfumáciu?</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	75,0 %	1	12,5 %	1	0,0 %
2	25,0 %	2	50,0 %	2	12,5 %
3	0,0 %	3	12,5 %	3	25,0 %
4	0,0 %	4	12,5 %	4	25,0 %
5	0,0 %	5	12,5 %	5	37,5 %
<b>Ako hodnotíte hydratačné vlastnosti krému?</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	37,5 %	1	25,0 %	1	62,5 %
2	50,0 %	2	62,5 %	2	25,0 %
3	12,5 %	3	12,5 %	3	12,5 %
4	0,0 %	4	0,0 %	4	0,0 %
5	0,0 %	5	0,0 %	5	0,0 %
<b>Ako hodnotíte vzhľad krému?</b>					
Krém č. 1		Krém č. 2		Krém č. 3	
1	50,0 %	1	62,5 %	1	50,0 %
2	12,5 %	2	37,5 %	2	25,0 %
3	12,5 %	3	0,0 %	3	25,0 %
4	25,0 %	4	0,0 %	4	0,0 %
5	0,0 %	5	0,0 %	5	0,0 %

*Vysvetlivky: krém č. 1 – samotný základ, krém č. 2 – emulzia s 10 % homosalátu, krém č. 3 – emulzia s extraktom ZK-40 %+ zakoncentrovanými P-prázdne + zakoncentrovanými P-ZK-40 %+ 10 % homosalátu (krém č. 3).*

Účastníci testovania by na jednotlivých krémoch vylepšili nasledujúce kritériá. Na kréme č. 1 by 25,0 % opýtaných vylepšilo vzhľad krému, 12,5 % lepivosť a 12,5 % roztierateľnosť. 25,0 % respondentov by na kréme č. 1 nemenilo nič a 25,0 % účastníkov označilo iné, pričom uviedli, že by odstránili jemné hrudky, ktoré sa v emulzii nachádzali. Na kréme č. 2 by 12,5 % vylepšilo roztierateľnosť a tiež rovnaký počet opýtaných vstrebateľnosť krému. 50,0 % respondentov by na vzorke č. 2 vylepšilo parfumáciu a 37,5 % by na emulzii nič nemenilo. Na vzorke č. 3 by až 75,0 % zúčastnených vylepšilo vôňu vzorky. 12,5 % by vylepšilo vzhľad emulzie a 12,5 % respondentov by nezmenilo nič na vzorke č. 3.

Testovanie emulzií bolo ukončené vizuálnym zhodnotením, či sa v priebehu 24 hodín neprejavili známky podráždenia na pokožke účastníkov. Po uplynutí tejto doby žiaden z respondentov nezaznamenal žiadne známky podráždenia pokožky.



## 6 ZÁVER

Predložená diplomová práca bola zameraná na prípravu nanomateriálov s prírodnými UV filtrami. V práci boli najskôr charakterizované extrakty z prírodných materiálov, ktoré boli vybrané ako potenciálne UV filtre. Extrakty boli pripravené z praženej kávy, zelenej kávy a cascary. Najvyšší obsah polyfenolov, flavanoidov a antioxidantov bol zaznamenaný v olejovom extrakte z praženej kávy, pričom napríklad množstvo flavonoidov bolo viac ako 12krát vyššie ako v druhom najlepšom extrakte, ktorým bol olejový extrakt zo zelenej kávy. Najväčšie množstvo trieslovín bolo stanovené v praženej káve, ale ako extrakt s najvyšším SPF bol vyhodnotený 40% etanolový extrakt zo zelenej kávy.

Vodné, olejové a vybrané etanolové extrakty boli enkapsulované do lipozómov a kombinovaných častíc typu lipozóm/PHB. Dovedna bolo v rámci práce vytvorených 20 druhov častíc. Bola stanovená enkapsulačná účinnosť, krátkodobá, dlhodobá stabilita častíc a tiež ich SPF. Enkapsulačná účinnosť častíc s vodnými a etanolovými extraktmi bola výrazne nižšia ako s olejovými extraktmi. Enkapsulačná účinnosť bola teda najvyššia pre lipozómy a lipozómy s PHB s enkapsulovanými olejovými extraktmi, pričom hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 95,1–99,2 %.

Štúdium krátkodobej stability častíc bolo vykonané za účelom stanovenia rýchlosti uvoľňovania enkapsulovaných látok v modelovom etanolovom prostredí. Po dobe 60 minút sa najmenej polyfenolov uvoľnilo z častíc s enkapsulovaným olejovým extraktom z praženej kávy, zatiaľ čo najviac polyfenolov bolo uvoľnených z častíc obsahujúcich vodný extrakt zo zelenej kávy. Celkovo sa percento uvoľnených polyfenolov po dobe 60 minút pohybovalo v rozmedzí 2,13–97,97 %, pričom v prípade lipozómov s PHB bolo uvoľňovanie polyfenolov mierne spomalené. Na základe toho je možné predpokladať postupné uvoľňovanie aktívnych látok enkapsulovaných v časticiach po aplikácii na ľudskú pokožku. Zároveň je možné tento proces regulovať pridaním PHB do lipozómov. Na základe štúdia dlhodobej stability častíc po dobu 4 týždňov bolo stanovené, že u všetkých typov častíc, okrem častíc s olejovým extraktom, došlo k uvoľneniu polyfenolov. V prípade častíc s olejovým extraktom došlo len k degradácii polyfenolov voľných v roztoku, ktoré v priebehu enkapsulácie neboli zapuzdrené a ostali v roztoku. Množstvo degradovaných polyfenolov a pohybovalo v rozmedzí 3,0 až 36,9 %.

Pomocou metódy dynamického rozptylu svetla bola stanovená veľkosť, stabilita a polydisperzný faktor častíc. Veľkosť častíc sa pohybovala v rozmedzí 148,7–1 780,5 nm. Najväčšie pripravené častice boli s obsahom 40% etanolového extraktu z cascary, pričom ich veľkosť pohybujúca sa už v mikrónovej oblasti by mohla byť v kozmetickom priemysle skôr výhodou. Tieto častice by mohli slúžiť ako abrazívne čiastočky, z ktorých sa po aplikácii na pokožku uvoľnia enkapsulované aktívne látky. Ďalej bol u častíc stanovený SPF faktor, pričom najvyššie SPF mali častice s obsahom 40% etanolového extraktu zo zelenej kávy. Vo všeobecnosti u lipozómov s PHB bol zaznamenaný nárast SPF faktora v porovnaní s lipozómami, kde napríklad pre častice s obsahom 40% etanolového extraktu bol zvýšený o 5,5.

V ďalšej časti práce bolo pripravených 8 druhov vlákien z PHB, a to pomocou elektrospinningu a forcesspinningu. Pre prípravu funkcionalizovaných vlákien boli použité olejové extrakty. Vlákna boli študované z hľadiska antioxidačnej aktivity, krátkodobej a dlhodobej stability. Pomocou metódy FTIR–ATR bolo potvrdené, že štruktúra PHB sa v priebehu procesu zvlákňovania nemení. Prostredníctvom stanovenia antioxidačnej aktivity bola stanovená prítomnosť extraktov vo vláknach. Obsah stanovených antioxidantov bol však

dost' nízky, pričom množstvo antioxidantov sa pohybovalo v rozmedzí 4,40–23,55 µg/g. Test dlhodobej stability preukázal, že vlákna sú stabilné.

Ďalšou časťou práce bolo sledovanie cytotoxicity vybraných druhov častíc a vlákien na ľudských keratonocytoch pomocou MTT testu. Za cytotoxické neboli považované vzorky, pri ktorých viabilita buniek neklesla pod 60 %. Na základe tohto kritéria bolo vyhodnotené, že väčšina pripravených častíc nevykazovala cytotoxický efekt voči ľudským keratinocytom. Naopak prítomnosť extraktov priaznivo pôsobila na viabilitu buniek. V prípade častíc s PHB boli za cytotoxické vyhodnotené len 14% roztoky častíc prázdnych lipozómov s PHB a lipozómov s PHB s vodným extraktom zo zelenej a praženej kávy. Viabilita buniek pri testovaní cytotoxicity vlákien neklesla pod hranicu 60 %, čím bolo preukázané, že vlákna nie je možné považovať za cytotoxické.

Na záver práce boli z častíc a extraktov s najvyšším SPF pripravené emulzie typu O/V a gély. Bolo stanovené SPF emulzií a extraktov a k vybraným typom bol pridaný 5 a 10% prídavok organického UV filtra homosalát. Spolu bolo teda pripravených 13 typov emulzií a 3 typy gélov. Najvyššie SPF bolo stanovené v základe emulzie s prídavkom 10 % homosalátu a v emulzii, ktorá obsahovala 40% etanolový extrakt zo zelenej kávy, zakoncentrované prázdne lipozómy s PHB, zakoncentrované lipozómy s PHB so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy a 10 % homosalátu. Z pripravených emulzií boli vybrané 3 typy, ktoré boli testované na dobrovoľníkoch, ktorí hodnotili kritériá ako parfumácia, vzhľad, vstrebateľnosť či hydratačné schopnosti. Medzi tieto emulzie patrili základ emulzie, ktorá slúžila ako referencia, emulzia s 10 % homosalátu a emulzia, ktorá obsahovala 40% etanolový extrakt zo zelenej kávy, zakoncentrované prázdne lipozómy s PHB, zakoncentrované lipozómy s PHB so 40% etanolovým extraktom zo zelenej kávy a 10 % homosalátu. Dotazník sa tiež zameriaval na navrhované vylepšenia respondentmi. Zároveň bolo respondentom stanovené prirodzené SPF ich pokožky, teda dĺžka pobytu na slnečnom žiarení, ktorá sa pohybovala v rozmedzí 16,5–20,3 minúty. Bola tiež overená stabilita testovaných emulzií pomocou analytickej centrifúgy. Všetky testované emulzie boli vyhodnotené ako stabilné.

Ako možné využitie poznatkov z tejto diplomovej práce je tak, ako bolo už v práci načrtnuté, použitie extraktov a častíc s enkapsulovanými extraktmi k vytvoreniu emulzií, ktoré by slúžili ako opaľovacie prípravky. Tieto emulzie by boli vhodné skôr pre obdobie jeseň–jar, nakoľko sa jedná o masnejšie produkty s pomerne vyššou hydratačnou schopnosťou alebo produkty pre spotrebiteľov so suchou a citlivou pleťou. Tieto produkty by okrem prírodných UV filtrov mohli obsahovať ďalšie buď organické, alebo anorganické UV filtre. Kombináciou rôznych typov UV filtrov by došlo k synergickému účinku, a teda nielen k nárastu SPF faktora, ktorý chráni pred UVB, ale aj k zabezpečeniu ochrany voči UVA žiareniu. Zároveň by boli tieto produkty s pozvoľným uvoľňovaním aktívnych látok po aplikácii na pokožku, čím by sa predĺžila doba potrebná pre opakované nanášanie produktu. Okrem toho by emulzie s enkapsulovanými extraktmi z praženej a zelenej kávy mohli mať potenciál ako samoopaľovacie prípravky prípadne BB krémy, pretože tieto emulzie majú prirodzene hnedé zafarbenie.

Ďalej by mohli byť vytvorené gély s prídavkom prírodných aktívnych látok s vysokým obsahom antioxidantov. Tie by mohli nájsť uplatnenie ako roll-on na očné okolie, ktorý by nielen zmierňoval opuchy svojím chladivým efektom, ale tiež zabraňovali oxidačným reakciám. Gély, v prípade zvýšenia SPF faktora, majú potenciál slúžiť tiež ako opaľovacie prípravky, najmä v letných mesiacoch. Dôvodom je chladivý efekt, ktorý by nielenže pôsobil príjemne na pokožke, ale by aj zmierňoval erytém kože.

Ako ďalší postup v prípade vývoja vlákenných materiálov navrhujeme pridať do vlákien väčšiu koncentráciu extraktov pre zvýšenie antioxidačného účinku a zvýšenie SPF faktora. Vlákna by slúžili klasicky ako krycie materiály pre pokožku, mohli by byť z nich vytvorené masky na tvár, ktoré by sa prikladali a uvoľňovali by sa z nich aktívne látky. Na základe výsledkov práce bolo zistené, že samotné PHB slúži tiež ako UV filter. Za predpokladu narušenia štruktúry nanovlákn tak, aby bol z nich získaný sypký materiál, by mohli byť využité ako zahusťovadlá do krémov s dvojakou funkciou. Prvou by bolo zabezpečenie ochrany voči UV žiareniu a druhou by bolo postupné uvoľňovanie aktívnych látok zo štruktúry vlákien, čo by znamenalo zvýšenie stability aktívnych látok a teda aj samotných emulzií.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H, 2000. ISBN 80-860-2280-3
- [2] HUET, F., M. SEVERINO-FREIRE, J. CHÉRET, O. GOUIN, J. PRANEUF, O. PIERRE, L. MISERY a C. LE GALL-IANOTTO. Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2018, **89**(3), 213-218 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.015. ISBN 10.1016/j.jdermsci.2017.11.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181117309866>
- [3] CRAYTHORNE, Emma a Firas AL-NIAMI. How to examine a patient with skin cancer. *Medicine* [online]. 2017, **45**(7), 429-430 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.04.002. ISBN 10.1016/j.mpmed.2017.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303917300920>
- [4] AFIFI, L., L. SAEED, L.A. PASCH, H.G. HUDDLESTON, M.I. CEDARS, L.T. ZANE a K. SHINKAI. Association of ethnicity, Fitzpatrick skin type, and hirsutism: A retrospective cross-sectional study of women with polycystic ovarian syndrome. *International Journal of Women's Dermatology* [online]. 2017, **3**(1), 37-43 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.ijwd.2017.01.006. ISBN 10.1016/j.ijwd.2017.01.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352647517300060>
- [5] TONČIĆ, Ružica Jurakić, Sanja KEZIĆ, Suzana Ljubojević HADŽAVDIĆ a Branka MARINOVIĆ. Skin barrier and dry skin in the mature patient. *Clinics in Dermatology* [online]. 2018, **36**(2), 109-115 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.10.002. ISBN 10.1016/j.clindermatol.2017.10.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X1730192X>
- [6] TERZINI, Mara, Cristina BIGNARDI, Carlotta CASTAGNOLI, Irene CAMBIERI, Elisabetta M. ZANETTI a Alberto L. AUDENINO. Dermis mechanical behaviour after different cell removal treatments. *Medical Engineering & Physics* [online]. 2016, **38**(9), 862-869 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.medengphy.2016.02.012. ISBN 10.1016/j.medengphy.2016.02.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350453316300066>
- [7] SARANGARAJAN, R., S. Meera, R. Rukkumani, P. Sankar a G. Anuradha. Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2017, **10**(12), 1111-1116 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.10.017. ISBN 10.1016/j.apjtm.2017.10.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764517311999>
- [8] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4
- [9] LEE, Ga Hyun, Sung June LEE, Sang Won JEONG, Hyun-Chul KIM, Ga Young PARK, Se Geun LEE a Jin Hyun CHOI. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **24**(143), 511-517 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.060. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776516302156>
- [10] RAFFA, Demetrio, Benedetta MAGGIO, Maria Valeria RAIMONDI, Fabiana PLESCIA a Giuseppe DAIDONE. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2017, **33**(142), 213-228 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.034. ISBN 10.1016/j.ejmech.2017.07.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417305561>

- [11] MARTINI, Daniela, Cristian DEL BO', Marisa PORRINI, Salvatore CIAPPELLANO a Patrizia RISO. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2017, **27**(48), 1-8 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.06.002. ISBN 10.1016/j.jnutbio.2017.06.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286316306714>
- [12] ESTEBAN-FERNÁNDEZ, Adelaida, Irene ZORRAQUÍN-PEÑA, Dolores GONZÁLEZ DE LLANO, Begoña BARTOLOMÉ a M. Victoria MORENO-ARRIBAS. The role of wine and food polyphenols in oral health. *Trends in Food Science & Technology*[online]. 2017, **27**(69), 118-130 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.09.008. ISBN 10.1016/j.tifs.2017.09.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417304521>
- [13] HOSSEN, Md. Sakib, Md. Yousuf ALI, M.H.A. JAHURUL, Mohamed M. ABDEL-DAIM, Siew Hua GAN a Md. Ibrahim KHALIL. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacological Reports*[online]. 2017, **69**(69), 1194-1205 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.07.002. ISBN 10.1016/j.pharep.2017.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734114017302621>
- [14] COSTA, Chiara, Aristidis TSATSAKIS, Charalampos MAMOULAKIS, et al. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2017, **55**(110), 286-299 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.023. ISBN 10.1016/j.fct.2017.10.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151730621X>
- [15] KY, I., A. Le Floch, L. Zeng, L. Pechamat, M. Jourdes a P.-L. Teissedre. Tannins. *Encyclopedia of Food and Health*[online]. 2016, 2016, , 247-255 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8. ISBN 10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472006838>
- [16] HUANG, Qianqian, Xiuli LIU, Guoqi ZHAO, Tianming HU a Yuxi WANG. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition* [online]. 2017 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.004. ISBN 10.1016/j.aninu.2017.09.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405654517301348>
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., uprav. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-22-8
- [18] AJMALA Shireen, P., V.M. Abdul Mujeeb a K. Muraleedharan. Theoretical insights on flavanones as antioxidants and UV filters: A TDDFT and NLMO study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2017, **30**(170), 286-294 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.021. ISBN 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417301902>
- [19] *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 1003 s
- [20] RADICE, Matteo, Stefano MANFREDINI, Paola ZIOSI, Valeria DISSETTE, Piergiacomo BUSO, Arianna FALLACARA a Silvia VERTUANI. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia* [online]. 2016, **114**, 144-162 [cit. 2018-03-14]. DOI:

- 10.1016/j.fitote.2016.09.003. ISBN 10.1016/j.fitote.2016.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1630377X>
- [21] DING, Xuelu, Stefanie GERBIG, Bernhard SPENGLER a Sabine SCHULZ. Reactive low temperature plasma ionization mass spectrometry for the determination of organic UV filters in personal care products. *Talanta* [online]. 2018, **59**(178), 780-787 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.10.021. ISBN 10.1016/j.talanta.2017.10.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017310603>
- [22] SAMBANDAN, Divya R. a Desiree RATNER. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2011, **64**(4), 748-758 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.01.005. ISBN 10.1016/j.jaad.2010.01.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962210000228>
- [23] VOLPE, Angela, Michele PAGANO, Giuseppe MASCOLO, Paola GRENNI a Simona ROSSETTI. Biodegradation of UV-filters in marine sediments. *Science of The Total Environment* [online]. 2017, **575**(1), 448-457 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.001. ISBN 10.1016/j.scitotenv.2016.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716321660>
- [24] GALANAKIS, Charis M., Philippos TSATALAS a Ioannis M. GALANAKIS. Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2018, **9**, 160-168 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.eti.2017.12.002. ISBN 10.1016/j.eti.2017.12.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186417303322>
- [25] TOSATO, Maira Gaspar, Dalila Elisabet ORALLO, María Florencia FANGIO, Virginia DIZ, Lelia Elina DICELIO a María Sandra CHURIO. Nanomaterials and natural products for UV-photoprotection. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials* [online]. 2016, 2016, **3**, 359-392 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/B978-0-323-42861-3.00012-1. ISBN 10.1016/B978-0-323-42861-3.00012-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323428613000121>
- [26] ETTLER, Karel. *Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového záření*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004, 133 s.
- [27] MALSAWMTLUANGI, C., Kumar Nath DEEPAK a Jamatia ITALINI. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013, 3(09), 150-151. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3925
- [28] ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, xv, 502, [2] s
- [29] RAMALAKSHMI, R. a L. JAGAN MOHAN RAO. *Recent Trends in Soft Beverages*. India: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 978-0-85709-009-6.
- [30] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1
- [31] WORKU, Mohammed, Bruno DE MEULENAER, Luc DUCHATEAU a Pascal BOECKX. Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method. *Food Research International* [online]. 2018, **25**(105), 278-285 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.016. ISBN 10.1016/j.foodres.2017.11.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917307858>
- [32] HEEGER, Andrea, Agnieszka KOSIŃSKA-CAGNAZZO, Ennio CANTERGIANI a Wilfried ANDLAUER. Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chemistry* [online]. 2017, **41**(221), 969-975 [cit. 2017-12-18].

- DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.067. ISBN 10.1016/j.foodchem.2016.11.067. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319161>
- [33] Káva - čo nevíete o kofeínovom nápoji našom každodennom (I). *FitnessTreneri.sk* [online]. Redakcia FitnessTreneri, 2013 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://www.fitnesstreneri.canubia.sk/zakladne-informacie/107/kava-co-neviete-o-kofoinovom-napoji-nasom-kazdodennom-i>
- [34] RAY, Sohini, Utpal RAYCHAUDHURI a Runu CHAKRABORTY. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* [online]. 2016, **4**(13), 76-83 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.fbio.2015.12.009. ISBN 10.1016/j.fbio.2015.12.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221242921530033X>
- [35] CHENG, Yu-Shen, Pei-Min LU, Chun-Yin HUANG a Jia-Juan WU. Encapsulation of lycopene with lecithin and  $\alpha$ -tocopherol by supercritical antisolvent process for stability enhancement. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2017, **29**(130), 246-252 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.12.021. ISBN 10.1016/j.supflu.2016.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616302972>
- [36] WANI, Touseef Ahmed, Farooq Ahmad MASOODI a Idrees Ahmed WANI. The possible nomenclature of encapsulated products. *Food Chemistry* [online]. 2017, **41**(234), 119-120 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.121. ISBN 10.1016/j.foodchem.2017.04.121. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461730701X>
- [37] KATZ, Linda M., Kapal DEWAN a Robert L. BRONAUGH. Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*[online]. 2015, **85**, 127-137 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.fct.2015.06.020. ISBN 10.1016/j.fct.2015.06.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515300041>
- [38] MIHRANYAN, Albert, Natalia FERRAZ a Maria STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science* [online]. 2012, **57**(5), 875-910 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. ISBN 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642511001046>
- [39] PANDEY, Rajan Kumar a Vijay Kumar PRAJAPATI. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **107**(Part A), 1278-1293 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017333949>
- [40] PARVEEN, Shazia, Abdul Hamid WANI, Mohammad Ashraf SHAH, Henam Sylvia DEVI, Mohd Yaqub BHAT a Jahangir Abdullah KOKA. Preparation, characterization and antifungal activity of iron oxide nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*[online]. 2018, **115**, 287-292 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.068. ISBN 10.1016/j.micpath.2017.12.068. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017305624>
- [41] SCHMALZ, Gottfried, Reinhard HICKEL, Kirsten L. VAN LANDUYT a Franz-Xaver REICHL. Nanoparticles in dentistry: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry: Dental Materials* [online]. 2017, **33**(11), 1298-1314 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.dental.2017.08.193. ISBN 10.1016/j.dental.2017.08.193. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564117307686>

- [42] BONECHI, Claudia, Alessandro DONATI, Gabriella TAMASI, Gemma LEONE, Marco CONSUMI, Claudio ROSSI, Stefania LAMPONI a Agnese MAGNANI. Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry* [online]. 2018, **233**, 55-63 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.bpc.2017.11.003. ISBN 10.1016/j.bpc.2017.11.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462217303332>
- [43] *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research: LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS* [online]. 2012, **3**(2) [cit. 2018-04-07]. ISSN 2229-4619. Dostupné z: <http://www.technicaljournalonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [44] BRYŁA, Anna, Grażyna LEWANDOWICZ a Wojciech JUZWA. Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering* [online]. 2015, **167**(Part B), 189-195 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877415003349>
- [45] MÍČKOVÁ, A., K. TOMÁNKOVÁ, H. KOLÁŘOVÁ, et al. Ultrasonic Shock-Wave as a Control Mechanism for Liposome Drug Delivery System for Possible Use in Scaffold Implanted to Animals with Iatrogenic Articular Cartilage Defects. *ACTA VET. BRNO* [online]. 2008, **77**, 285-289 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.2754/avb200877020285. ISBN 10.2754/avb200877020285. Dostupné z: <http://actavet.vfu.cz/77/2/0285/>
- [46] R. KHAN, David. The use of Nanocarriers for Drug Delivery in Cancer Therapy David R. Khan. *Journal of Cancer Science & Therapy* [online]. 2010, **2**, 58-62 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.4172/1948-5956.1000024. ISBN 10.4172/1948-5956.1000024. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/ArchiveJCST/2010/May/03/JCST-02-058.php>
- [47] LI, Riwang, Li DENG, Zhengwei CAI, Shuyun ZHANG, Kun WANG, Lihua LI, Shan DING a Changren ZHOU. Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **80**, 156-164 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.136. ISBN 10.1016/j.msec.2017.05.136. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116318343>
- [48] HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy. *Remedia* [online]. 2006, č. 16 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalnilekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [49] VAN DER VEEN, Jelske N., John P. KENNELLY, Sereana WAN, Jean E. VANCE, Dennis E. VANCE a René L. JACOBS. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2017, **1859**(9, Part B), 1558-1572 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006. ISBN 10.1016/j.bbamem.2017.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273617301220>
- [50] FERNANDES, Gabriel D., Rosana M. ALBERICI, Gustavo G. PEREIRA, Elaine C. CABRAL, Marcos N. EBERLIN a Daniel BARRERA-ARELLANO. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2012, **135**(3), 1855-1860 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.072. ISBN 10.1016/j.foodchem.2012.06.072. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461201045X>



- [51] ZERBINATI, Chiara a Luigi IULIANO. Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*[online]. 2017, **111**, 151-155 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013. ISBN 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917302162>
- [52] LAOUINI, A., C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset a H. Fessi. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* [online]. 2012, **1**, 147-168 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020. ISBN 10.1166/jcsb.2012.1020. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jcsb.2012.1020>
- [53] LAN, Ching-Hung a Yi-Ming SUN. Influence of the surface properties of nano-silica on the dispersion and isothermal crystallization kinetics of PHB/silica nanocomposites. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2017, **199**, 88-97 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2017.06.044. ISBN 10.1016/j.matchemphys.2017.06.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025405841730487X>
- [54] ZHIJIANG, Cai, Xu YI, Yang HAIZHENG, Jianru JIA a Yuanpei LIU. Poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate blend nanofiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **58**, 757-767 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.048. ISBN 10.1016/j.msec.2015.09.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311530374X>
- [55] DEEPAK, Venkataraman, Suresh babu RAM KUMAR PANDIAN, Kalimuthu KALISHWARALAL a Sangiliyandi GURUNATHAN. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(24), 6644-6646 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.057. ISBN 10.1016/j.biortech.2009.06.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409007135>
- [56] KAI, Dan, Hui Moon CHONG, Li Ping CHOW, et al. Strong and biocompatible lignin /poly (3-hydroxybutyrate) composite nanofibers. *Composites Science and Technology* [online]. 2018, **158**, 26-33 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.compscitech.2018.01.046. ISBN 10.1016/j.compscitech.2018.01.046. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266353817328804>
- [57] ZUIDAM, Nicolaas Jan a Viktor A NEDOVIC'. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. 1. Serbia: Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010. ISBN 978-1-4419-1007-3
- [58] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1), 102 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISBN 10.1186/1556-276X-8-102. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [59] VEMURI, Sriram a C.T RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae* [online]. 1995, **70**(2), 95-111 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/0031-6865(95)00010-7. ISBN 10.1016/0031-6865(95)00010-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031686595000107>

- [60] JOBMANN, Monika a Gerald RAFLER. Submicronparticles from biodegradable polymers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **242**(1-2), 213-217 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00160-6. ISBN 10.1016/S0378-5173(02)00160-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302001606>
- [61] STOCKERT, Juan C., Alfonso BLÁZQUEZ-CASTRO, Magdalena CAÑETE, Richard W. HOROBIN a Ángeles VILLANUEVA. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* [online]. 2012, **114**(8), 785-796 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006. ISBN 10.1016/j.acthis.2012.01.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128112000190>
- [62] PIACENTINI, Emma. Encapsulation Efficiency. *Encyclopedia of Membranes* [online]. 2016, 2016-8-31, , 26-72 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1007/978-3-662-44324-8\_1945. ISBN 10.1007/978-3-662-44324-8\_1945. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-44324-8\\_1945](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-44324-8_1945)
- [63] NII, Tomoko a Fumiyoshi ISHII. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2005, 2016-8-31, **298**(1), 198-205 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.04.029. ISBN 10.1016/j.ijpharm.2005.04.029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305003029>
- [64] ZHANG, Yibang, Weibeng NG, Xue FENG, Fangying CAO a Huaxi XU. Lipid vesicular nanocarrier: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **516**(1-2), 225-230 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.011. ISBN 10.1016/j.ijpharm.2016.11.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316310638>
- [65] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. Kašpárová, J. Krejčí a P. Vltavská. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2014, č. 108, s. 479-482. Dostupné z: [http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2014\\_05\\_479-482.pdf](http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf)
- [66] INSTRUMENTS, Malven. STABILITA SUZPENZÍ A DISPERZÍ – PROČ JSOU PARAMETRY JAKO VELIKOST ČÁSTIC, ZETA POTENCIÁL A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI TAK DŮLEŽITÉ?. *Chemagazín*. 2011, XXI, č. 2. Dostupné z: [http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet\\_Suspenze.pdf](http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf)
- [67] Zeta Potential Analysis using Electrophoretic Light Scattering - HORIBA. In: *HORIBA Scientific* [online]. Japan, 2016 [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/zeta-potential/>
- [68] NILGHAZ, Azadeh, Siew HOO, Wei SHEN, Xiaonan LU a Peggy P.Y. CHAN. Multilayer cell culture system supported by thread. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, **257**, 650-657 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.186. ISBN 10.1016/j.snb.2017.10.186. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517321020>
- [69] RIEBELING, Christian, Jean-Pascal PIRET, Bénédicte TROUILLER, Inge NELISSEN, Christelle SAOUT, Olivier TOUSSAINT a Andrea HAASE. A guide to nanosafety testing: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *NanoImpact*[online]. 2018, **10**, 1-10 [cit. 2018-03-16]. DOI:

- 10.1016/j.impact.2017.11.004. ISBN 10.1016/j.impact.2017.11.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452074817301180>
- [70] BONCLER, Magdalena, Marek RÓŻALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Anna PODSEDEK a Cezary WATALA. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2014, **69**(1), 9-16 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.09.003. ISBN 10.1016/j.vascn.2013.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871913003006>
- [71] Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *BioTek* [online]. Vermont USA, 2009 [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: [https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/Quantification%20of%20Cell%20Viability%20App%20Note.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/Quantification%20of%20Cell%20Viability%20App%20Note.pdf)
- [72] BARTOŠ, Tomáš, Michal ŠKAREK, Pavel ČUPR, Petra KOSUBOVÁ a Ivan HOLOUBEK. Genotoxic activity of a technical toxaphene mixture and its photodegradation products in SOS genotoxicity tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2005, **565**(2), 113-120 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2004.09.007. ISBN 10.1016/j.mrgentox.2004.09.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571804002761>
- [73] MUTLU, Gozde, Semih CALAMAK, Kezban ULUBAYRAM a Eylem GUVEN. Curcumin-loaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2018, **43**, 185-193 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.09.017. ISBN 10.1016/j.jddst.2017.09.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224717301934>
- [74] DEEPAK, Amar, Amit Kumar GOYAL a Goutam RATH. Nanofiber in transmucosal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2018, **43**, 379-387 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.11.008. ISBN 10.1016/j.jddst.2017.11.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224717308341>
- [75] SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today* [online]. 2010, **13**(11), 12-14 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1. ISBN 10.1016/S1369-7021(10)70199-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702110701991>
- [76] CHENG, Jie, Yesl JUN, Jianhua QIN a Sang-Hoon LEE. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2017, **114**, 121-143 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.040. ISBN 10.1016/j.biomaterials.2016.10.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961216305890>
- [77] WEN, Peng, Min-Hua ZONG, Robert J. LINHARDT, Kun FENG a Hong WU. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2017, **27**(70), 56-68 [cit. 2017-12-19]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.10.009. ISBN 10.1016/j.tifs.2017.10.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417302479>
- [78] FENGYU, Li, Zhao YONG a Song YANLIN. *Nanofibres* [online]. 1. InTech - Open Science Open Minds, 2010, s. 419-438 [cit. 2018-03-16]. ISBN 978-953-7619-86-2. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/nanofibers/core-shell-nanofibers-nano-channel-and-capsule-by-coaxial-electrospinning>

- [79] DOTTO, G.L., Santos J.M.N., Tanabe E.H., Bertuol D.A., Foletto E.L., Lima E.C. a Pavan F.A.. Chitosan/polyamide nanofibers prepared by Forcespinning® technology: A new adsorbent to remove anionic dyes from aqueous solutions. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2017, **144**, 120-129 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.01.004. ISBN 10.1016/j.jclepro.2017.01.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652617300045>
- [80] WITKOWSKA, Evelin, Tomasz SZYMBORSKI, Agnieszka KAMIŃSKA a Jacek WALUK. Polymer mat prepared via Forcespinning™ as a SERS platform for immobilization and detection of bacteria from blood plasma. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **71**, 345-350 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.10.027. ISBN 10.1016/j.msec.2016.10.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116317775>
- [81] KANIA, Patrik. Infračervená spektrometrie [online]. VŠCHT Praha [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
- [82] AUSILI, Alessio, Marina SÁNCHEZ a Juan C. GOMÉZ-FERNÁNDEZ. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* [online]. 2015, **4**, 159-170 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.3233/BSI-150104. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/275021699\\_Attenuated\\_total\\_reflectance\\_infrared\\_spectroscopy\\_A\\_powerful\\_method\\_for\\_the\\_simultaneous\\_study\\_of\\_structure\\_and\\_spatial\\_orientation\\_of\\_lipids\\_and\\_membrane\\_proteins](https://www.researchgate.net/publication/275021699_Attenuated_total_reflectance_infrared_spectroscopy_A_powerful_method_for_the_simultaneous_study_of_structure_and_spatial_orientation_of_lipids_and_membrane_proteins)
- [83] NIELLOUD, Françoise a Gilberte. MARTI-MESTRES. Pharmaceutical emulsions and suspensions. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000. ISBN 0824703049
- [84] DRAPALA, Kamil P., Daniel M. MULVIHILL a James A. O'MAHONY. A review of the analytical approaches used for studying the structure, interactions and stability of emulsions in nutritional beverage systems. *Food Structure* [online]. 2018, **16**, 27-42 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1016/j.foostr.2018.01.004. ISBN 10.1016/j.foostr.2018.01.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213329118300078>
- [85] Stanovení sedimentační stability emulzí [online]. b.r. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: [http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP\\_09\\_emulse.pdf](http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf)
- [86] The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection [online]. Wilmington, 75 Delaware: ICI Americas Inc., 1980 [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: [http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76\\_Book\\_HLB\\_ICI.pdf](http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf)
- [87] Euxyl® K 703 Preservative for cosmetics toiletries. *Lotioncrafter* [online]. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: [https://www.lotioncrafter.com/reference/tech\\_data\\_euxyl\\_k\\_703.pdf](https://www.lotioncrafter.com/reference/tech_data_euxyl_k_703.pdf)
- [88] Cetyl Alcohol. *The Chemistry Store.com* [online]. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: <https://www.chemistrystore.com/product.cgi?product=17465>
- [89] LI, Yuan, Chunhua WU, Tiantian WU, Liping WANG, Shiguo CHEN, Tian DING a Yaqin HU. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. *Journal of Food Engineering* [online]. 2018, **217**, 108-114 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.08.026. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2017.08.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877417303655>
- [90] PETRY, T., Bury D., Fautz R., et al. Review of data on the dermal penetration of mineral oils and waxes used in cosmetic applications. *Toxicology Letters* [online].

- 2017, **280**, 70-78 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.899. ISBN 10.1016/j.toxlet.2017.07.899. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427417311542>
- [91] TWEEN® 20. *Sigma-Aldrich* [online]. Nemecko [cit. 2018-04-15]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p9416?lang=en&riion=CZ>

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina)  
ATP – adenzíntrifosfát  
DLS – dynamický rozptyl svetla  
DNA/RNA – deoxy/ribonukleová kyselina  
FDA – Food and Drug Administration  
FTIR ATR – infračervená spektroskopia s ATR (Attenuated Total Reflection) kryštálom  
HLB – hydrofilno-lipofilná rovnováha  
IR – infračervené žiarenie  
LUV – veľké unilamelárne vezikuly  
MLV – veľké multilamelárne vezikuly  
MTT – tetrazoliová soľ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, methyl-thiazolyl-tetrazolium  
MVV – multivezikulárne vezikuly  
NAD(P)H – nikotínamid adenín dinukleotid fosfát  
OLV – veľké oligolamelárne vezikuly  
PA – polyamid  
PAN – polyakrylonitril  
PEO – polyetylénoxid  
PET – polyetyléntereftalát  
PHB – poly(3-hydroxybutyrát)  
PLA – kyselina polymliečna  
PTFE – polytetrafluóretylén  
PVDF – polyvinylidénfluorid  
ROS – „Reactive oxygen species“ reaktívne častice kyslíka  
SDS – dodecylsírán sodný  
SEM – skenovacia elektrónová mikroskopia  
SPF – ochranný faktor proti slnečnému žiareniu  
SUV – malé unilamelárne vezikuly  
TEAB – tetraetylamonium bromid  
UV žiarenie – ultrafialové žiarenie  
UVA – ultrafialové žiarenie v oblasti 320–400 nm  
UVB – ultrafialové žiarenie v oblasti 290–320 nm  
UVC – ultrafialové žiarenie v oblasti 200–280 nm  
VIS – viditeľné žiarenie v oblasti 400–800 nm  
ZP – zeta potenciál

## 9 PRÍLOHY

### 9.1 Dotazník

#### ÚDAJE O RESPONDENTOVI

##### Pohlavie

Žena

Muž

##### Vek

19–25

26–30

31–35

##### Váš typ kože

Normálna

Mastná

Suchá

Zmiešaná

##### Popíšte Vaše problémy – sklony k podráždeniu

Žiadne

Stredne

Málo

Veľmi

##### Popíšte Vaše problémy – nadmerná dehydratácia

Žiadna

Stredne

Málo

Veľmi

##### Aký je Váš fototyp kože?

Fototyp I.

Fototyp III.

Fototyp II.

Fototyp IV.

##### Používate pravidelne hydratačné produkty?

Pravidelne

Takmer nikdy

V prípade potreby

Nepoužívam vôbec

##### Používate pravidelne produkty s SPF faktorom?

Používam denne

Takmer nikdy

Len cez leto

Nepoužívam vôbec

#### HODNOTENIE TESTOVANÝCH EMULZIÍ

##### Ako ste boli spokojný s aplikáciou krémov na kožu?

*Pozn. hodnotenie ako v škole tzn. za najlepšie hodnotenie sa považuje 1, za najhoršie 5.*

##### Hodnotenie lepivosti krémov:

Krém č. 1:

1

2

3

4

5

Krém č. 2:

1

2

3

4

5

Krém č. 3:

1

2

3

4

5

##### Hodnotenie vstrebateľnosti krému

Krém č. 1:

1

2

3

4

5

Krém č. 2:

1

2

3

4

5

Krém č. 3:

1

2

3

4

5

### Hodnotenie roztierateľnosti krému:

Krém č. 1:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 2:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 3:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

### Ako hodnotíte parfumáciu?

Krém č. 1:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 2:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 3:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

### Ako hodnotíte hydratačné vlastnosti krému?

Krém č. 1:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 2:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 3:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

### Ako hodnotíte vzhľad krému

Krém č. 1:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 2:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Krém č. 3:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

## VYLEPŠILI BY STE NIEČO NA TESTOVANÝCH EMULZIÁCH?

Krém č. 1:

- Vzhľad krému
- Lepivosť krému
- Vstrebateľnosť krému
- Roztierateľnosť krému
- Parfumáciu krému
- Hydratačné vlastnosti
- Iné .....
- Nič

Krém č. 2:

- Vzhľad krému
- Lepivosť krému
- Vstrebateľnosť krému
- Roztierateľnosť krému
- Parfumáciu krému
- Hydratačné vlastnosti
- Iné .....
- Nič

Krém č. 3:

- Vzhľad krému
- Lepivosť krému
- Vstrebateľnosť krému
- Roztierateľnosť krému
- Parfumáciu krému
- Hydratačné vlastnosti
- Iné .....
- Nič

*~Ďakujem za Vašu ochotu a Váš čas~*