# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY


# VYUŽITÍ KOMPLEXNÍCH EXTRAKTŮ Z ROSTLIN A MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETICE

USE OF COMPLEX EXTRACTS FROM PLANT AND MICROORGANISMS IN FOODS AND COSMETICS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS


AUTOR PRÁCE — Ing. Renata Uhlířová

AUTHOR

ŠKOLITEL — prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

SUPERVISOR



BRNO 2022

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

**ING. RENATA UHLÍŘOVÁ**

# VYUŽITÍ KOMPLEXNÍCH EXTRAKTŮ Z ROSTLIN A MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETICE

Autoreferát dizertační práce k získání vědecké hodnosti „Doktor“ ve zkratce „PhD.

BRNO 2022

Dizertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

Uchazeč: Ing. Renata Uhlířová
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Oponenti:

Autoreferát byl odeslán dne:

Obhajoba dizertační práce se koná dne ..... v ..... hodin před komisí pro obhajoby dizertačních prací v zasedací místnosti číslo ..... na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

S dizertační prací je možné se obeznámit na děkanátu Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně.

## ABSTRAKT

Cílem předložené disertační práce byla optimalizace extrakce a charakterizace extraktů z vybraných rostlin a mikroorganismů, především mikrořas, sinic a karotenoidních kvasinek. Při optimalizaci extrakcí byl sledován vliv charakteru extrakčního činidla, dezintegrace mikrobiálních buněk a vliv speciálních technik, které mohou extrakce usnadnit (sondový a vanový ultrazvuk a mikrovlny). V rámci charakterizace bylo s přihlédnutím na zdrojový materiál analyzováno složení připravených extraktů jak spektrofotometricky, tak pomocí kapalinové a plynové chromatografie. Bylo zjištěno, že nejvhodnější extrakční postup se lišil v závislosti na typu materiálů. U vzorků bylin bylo dosaženo nejlepších obsahů aktivních látek při využití extrakce usnadněné pomocí mikrovln, naopak u sinic při extrakci po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Nejvhodnější metodou po extrakci aktivních látek z kvasinek byla kombinace DMSO, ethanolu a hexanu.

Dále byl sledován vliv extraktů na mikrobiální kultury bakterií (*E. coli*, *S. epidermidis, C. acnes*) a kvasinek (*C. glabrata*). Pro sledování cytotoxicity extraktů byly využity testy cytotoxicity MTT a LDH na lidských buněčných liniích HaCaT a Caco2. Antimikrobiální testy prokázaly jak antimikrobiální, tak baktericidní a fungicidní účinek řady extraktů, především esenciálních olejů z levandule lékařské a máty peprné. Naopak při testech cytotoxicity bylo prokázáno, že většina extraktů je v rozmezí do 10 obj.% bezpečná pro využití v potravinářství a kosmetice.

Za účelem prodloužení stability byly připravené extrakty enkapsulovány do liposomálních částic obohacených o polymer PHB (0–100 %). U částic byla sledována jejich velikost, polydisperzitní index a koloidní stabilita a také morfologie pomocí kryoTEM. Extrakty byly enkapsulovány do částic a charakterizovány. U vybraných vzorků byla dále sledována genotoxicita pomocí SOS chromotestu. Jako nevhodnější částice pro enkapsulaci připravených extraktů byly vyhodnoceny klasické liposomy a liposomy s 20 % přídavkem PHB (PHB20). Připravené částice vykazovaly výbornou stabilitu a vysokou enkapsulační účinnost. Testy genotoxicity na modelovém organismu *E. coli* neprokázaly genotoxický vliv vzorků.

Jako další možnost stabilizace vybraných aktivních látek byla v práci využita nanovlákna připravená z polymeru PHB a želatiny. Vlákna byla charakterizována pomocí SEM a dále bylo sledováno postupné uvolňování aktivních látek ze struktury vláken. Jako nejvhodnější pro další práci byly na základě analýz zvoleny metody forcespinning a elektrospinning. Díky integraci extraktů do nanovláken bylo docíleno postupného uvolňování aktivních látek.

V rámci práce byla navržena a vytvořena řada aplikačních forem z připravených materiálů pro využití v potravinářství a kosmetice. Přídavek extraktu ze zelené kávy a karotenogenních kvasinek k základní emulzi vedl ke zvýšení stability a celkově ke zlepšení vlastností oproti emulznímu základu. Využití emulzí

s kávovými a kvasinkovými extrakty by bylo vhodné především jako opalovací krémy, při přídavku extraktu ze sinice *Spirulina* poté jako denní či noční krémy proti vráskám. Energetické nápoje nového typu na bázi kávy s přídavkem enkapsulovaných rostlinných extraktů umožnily postupné uvolňování kofeinu a antioxidantů.

**KLÍČOVÁ SLOVA**

Extrakty, rostliny, mikrořasy, sinice, karotenogenní kvasinky, liposomy, PHB, nanovlákna, antimikrobiální účinek, MIC, MBC, cytotoxicita, HaCaT, Caco2

**KEY WORDS**

Extracts, plant, microalgae, cyanobacteria, carotenogenic yeast, liposomes, PHB, nanofibers, antimicrobial effect, MIC, MBC, cytotoxicity, HaCaT, Caco2

ISBN 80-214-

ISSN 1213-4198

**OBSAH**

1 Teoretická část ..... 9
1.1 Oxidační stres ..... 9
1.2 Fotoprotekce ..... 9
1.3 Antioxidanty ..... 10
1.4 Biologicky aktivní látky z přírodních zdrojů ..... 10
1.4.1 Káva ..... 10
1.4.2 Mikrořasy ..... 10
1.4.3 Karotenogenní kvasinky ..... 11
1.5 Metody extrakce aktivních látek z přírodního materiálu ..... 11
1.5.1 Extrakce mezi pevnou látkou a kapalinou („Solid-liquid extraction–SLE“) ..... 11
1.5.2 Extrakce dle Folche ..... 12
1.5.3 Soxhletova extrakce ..... 12
1.5.4 Extrakce s pomocí ultrazvuku ..... 12
1.5.5 Extrakce s pomocí mikrovln ..... 13
1.6 Metody enkapsulace využívané v potravinářství a kosmetice ..... 13
1.6.1 Liposomy ..... 13
1.6.2 Nanovlákna ..... 14
1.7 Metody charakterizace nanostruktur ..... 14
1.7.1 Toxicita nanostruktur ..... 15
1.7.2 Antimikrobiální testy ..... 16
1.8 Vybrané typy aplikačních forem přírodních extraktů ..... 16
2 Cíle dizertační práce ..... 18
3 Experimentální část ..... 19
3.1 Látky použité k přípravě extraktů a jejich enkapsulaci ..... 19
3.2 Použité mikroorganismy ..... 19
3.3 Použité buněčné kultury ..... 19
3.4 Kultivace mikrořas, sinic a karotenogenních kvasinek ..... 19
3.5 Metody extrakce aktivních látek z přírodních extraktů ..... 20
3.1 Metody stanovení základních charakteristik extraktů ..... 21
3.2 Příprava částic ..... 22
3.3 Analýza částic ..... 23

3.4 Příprava nanovláken ..... 23
3.5 Analýza nanovláken ..... 23
3.6 Aplikace do potravinářství a kosmetiky ..... 23
3.7 Kosmetické formulace ..... 24
3.8 Statistická analýza ..... 24
4 Výsledky a diskuze ..... 25
4.1 Optimalizace přípravy částic ..... 25
4.2 Optimalizace přípravy nanovláken ..... 28
4.3 Charakterizace extraktů ..... 29
4.1 Enkapsulace extraktů ..... 32
4.2 Testování cytotoxicity ..... 33
4.3 Aplikace extraktů ..... 36
5 Závěr ..... 39
6 Bibliografie ..... 43
7 Životopis ..... 57
8 Publikace ..... 58

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 OXIDAČNÍ STRES

Oxidativní stres je popisován jako stav, kdy je buňka vystavena příliš velkému množství reaktivních částic kyslíku (ROS – „reactive oxygen species“) či dusíku (RNS – „reactive nitrogen species“) a obranné mechanismy je již nezvládají účinně eliminovat. V tomto případě dochází k oxidativnímu poškození jak makromolekul, tak i tkání [1]. Jak reaktivní částice kyslíku, tak dusíku jsou běžnou součástí zdravého metabolismu buňky. Oxidativní i redukční procesy jsou nezbytné pro správnou buněčnou signalizaci. Nadbytečná produkce těchto reaktivních částic je toxická. Projevuje se cytostatickým účinkem, poškozením membrán a aktivací procesů způsobujících buněčnou smrt, jako je apoptóza nebo nekróza [2]. Kromě endogenního původu oxidativního stresu mohou být příčiny tvorby ROS a RNS také exogenní. K nim patří především znečištění vody a vzduchu, cigaretový kouř, alkohol, těžké a přechodové kovy (železo, měď, kobalt, chrom, kadmium, rtuť, olovo a arsen), některá léčiva (cyklosporiny, gentamycin, bleomycin) a průmyslová rozpouštědla [3]. Dále mohou být radikály tvořeny při vaření na přepáleném tuku a při uzení masa, použitím pesticidů v zemědělství, vystavení vysoké teplotě a také při vystavení organismu nadměrné dávce ultrafialového záření [4]. Pro ochranu organismů využívajících k respiraci kyslík vznikly mechanismy obrany před těmito nežádoucími vlivy. Ty zahrnují enzymatické antioxidanty, např. superoxiddismutázu (SOD), glutathion-peroxidázu (GPx), glutathion-reduktázu a katalázu, a rovněž neenzymatické antioxidanty, jako je např. glutathion (GSH), další molekuly antioxidantů jako askorbát a vitamín E fungují jako sekundární obrana proti oxidativnímu stresu [5].

## 1.2 FOTOPROTEKCE

Sluneční záření dopadající na zemský povrch je složeno z UVB (280–320 nm), UVA (320–400 nm), viditelné a infračervené složky. Germicidní UVC složka ultrafialového záření je pohlcena ozonovou vrstvou v atmosféře [6]. UVA záření hraje důležitou roli v předčasném stárnutí a tvorbě rakoviny vlivem záření a zvyšuje uvolňování zánětlivých faktorů jako je IL10 z keratinocyty. Dále má vliv na zvýšenou expresi zánětlivých proteinů jako TNFα, IL1α, IL6 a IL8 [7]. Akutní projevy UVB záření zahrnují spálení, pigmentaci, potlačení získané a zesílení vrozené imunity a redukci krevního tlaku způsobenou UVA zářením. Všechny tyto projevy začínají na molekulární úrovni, jako poškození molekul DNA, tvoření ROS, melanogenezi a v neposlední řadě vedou k apoptóze [8]. Jediným všeobecně uznávaným pozitivním projevem UV záření na kožní buňky je tvorba vitaminu D [9].

Kromě přirozeně se vyskytujících foto-ochranných vlivů, jako je atmosféra, zeměpisná délka a šířka, denní doba, mraky, znečištění a stín, je lidské tělo do jisté míry schopno se ochránit před škodlivými vlivy UV záření samo. Jelikož toto

záření neproniká výrazně hluboko, je právě kůže ochrannou vrstvou, která chrání vnitřní orgány před poškozením. Kůže pak molekuly, které absorbují energii UV záření (DNA a proteiny). K jejich ochraně je v epidermis melanin. Jeho velké molekuly zhášejí ROS a zeslabují průchod UV záření a viditelného světla do kůže tím, že jej rozptylují, fyzikálně blokují a přeměňují absorbovanou energii na teplo. Dalšími ochrannými molekulami v těle jsou hem, porfyriny a voda [9].

## 1.3 ANTIOXIDANTY

Jako antioxidant je označována sloučenina, která je schopna již v malých koncentracích chránit oxidovatelný substrát před volnými radikály a následnou oxidací. Jako substrát schopný oxidace můžeme označit téměř všechno (kromě vody), co je obsažené v potravě a živých organismech (proteiny, lipidy, sacharidy a DNA) [2]. Mezi antioxidanty patří řada různých sloučenin a kovů, proto lze antioxidanty rozdělit do různých kategorií podle struktury, výskytu, rozpustnosti, mechanismu účinku a kinetiky [10].

## 1.4 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Přestože byliny nejsou považovány za významný zdroj živin, poskytují nám řadu zdraví prospěšných látek. Jejich účinek může mít řadu podob například antioxidační [11], [12], antibakteriální [12], [13]. [14], [15], antimykotický [16], antivirový [17], [18], protizánětlivý [12], [19], protirakovinný, antimutagenní a imunomodulační efekt [20]. Zdrojový materiál pro získání aktivních látek bývá živočišného či rostlinného původu (zvířata, ryby [21], rostliny [22] a řasy [23]).

### 1.4.1 Káva

Zelené kávové boby, které se praží, drtí a vaří, aby vznikl oblíbený nápoj, jsou semena z plodu stromu původně rostoucího v Afrických lesích. Postupně se však jeho pěstování rozšířilo do rovníkové Afriky, na Jávu, Sumatru, do Indie, Arábie, Mexika a střední a východní Ameriky. Káva patří do rodu *Coffea*, který zahrnuje přes 90 druhů, z nich jsou jen dva komerčně využívány, a to *C. arabica* a *C. canephora*, někdy označována jako jedena z jejích odrůd *Coffea robusta* [24]. Kávová zrna obsahují řadu aktivních látek, jako jsou fenolické sloučeniny, které dávají kávě její nezaměnitelnou chuť, dále jsou to známé antioxidanty. Hrají roli v prevenci chronických onemocnění jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění. Hlavní fenolickou látkou obsaženou v kávě je kyselina chlorogenová [25]. Dále káva obsahuje isoflavony daidzein, genistein, glycitein, formononetin a biochanin [26].

### 1.4.2 Mikrořasy

Mikrořasy (prokaryotecké sinice a eukaryotické mikrořasy) jsou velice rozmanitou skupinou mikroorganizmů, které jsou schopny akumulovat makromolekuly jako proteiny, sacharidy a lipidy [27]. Využití mikrořas jako zdroje speciálních chemických látek v průmyslovém měřítku začalo v 70-tých letech s řasou

*Dunaliella salina* využívanou pro produkci β-karotenu [28]. Řasy nekonkurují tradičním zemědělským plodinám ani prostorem ani zdroji, jelikož nevyžadují sladkou vodu nebo ornou půdu. Navíc díky nehostinným podmínkám a fototrofickému způsobu života jsou řasy často vystavovány oxidativnímu stresu a volným radikálům. Jako obrana proti těmto nepříznivým vlivům vznikly přírodní protektivní systémy. Mezi ně patří produkce fotosyntetických barviv (chlorofylů, karotenoidů a fykobiliproteinů) a polyfenolů (katechinů, flavonolů a florotaninů), které mohou přinést pozitivní účinky spotřebitelům po pozření [29].

### 1.4.3 Karotenogenní kvasinky

Tato skupina kvasinek je schopna akumulovat ve svých buňkách až 70 % intracelulárních lipidů v poměru k biomase [30]. Produkce mikrobiálních lipidů typu SCO („single cell oil“) pomocí kvasinek je mimořádně zajímavá, jelikož lipidotvorné kvasinky jsou schopné růst i na levných či odpadních surovinách, jako je syrovátka [31], melasa [32] a kávová sedlina [33]. Karotenogenní kvasinky jsou známými producenty karotenoidových pigmentů – astaxantinu, β-karotenu, torulenu a torularodinu. Kromě těchto pigmentů jsou schopny dále syntetizovat významné množství ergosterolu, nenasycených mastných kyselin, koenzymu $Q_{10}$ a dalších látek obohacujících biomasu. Takto obohacená biomasa nachází své využití jeden při výrobě krmiv, ale může zvýšit výživovou hodnotu potraviny a její organoleptické vlastnosti [34]. Kromě druhů *Rhodotorula glutinis a R. graminis* patří mezi také například druhy *Candida curvata*, *Lipomyces lipofear* a *Yarrowia lipolytica* [30].

## 1.5 METODY EXTRAKCE AKTIVNÍCH LÁTEK Z PŘÍRODNÍHO MATERIÁLU

Extrakcí v potravinářském průmyslu označujeme proces, kdy dochází k přenosu jedné nebo více látek z biologického zdroje do kapalné fáze, následovaný separací této fáze a získáním námi vybraných látek. Zdrojový materiál pro extrakci bývá živočišného či rostlinného původu (zvířata, ryby [21], rostliny [22] a řasy [23]).

### 1.5.1 Extrakce mezi pevnou látkou a kapalinou („Solid-liquid extraction–SLE“)

Metoda je využívána jako jednotková operace pro získávání aktivních látek z rostlin a dalšího zdrojového materiálu. Extrakce z pevného materiálu kapalinou neboli loužení zajišťuje odstranění složek z pevné matrice pomocí kontaktu s kapalnou fází, ve které jsou jednotlivé složky extraktu rozpustné [35]. Kromě klasické extrakce může jít dále o eluci, kdy jsou rozpustné pevné látky u povrchu pevné fáze a následně jsou eluovány do rozpouštědla [36]. Mechanismus zahrnuje dva hlavní kroky: Kontaktní krok, kdy je zajištěn transfer rozpustných látek do kapalné fáze pomocí difuze a rozpouštění. Následuje separační krok, při kterém jsou pomocí řady technik od sebe jednotlivé fáze odděleny [35]. Může jít například o filtraci, dekantaci, centrifugaci a řadu dalších separačních metod.

### 1.5.2 Extrakce dle Folche

Příkladem extrakce z pevného vzorku kapalinou je extrakce dle Folche. Metoda byla navržena roku 1951 Jordi Folchem. Původní postup zahrnoval dva kroky. V prvním byl vzorek homogenizován s rozpouštědly (chloroform a methanol v poměru 2:1) a zfiltrován. V druhém kroku byl filtrát promyt desetinásobným objemem vody od nečistot hydrofilní povahy. Spodní chloroformová fáze obsahuje lipidy a vrchní vodná fáze obsahuje nečistoty. Tento krok zahrnoval ztrátu 1 % lipidů [37]. Tato metoda je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem vody a polárních lipidů jako fosfolipidů a komplexních lipidů, tedy zdrojů živočišného původu. Proto se využívá pro analýzu například masa a masných výrobků. Methanol umožní kvantitativní extrakci lipidů vázaných na bílkoviny. Ztráty gangliosidů a některých dalších velmi polárních lipidů se dají snížit přídavkem chloridu draselného nebo chloridu vápenatého do promývací vody [38].

### 1.5.3 Soxhletova extrakce

V roce 1879 Franz von Soxhlet vyvinul Soxhletovu extrakci, která se stala nejrozšířenější technikou loužení. Tato metoda extrakce slouží jako základní reference, vůči které jsou ostatní techniky porovnávány [39]. Při Soxhletově extrakci je vzorek vložen do „patrony“, která je během celého procesu opakovaně promývána rozpouštědlem, které je redestilováno z destilační baňky. Jakmile dosáhne hladina rozpouštědla určité výšky, přeteče celý objem rozpouštědla i s extrahovanými aktivními látkami zpět do destilační baňky a rozpouštědlo je znovu odpařeno. Následně zkondenzuje pomocí chladiče a postupně opět kape na vzorek v patroně a začíná další cyklus extrakce. Vhodnými rozpouštědly jsou petrolether, aceton, chloroform, n-hexan nebo ethylacetát [35].

### 1.5.4 Extrakce s pomocí ultrazvuku

Ultrazvuk jsou zvukové vlny o frekvenci za hranicí lidského sluchu. Sonikační zařízení pracují při frekvenci 20 kHz –2 MHz, což je méně než u mikrovln. Zvukové vlny mají významný vliv na elastické prostředí jako je kapalné rozpouštědlo, měkké tkáně nebo části rostlin. Při tomto procesu vznikají kavitační bubliny uvnitř média. Ty dále rostou, velice rychle oscilují a po zhroucení se uvolní z milionů takovýchto mikrobublinek energie, která vytvoří vysoký tlak a teplotní zóny. Celý tento mechanismus se nazývá kavitační efekt [40]. Zhroucení, která se uskuteční v blízkosti pevného povrchu, vytvoří mikroproudy a rázové vlny, které mají za následek čištění, erozi a postupné narušování povrchu [23].

Základní postup zahrnuje vložení vzorku do nádoby s extrakčním činidlem a následný proces extrakce pomocí ultrazvuku po určitou dobu [41]. Pro sonikaci je možné využít dvou různých typů ultrazvuků - sonikační lázeň a výkonnější sondový ultrazvuk. Pro extrakci malého množství vzorku je vhodný sondový typ ultrazvuku, kdy je hrot ultrazvuku ponořen do extrakční směsi. Velké objemy kapalin se extrahují ve vanovém ultrazvuku nebo v kontinuálních reaktorech [23].

### 1.5.5 Extrakce s pomocí mikrovln

Mikrovlny zahřívají molekuly materiálů na základě mechanismu iontové vodivosti a rotace dipólů. Patří mezi neionizující elektromagnetické záření, které je mezi Roentgenovým zářením a infračerveným zářením o frekvenci mezi 300 MHz (1 m) a 300 GHz (1 mm) [40]. Mikrovlny vytvářejí magnetické a elektrické pole, která oscilují a jsou na sebe kolmá. Jakmile dojde k interakci mezi mikrovlnným zářením a polárním rozpouštědlem, dochází k zahřívání [35]. U této metody extrakce je opět významný výběr rozpouštědla, kdy zohledňujeme nejen rozpustnost extrahované látky, ale především schopnost absorbovat mikrovlnné záření. Rozpouštědla jako hexan, dichlormethan a toluen jsou transparentní k mikrovlnám, a tak je tímto způsoben nelze zahřívat. Dimethylsulfoxid, ethanol a methanol vysoce absorbují mikrovlny. Voda spolu s kyselinou octovou, butanolem a dimethylformamidem absorbují mikrovlnné záření ve střední míře [40]. Pro extrakci lze zvolit dva přístupy. Vzorek s vysokým obsahem polárních látek je ponořen do rozpouštědla, které je transparentní vůči mikrovlnám. Zahříván je tedy jen vzorek. Díky přenosu hmoty z buňky do rozpouštědla je postupně zahříváno i rozpouštědlo, což vede ke zvýšení rychlosti přenosu hmoty. Při zahřívání navíc dochází k poškození vnitřních struktur buňky a následnému uvolnění aktivních látek do prostřední. Druhým způsobem je využití rozpouštědla o střední až vysoké absorpci mikrovlnného záření (např. methanol, ethanol a voda), kdy dochází i k zahřívání extrakčního rozpouštědla [40].

## 1.6 METODY ENKAPSULACE VYUŽÍVANÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETICE

Aktivní látky mohou podléhat oxidaci či degradaci, nebo být špatně rozpustné ve vodném prostředí. Pro zachování jejich aktivity a možnosti postupného uvolňování byly zavedeny techniky enkapsulace do různých typů částic využívajících materiály vhodné pro potravinářství a kosmetiku jako jsou liposomy, emulze, nanočástice a nanovlákna či sorpce na povrchy částic, prášků nebo vláken [42].

### 1.6.1 Liposomy

Liposomy představují jedny z nejčastějších nosičů aktivních látek pro enkapsulaci ve farmacii a kosmetice. Byly poprvé pozorovány Alekem Banghamem a kolektivem v 60. letech [43]. Liposomy představují skupinu částic o průměru 0,05–5,0 μm, tvořených jednou či více fosfolipidovými dvojvrstvami převážně z biokompatibilních a biodegradabilních materiálů a vodného prostředí zachyceného ve vnitřním prostředí. Kromě fosfo- a sfingolipidů jak přírodního, tak syntetického původu mohou obsahovat i další molekuly regulující rigiditu fosfolipidové dvojvrstvy, jako je například cholesterol nebo hydrofilní polymery konjugované s lipidy. Díky složení dvojvrstvy mohou liposomy uzavřít do své struktury jak lipofilní, tak hydrofilní aktivní látky [44]. Liposomy se často rozdělují na pět typů na základě jich velikosti a lamelarity [45]. Jaký typ liposomů

vznikne závisí z velké části na metodě přípravy částic. Většina metod však zahrnuje následující kroky. Nejprve jsou vysušeny lipidy od organického rozpouštědla. Dále je provedena dispergace lipidů ve vodném prostředí, přečištění vytvořeného vzorku a analýza finálního produktu. Pro inkorporaci aktivní látky do struktury liposomu lze využít řadu metod jako je sonikace, French-press extruzi, zmražení a znovurozpuštění, hydrataci lipidové vrstvy, mikroemulgace, membránová extruze a změna rozpouštědla [46].

### 1.6.2 Nanovlákna

Jak sám název napovídá, jde o vlákna s velice malým průměrem do 100 nm. Hlavními charakteristikami je velký poměr povrchu k objemu, extrémně malé póry a výjimečné mechanické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem nanovlákna získala využití při vysokoúčinná filtrace, oddělení bakterií, kryty ran, enzymová imobilizace, elektrochemické senzory, kompozitní materiály, při náhradě cév a ve tkáňovém inženýrství [47]. Nanovlákna lze připravit z různých materiálů, jako jsou přírodní a syntetické polymery, materiály na bázi uhlíku, polovodičových matriálů a kompozitních nanomateriálů [48]. Mezi metody přípravy nanovláken patří elektrospining, „forcespining“, kreslení, „jet-blowing“, „melt spinning“ a další [47].

## 1.7 METODY CHARAKTERIZACE NANOSTRUKTUR

Pro charakterizaci a analýzu nano- a mikromateriálů byla zavedena řada technik. Kromě účinnosti enkapsulace, kdy je sledován obsah aktivní látky inkorporované ve struktuře sledovaného materiálu a její postupné uvolňování do zvoleného modelového prostředí, dále záleží na rozměrech nanostruktur a koloidní stabilitě částic. Kromě fyzikálně-chemických charakteristik je nutné sledovat i ty biologické, mezi ně patří antimikrobiální a antimykotické testy a testy cytotoxicity a genotoxicity.

Metoda dynamického rozptylu světla neboli fotonové korelační spektroskopie (PCS) je založena na principu Brownova pohybu. Částice se v roztoku neustále neuspořádaně pohybují. Jejich rychlost závisí kromě jiného i na jejich velikosti. Pokud známe informace o prostředí, teplotě a materiálu částic, lze ze změny rozptylu světla vypočítat i jejich velikost. Kromě samotné velikosti se o vzorku dozvídáme, zda je tvořen jen ze stejně velkých částic, je tedy monodisperzní nebo naopak je tvořen různě velikými částicemi, polydisperzní [49].

Zeta-potenciál nám určuje stabilitu koloidního roztoku, a to pomocí kombinace elektroforézy a laserové Dopplerovy velocimetrie. Sledována je rychlost částic v roztoku při vložení elektrického pole. Pokud je nám známa rychlost částic, opět z rozdílů rozptylu světla, a velikosti použitého elektrického pole, lze pomocí viskozity a dielektrické konstanty vzorku vypočítat i zeta-potenciál. Částice například se záporným nábojem, kolem svého povrchu udržuje vrstvu opačně nabitých iontů. Vzdálenost mezi povrchem částice a hranicí, kdy ionty stále putují

s částici je označována jako elektrická dvojvrstva a její potenciál jako ζ-potenciál. Hlavní kritériem koloidní stability je určitá hodnota, kdy už se částice navzájem neodpuzují a může docházet k jejich agregaci. Všeobecně jsou jako nestabilní označovány částice se zeta-potenciálu v rozmezí od −30 mV do +30 mV. Na hodnotu ζ-potenciálu má významný vliv i pH měřeného prostředí. Při isoelektrickém bodu, kdy je náboj částice neutrální je vzorek nejméně stabilní [49].

Mezi mikroskopické metody využívané v analýze nanostruktur patří především elektronová mikroskopie, a to jak rastrovací elektronová mikroskopie SEM, tak transmisní TEM. Pro analýzu biologických vzorků s vysokým obsahem vody, jako jsou liposomy, jsou klasické EM nevhodné, jelikož při vysokém vakuu se odpaří voda a další těkavé látky. Proto byla pro analýzu takovýchto vzorků zavedena cryo-TEM mikroskopie. Při ní dochází díky extrémně rychlému zamražení, které přemění tenký film fluidní suspenze na vitrifikovaný (amorfní) vzorek, ke změně stavu hmoty z kapalného na skelný, ale bez přidání dalších látek či změny stavu a struktury vzorku. Rychlé hluboké zamražení v řádek stovek stupňů za milisekundu je nutné k zachování nanostruktur a zabránění krystalizace a mechanického poškození. K zamrazení se používá kapalný ethan o teplotě −183 °C, který je chlazen pomocí tekutého dusíku. Pro celý proces vitrifikace již existují zařízení jako je např. Vitrobot (FEI, Thermofisher Scientific) [50], které přípravu vzorku pro cryo-TEM výrazně ulehčují [51].

### 1.7.1 Toxicita nanostruktur

Používání nanočástic a dalších nanostruktur se stává stále častější a aktuálně je téměř nemožné vyhnout se jejich vystavení, dokonce i přímé konzumaci či topické aplikaci. Vzrůstají však i obavy z jejich možného vlivu na buněčné struktury, především DNA. Tyto obavy byly jedním z důvodů vzniku cytotoxických a genotoxických testů, které mohou pomoci odhalit potenciální škodlivé vlivy na živé organismy.

Terazoliová sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid, methylthiazolyl-tetrazolium neboli MTT je využívána k určení metabolické aktivity buněk. Nejprve byla tato metoda zavedena pro eukaryotické buňky a poté aplikována i na analýzu bakterií a kvasinek. MTT je jedním z běžných zástupců při bioanalýze [52]. Tetrazoliová sůl se do buňky dostává endocytózou ve formě bezbarvého nebo mírně zbaveného roztoku (MTT je například světle žlutý). MTT je v buňkách redukováno primárně v mitochondriích nebo endoplazmových či lysosomových kompartmentech. Množství vzniklého formazanu může být použito k určení viability. Díky nerozpustnosti ve vodě tvoří formazan jehlicovité krystaly. Tyto krystaly lze rozpustit například pomocí DMSO [53], detergentu (SDS), nebo kombinace organického rozpouštědla a detergentu [54]. Množství vzniklého formazanu se měří spektrofotmetricky (pomocí ELISA readeru) při vlnové délce 570 nm [53].

Další možností, jak sledovat cytotoxitu vzorků, je pomocí LDH testu. Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym obsažený ve všech buňkách. Pokud je plazmatická membrána buňky poškozena, je LDH rychle uvolňována do buněčné kultury či krve. Právě z tohoto důvodu LDH test široce používán pro kvantitativní testování toxicity různých molekul a léčiv. Metoda sestává z dvou kroků: v prvním LDH katalyzuje redukci $NAD^+$ na NADH a $H^+$ oxidací laktátu a pyruvátu. V druhém kroku enzym diaforáza spotřebovává vzniklý NADH a $H^+$ ke katalýze redukce tetrazoliové soli stechiometricky na formazanovou sůl [55].

Pro sledování genotoxického potenciálu sloučeniny se využívá SOS chromotest. Využíván je mutantní kmen *E. coli* PQ37. Ten má gen lacZ pro tvorbu β-galaktosidázy umístěn pod správu operonu sfiA, který patří do SOS opravného systému (fůze sfiA:lacZ). Při indukci poškození DNA dochází jak k expresi sfiA, ale i lacZ genu. Tím je vytvořena β-galaktosidáza, jejích množství může být změřeno pomocí kolorimetrické analýzy, a tak nepřímo zjistit míru poškození DNA danou sloučeninou [56].

### 1.7.2 Antimikrobiální testy

Testování antimikrobiální aktivity je běžnou procedurou a umožňuje porovnávat antimikrobiální aktivity nových aktivních látek a extraktů se standardně používanými antibiotiky a antimykotiky. Mezi nejpoužívanější metody patří disková difuzní metoda a bujónová mikrodiluční metoda. První zmíněná je založena na inokulaci standardního množství inokula testovaného mikroorganismu na povrchu agarové plotny. Sledovaná látka je nadávkována na disk sterilního filtračního papíru nadávkována. Po inkubaci při standartních podmínkách pro daný mikroorganismus jsou odečítány inhibiční zóny v milimetrech [57]. Tuto metodu však nelze využít k rozlišení mezi bakterostatickým a bakterocidním účinkem. A určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) [58]. K určení MIC se používají bujónové diluční metody, jako bujónová mikrodiluční metoda na mikrotitračních destičkách. Hodnota minimální inhibiční koncentrace je reprezentována nejnižší koncentrací aktivní látky, která zcela inhibuje růst mikroorganismu [59].

Další důležitou koncentrací aktivní látky je minimální baktericidní (MBC), případně fungicidní koncentrace (MFC). Ta je definována jako nejnižší koncentrace, která je schopna usmrtit 99,9 % z mikroorganismů. Abychom mohli stanovit tuto koncentraci, je po standardní inkubaci inokula na mikrotitrační destičce přeočkována každá z jamek na nové pevné médium a inkubována dalších 24 hodin. Jako MBC je vyhodnocena nejnižší koncentrace, při které nejsou po 24hodinové inkubaci pozorovány žádné narostlé kolonie [60].

## 1.8 VYBRANÉ TYPY APLIKAČNÍCH FOREM PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ

V současné době je vysoká poptávka po kosmetických produktech, které by zároveň plnily funkci pečující a estetickou. Na důležitosti nabývá také tvorba

inovativních receptur se začleněnými nejnovějšími technologickými pokroky [61]. V rámci aplikačních forem lze rozlišit několik typů systémů pro dopravu aktivních látek. Jedná se o roztoky, emulze (mikro, nanoemulze, olej ve vodě (o/v), voda v oleji (v/o)), gely, suspenze, tyčinky [62], vezikly (liposomy, ethosomy, niosomy) a částice (kovové, lipidické, polymerní) [61].

Značný počet nových produktů je založen na nové generaci účinných látek. S těmito nově vznikajícími aktivními látkami přichází řada problémů s formulací, které zahrnují kontrolu stability a komplikace spojené s kombinováním několika aktivních látek do jednoho kosmetického produktu [61]. Pro naplnění požadavků na účinnost a stabilitu výsledného produktu je tedy potřeba nové aplikační formy testovat a dlouhodobě sledovat pomocí řady technik, jako jsou například stabilitní testy, analytická centrifugace a senzorická analýza. Pomocí analytické centrifugace je možné změřit stabilitu emulze či disperze díky odstředivému zrychlení v relativně krátkém časovém rozmezí, a tak srovnávat dobu použitelnosti různých emulzí a vytvářet nové formulace [63]

# 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo využít vybrané přírodní zdroje rostlinného a mikrobiálního původu a otestovat možnosti jejich využití v potravinářství a kosmetice. Za tímto účelem byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše zaměřená na přírodní látky s pozitivním biologickým účinkem, zejména fotoprotektivním, antioxidačním a antimikrobiálním
2. Vývoj a optimalizace metod extrakce aktivních látek z různých typů přírodních zdrojů
3. Kvalitativní a kvantitativní analýza aktivních přírodních látek pomocí vhodných instrumentálních metod
4. Optimalizace metod přípravy a charakterizace nanostruktur na bázi liposomů s PHA a nanovláken z PHB nebo želatiny
5. Funkcionalizace nanostruktur pomocí přírodních extraktů s obsahem organických UV filtrů a antioxidantů, charakterizace fotoprotektivních vlastností a účinku (SPF)
6. Stanovení dalších biologických vlastností a bezpečnosti přírodních extraktů ve volné a enkapsulované formě s využitím různých typů buněk (antioxidační, antimikrobiální, cytotoxický a genotoxický efekt)
7. Vývoj vybraných praktických aplikací testovaných přírodních látek v potravinářství a kosmetice.

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 LÁTKY POUŽITÉ K PŘÍPRAVĚ EXTRAKTŮ A JEJICH ENKAPSULACI

Pro přípravu extraktů byla jako zdrojový materiál použita řada komerčních vzorků různých druhů kávy, bylin (Máta peprná list, Levandule lékařská květ, Šalvěj lékařská nať a Meduňka lékařská list), esenciálních olejů (Máta peprná, Levandule lékařská, Dobromysl obecná, Tea tree a Šalvěj lékařská), mikrořas a sinic a dále biomasa mikrořas a sinic *Chroococcidiopsis cf.* CCALA 45, *Nostoc cf.* CCALA 123, *Scytonema cf.* CCALA 170, *Anabaena torulosa* CCALA 003, *Scenedesmus acutus* CCALA 904, *Porphyridium cruentum* CCALA 415, *Chlorella sorokiniana* CCALA 260, *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443, Scenedesmus acutus CCALA 904, *Spirulina* CCALA 28, *Chlamydomonas reindhartii* CCALA 973, *Chlorella cf. minutissima* CCALA 916, *Scenedesmus cf. obliquus* CCALA 455 ze sbírky Sbírka autotrofních organismů v Algologické laboratoři v Třeboni a karotenogenních kvasinek Cystofilobasidium macerans – CCY 10-1-2, *Rhodotorula kratochvilovae* – CCY 20-2-26, *Rhodotorula mucilaginosa* – CCY 20-9-7, *hodosporidium toruloides* – CCY 62-2-4, *Sporidiobolus pararoseus* – CCY 19-9-6 ze sbírky kvasinkových kultur Chemického ústavu Slovenské akademie věd nakultivovaná na FCH VUT.

## 3.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY

Pro testování antimikrobiálních účinků byly v této práci využity bakteriální kmeny – *Escherichia coli* CCM 3954, *Escherichia coli* SOS chromotest, *Staphylococus epidermidis* CCM 4418, *Cutibacterium acnes* CCM 3437, *Candida glabrata* CCM 8270 a kvasinkový kmen – *Candida glabrata* CCM 8270. Všechny kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně.

## 3.3 POUŽITÉ BUNĚČNÉ KULTURY

Pro testování cytotoxického účinku připravených preparátů byly využity 2 buněčné kultury. Linie imortalizovaných keratinocytů HaCaT a linie adenokarcinomu tlustého střeva Caco2 byly získány z CLS Cell Line Services GmbH, Eppelheim, Německo.

## 3.4 KULTIVACE MIKROŘAS, SINIC A KAROTENOGENNÍCH KVASINEK

Kultivačních práce v laboratoři probíhaly vždy při dodržení sterilních podmínek. Jednotlivé mikroorganismy byly kultivovány v médiích dle doporučení sbírky. Pro mikrořasy bylo použilo BBM médium, pro sinice Z-médium. Výjimku tvořili pouze sinice rodu *Spirulina* (*Arthrospira*), které byly kultivovány ve Spirulina médiu a dále mikrořasy *Porphyridium*, které byly kultivovány v Porphyridia médiu. Kultivace mikrořas a sinic byla provedena dle standardního postupu [64]. Kultivace karotenogenních kvasinek probíhala v několika krocích. Jedna klička narostlé kultury byla zaočkována do 50 ml tekutého YPD média (inokuluim I) a kultivována při laboratorní teplotě na orbitální třepačce při 100 rpm po dobu

24 hodin. Po této době bylo připraveno inokulum II, a to přeočkováním inokula I do nového tekutého YPD média v poměru 1:5. Kultivace opět probíhala 24 hodin, za laboratorní teploty na orbitální třepačce v Erlenmeyerových baňkách. Posledním krokem byla příprava produkčního média s C/N poměrem 25 a zaočkování inokula II v poměru 1:7 do litrových nádob se šroubovacím uzávěrem. Celkový objem kultury po zaočkování činil 800 ml. Produkční médium pro kultivaci karotenoidních kvasinek obsahovalo 46,46 g/l glycerolu, 1,82 g/l močoviny, 4 g/l $KH_2PO_4$ a 0,7 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Dále byl přidán 1 ml přípravku Antifoam 204, aby bylo zamezeno tvorbě pěny. Takto připravené kultury byly po celou dobu kultivace (96 hodin) provzdušňovány sterilním vzduchem. Po ukončení kultivace byl obsah nádob centrifugován při 6 000 rpm, promyt destilovanou vodou, znovu centrifugován a po slití supernatantu byla peleta s nakultivovanou biomasou zamražena a následně lyofilizována. Z hmotností lyofilizované biomasy a objemu kultivačného média byl vypočítán obsah biomasy v g/l kultury. Před dalším testováním byla biomasa uskladněna při −20 °C. Kromě velkých objemů byly mikroorganismy kultivovány i v multikultivátoru o objemu vzorku 80 ml.

## 3.5 METODY EXTRAKCE AKTIVNÍCH LÁTEK Z PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ

Pro přípravu extraktů z rostlinného nebo mikrobiálního materiálu bylo použito několik metod extrakce, jmenovitě extrakce mezi pevnou látkou a kapalinou reprezentovaná řadou rozpouštědel (voda, etanol 20–96%, aceton, hexan, chloroform, chloroform:methanol (2:1), methanol:ethylacetát (1:1), a další, které jsou popsány dále v textu. Kromě klasických extrakcí byla využita i metoda extrakce dle Soxhleta pomocí systému Soxhterm.

U klasických extrakcí bylo postupováno následovně. Do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml byl navážen 1 g vzorku a přidáno 10 ml extrakčního rozpouštědla. Tato suspenze byla ponechána na třepačce po dobu 30 minut nebo 24 hodin extrahovat. Po uplynutí této doby byly zkumavky zcentrifugovány (6 000 rpm, 5 minut) a supernatant odpipetován do čistých zkumavek. Tyto zkumavky pak byly uchovávány ve tmě při 5 °C.

Při extrakci urychlené pomocí sonikace byl využit vanový ultrazvuk po dobu 10 min, případně byla sonikace provedena pomocí sondového ultrazvuku při programu 5 s:5 s, kdy přístroj 5 s sonikoval vzorek a 5 s byla sonikace vypnutá, po celkovou dobu 10 minut. Následně bylo postupováno jako v obecném postupu. Postup byl modifikován dle [65].

Pro extrakci usnadněnou pomocí mikrovln byl do extrakční patrony byl navážen 1 g vzorku a zalit 10 ml extrakčního rozpouštědla. Následně byla patrona uzavřena a vložena do extrakčního systému. Program byl nastaven na 400 W. Postup byl modifikován dle [65], [66].

Extrakce v systému Soxhterm probíhala při 170 °C, redukčním intervalu 3 min 30 s, redukčním pulzu 3 s. Horká extrakce trvala 1 hodinu a 30 minut a celková délka programu byla 3 hodiny a 4 minuty. Po extrakci byly extrakty přelity slzičkových baněk a byl z nich odpařen hexan pomocí vakuové rotační odparky. Vytvořený film extraktů na stěnách baněk byl kvantitativně převeden do vialek se šroubovacím víčkem pomocí 5 ml 96% ethanolu, ve kterém zůstal rozpuštěn. Víčko bylo utěsněno parafínovým filmem a vialky byly uchovávány ve tmě při teplotě –16 °C.

Extrakce aktivních látek z karotenogenních kvasinek porovnávala řadu rozpouštědel (hexan, ethanol, DMSO, aceton, methanol a jejich kombinace) a dva přístupy dezintegrace kvasinkových buněk (skleněné kuličky a DMSO). Jako inspirace pro použitá rozpouštědla a postupy sloužil článek od Rameshe Kumara Saini a Young-Soo Keum [67]. Jako srovnávací metoda sloužila extrakce dle Folche [37].

## 3.6 METODY STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH CHARAKTERISTIK EXTRAKTŮ

U extraktů byla stanovena řada aktivních látek a biologických účinků. Fenolické látky byly stanoveny dle metody Folin-Ciocalteu [68]. Stanovení flavonoidů bylo provedeno dle [69]. Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda využívající Trolox jakožto antioxidant a $ABTS^{+\cdot}$ [70].

Pro stanovení individuálních fenolických látek byly připravené extrakty obsahující fenolické látky 1:1:2 smíchány s hexanem pro HPLC a 70% methanolem pro HPLC v MilliQ vodě. Vzorky byly protřepány pomocí vortexu. Po oddělení fází byla spodní fáze přefiltrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 450 nm. Takto připravené vzorky byly nastříknuty na HPLC HPLC/PDA Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem Vanquish series, kolonu Kinetex F5 s předkolonou. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril pro HPLC a MilliQ voda s přídavkem 0,1 % kyseliny triflouroctové.

Jelikož jsou alergeny běžnou součástí většiny extraktů přírodního původu, tak i esenciální oleje tyto látky obsahují. Pro jejich stanovení byla provedena analýzy pomocí HPLC a reverzní fází dle Villa et al [71].

Pro stanovení celkových proteinů přítomných ve vybraných vodných extraktech dle Hartree-Lowryho [72]. Koncentrace chlorofylu *a* a *b* z spolu s celkovými karotenoidy byla počítána dle rovnic převzatých od Lichtenthalera et al. [73]. Koncentrace celkových karotenoidů v kvasinkových extraktech byla vypočtena podle rovnice převzaté od Martinéze et al. [74].

Připravené extrakty obsahující pigmenty a lipofilní aktivní látky byly dle potřeby naředěny a filtrovány přes stříkačkový filtr (0,45 um, PTFE, 13 mm) do skleněných vialek pro následnou analýzu pomocí HPLC. Obsah jednotlivých detekovaných látek je vypočítán pomocí kalibračních křivek standardů (beta-

karoten, astaxanthin, lykopen, lutein, volaxanthin, neoxanthin, chlorofyl a, chlorofyl b, ergosterol). Dále byl stanoven profil mastných kyselin pomocí metody využívající přímou transesterifikaci za tvorby methylesterů mastných kyselin dle [75].

Stanovení kritické vlnové délky bylo provedeno pomocí proměření UV spektra v rozmezí 290–400 nm s krokem 1 nm. Kritická vlnová délka byla stanovena jako vlnová délka, u které je plocha pod křivkou rovna 90 % z celé plochy od 290 do 400 nm [7]. Pro výpočet SPF byl nejprve vzorek naředěn na koncentraci 200 ug·ml$^{-1}$. Následně byla proměřena pomocí UV-vis spektrofotometru spektra v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Takto naměřené hodnoty byly použity pro výpočet SPF pomocí Mansurovy rovnice [76].

Pro určení antimikrobiální aktivity extraktů byla využita metoda stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí bujónové mikrodiluční metody. Antimikrobiální účinnost byla popsána jako $MIC_{90}$, kdy došlo k inhibici mikroorganismu z 90 % oproti kontrole [77]. Pro určení minimální baktericidní (MBC), případně fungicidní koncentrace (MFC), bylo potřeba vzorky z předchozího kroku přeočkovat pomocí očkovací jehly na agarové plotny a dále kultivovat 24 hodin za standardních podmínek vhodných pro daný mikroorganismus [78]. Po kultivaci byly pozorovány mikrobiální kolonie a vyfoceny pomocí fotoaparátu. MBC je definována jako nejnižší koncentrace, při které nastane kompletní usmrcení testovaného mikroorganismu [79]. Další variantou, jak testovat antimikrobiální aktivitu, jsou diskové difuzní testy [80].

Pro testy cytotoxicity byly zvoleny dvě buněčné linie: buňky lidského adenokarcinomu tlustého střeva Caco2 a dále imortalizované keratinocyty HaCaT. Testovány byly vybrané vzorky extraktů a částic. Postup pro stanovení metabolické aktivity pomocí MTT testu byl převzat a upraven z [81]. Tento test založený na uvolnění enzymu laktátdehydrogenázy z poškozených buněk), byl proveden dle postupu [82], založeného na protokolu od firmy Sigma. Stanovení genotoxického účinku připravených preparátů bylo provedeno s využitím komerčního kitu EBPI SOS Chromotest™. Postupováno bylo dle protokolu výrobce [83].

## 3.7 PŘÍPRAVA ČÁSTIC

S ohledem na aplikační výstupy této práce v potravinářství a kosmetice byly jako enkapsulační systémy zvoleny enkapsulace do nanočástic a do nanovláken. Jako nanočástice byly připraveny liposomy a liposomy obohacené o PHB. Nanovlákna byla připravená jak z PHB, tak z želatiny. Na základě předešlého výzkumu [84], byla jako metoda přípravy liposomových částic zvolena sonikace pomocí tyčového ultrazvuku Sonopuls HD 3200 s nástavcem VS70 a sondou TT13 od firmy Bandeline.

## 3.8 ANALÝZA ČÁSTIC

Hlavními parametry pro charakterizace liposomových částic je jejich velikost, polydisperzitní index a koloidní stabilita, které jsou měřeny pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Koloidní stabilita byla měřená pomocí Dipp Celly [85]. Stejný postup byl opakován u vybraných vzorků v časovém horizontu jednoho až tří měsíců, kdy byla sledována také dlouhodobá stabilita. Dále u vzorků s enkapsulovanými aktivními látkami byla stanovena enkapsulační účinnost, jako poměr koncentrace aktivní látky v liposomech ku koncentraci aktivní látky přidané při přípravě vzorku uvedený v procentech. Koncentrace aktivních látek byla dále sledována při testech postupného uvolňování do modelových prostředí. Pro vizualizaci částic byla zvolena kryo-transmisní elektronová mikroskopie (kryo-TEM) [85].

## 3.9 PŘÍPRAVA NANOVLÁKEN

Další možností enkapsulace je inkorporace aktivních látek do struktury, případně na povrch nanovláken. Pro jejich přípravu byly zvoleny tři metody, a to elektrospining [86], odstředivé zvlákňování neboli forcespinning [87] a srážecí metoda [88]. Tyto tři postupy byly porovnávány pro polymer PHB. Dále byl optimalizován postup přípravy nanovláken pomocí elektrospinigu z želatiny dle postupu popsaného Wang a kol. [89].

## 3.10 ANALÝZA NANOVLÁKEN

U připravených nanovláken byla sledována antioxidační aktivita, krátkodobá a dlouhodobá stabilita, dle metody využívající Trolox jakožto antioxidant a $ABTS^{+\cdot}$ [70]. Dále byly vlákna vizualizovány pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), sledován antimikrobiální účinek a provedeny testy cytotoxicity. Nanovlákna byla zobrazena pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu SEM JEOL JSM-7600F, případně ZEISS EVO LS 10. Mikroskop pracoval pod vysokým vakuem při urychlovacím napětí 5 kV. Povrch vzorků byl pokovován zlatem po dobu 1 min. Průměry vláken byly změřeny pomocí software dostupného k mikroskopu.

## 3.11 APLIKACE DO POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETIKY

Vyprané vzorky byly využity pro aplikaci do potravinářství ve formě nápojů. Základ nápojů tvořily 4 druhy kávy. Tyto kávové základy byly obohaceny 10% přídavkem vybraných rostlinných extraktů ve volné a enkapsulované formě (liposomy). Připravené nápoje byly následně doslazeny třtinovým cukrem či stévií. Každý kávový základ obsahoval pávě jeden extrakt a jeden druh sladidla.

U modelových nápojů byl sledován obsah kofeinu, fenolických látek a antioxidační aktivita. Dále u řady s enkapsulovanými extrakty byla sledována stabilita v horizontu 6 týdnů. U pěti vzorků byla provedena senzorická analýza. Senzorické hodnocení bylo provedeno u pěti vybraných modelových nápojů. Ty

byly vybrány na základě sledovaných parametrů, jako byla antioxidační aktivita a dále dle předběžného výběru na základě chuťového profilu. Nápoje posuzovala čtyřicetičlenná skupina proškolených hodnotitelů. Hodnocena byla celková chuť nápoje, vzhled, barva, vůně, sladkost, hořkost a acidita.

## 3.12 KOSMETICKÉ FORMULACE

Pro aplikace směřované do kosmetického průmyslu byla vytvořena řada emulzí a gelů. Tyto dva typy produktů byly vybrány, jelikož jsou hojně využívány širokou veřejností. Jednotlivé kosmetické základy se lišily obsahem a složením olejové a vodné fáze, emulgátorem či dalšími látkami. Charakterizace a stabilita kosmetických formulací. Vybrané vzorky emulzí byly podrobeny stabilitním testům pomocí analytické centrifugace. Byla měřena transmitance světla o vlnové délce 870 nm jako funkce pozice v kyvetě a času pomocí přístroje LUMiSizer. Vzorky byly nadávkovány do polykarbonátových kyvet s plochým dnem o šířce 10 mm. Výška vzorku byla 36 mm [90]. Měření probíhalo při 2 000 g po dobu 17 hodin. V rámci senzorické analýzy byly připravené kosmetické formulace hodnoceny proškolenými hodnotiteli. Hlavními sledovanými parametry byl vzhled, textura, vůně, roztíratelnost, vstřebatelnost (lepivost) a hydratace. Vybrané vzorky byly kromě senzorické analýzy dále podrobeny analýze pomocí kamery Visioscope PC 35, kdy byla měřena velikost pórů, vrásky a maz. Tyto parametry byly měřeny před aplikací testované formulace a dále po 14 dnech používání daného vzorku. Obsah melaninu a zarudnutí (erytém) pokožky bylo měřeno pomocí mexametru [91].

## 3.13 STATISTICKÁ ANALÝZA

Veškeré experimenty byly provedeny nejméně v triplikátech. Výsledky jsou zobrazeny jako průměry ± směrodatná odchylka. Pro testování hypotéz byla použita jednofaktorová ANOVA na hladině spolehlivosti 0,05. Dále byla vybraná data hodnocena dle Tukeyho HSD testu a jsou zaznamenána jako skupiny na hladině významnosti rozdílu 0,05, 0,001 a 0,000 1.

# 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejprve bylo nutné optimalizovat postupy pro přípravu liposomů, především liposomů obohacených o polymer PHB a dále optimalizovat složení roztoků a podmínek pro zvlákňování polymeru PHB a želatiny pro výrobu nanovláken pomocí elektrospinningu, forcespinningu a pomocí srážecí metody.

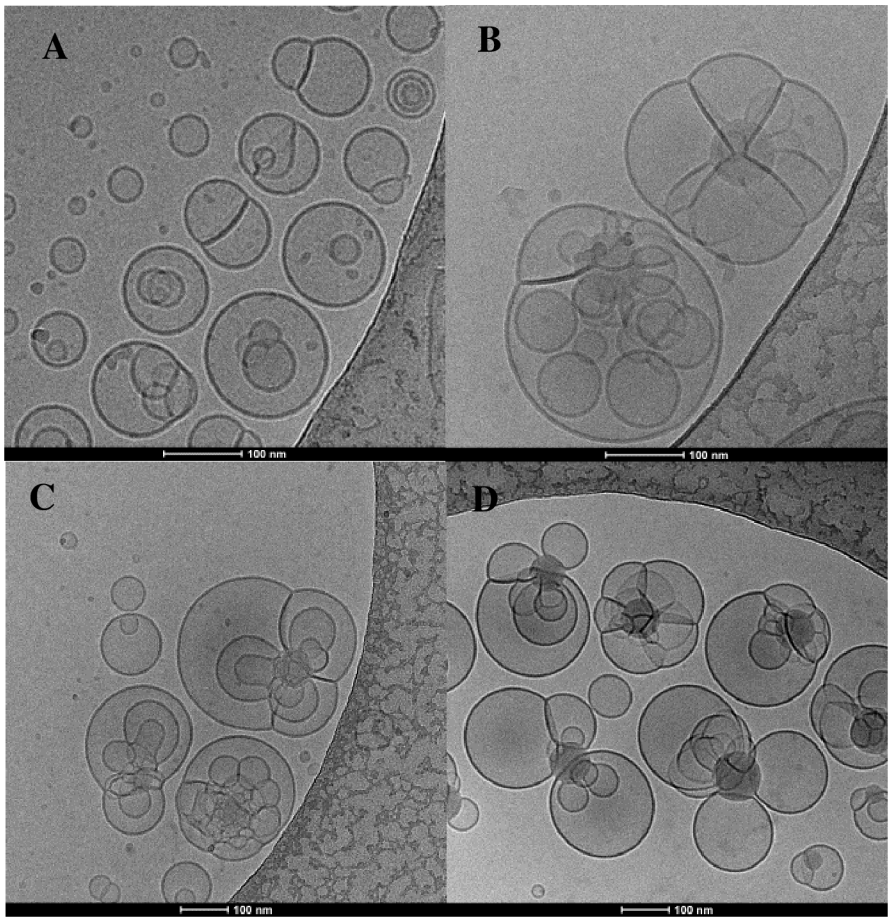
## 4.1 OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY ČÁSTIC

Pro přípravu částic byly zvoleny liposomy a liposomy obohacené o PHB, kdy pro další práci bylo důležité vybrat adekvátní přídavek PHB, aby měly částice podobnou velikost jako čisté liposomy, dále co nejnižší polydisperzitní index, vysokou koloidní stabilitu a také přispívaly k hodnotě SPF.

Při porovnání vlastností částic v den přípravy bylo patrné, že veškeré částice obohacené o PHB mají alespoň 2krát větší průměr než běžné liposomy. Výrazný vliv byl pozorován při přídavku 50 a 100 % PHB namísto lecithinu. Přídavek PHB měl vliv i na polydisperzitní index, který se opět zvýšil, a to ve všech případech. Nejnižší hodnotu měly částice s přídavkem 20 a 50 % PHB. Naopak pozitivní vliv měl přídavek PHB na koloidní stabilitu, kdy se hodnota zeta-potenciálu snížila pod −35 mV. Jen v případě částic se 100% přídavkem PHB se hodnota zeta-potenciálu zvýšila až k hranici stability. Jako nestabilní se považují částice o zeta-potenciálu v rozmezí −25 až + 25 mV [92]. Se vzorky o vyšším obsahu PHB 50–100 % se také opakovaně velice špatně pracovalo, kdy docházelo k jeho srážení, a tedy k ztrátám materiálu. Jako vhodné pro další práci se ihned po přípravě jevily částice s obsahem PHB v rozmezí 10–30 %. Nejvíce uniformní velikost měl vzorek běžných liposomů a jako druhé byly vzorky liposomů s 20 % PHB. Dále byla u vzorků sledována hodnota ochranného faktoru vůči slunečnímu záření SPF. Samotné liposomy měly hodnoty SPF 1,7 ± 0,1, po přídavku PHB20 se hodnota SPF zvýšila na 4,8 ± 0,8 a u vzorku PHB30 na 5,9 ± 0,7. Kdy právě hodnotu SPF 6 lze již u kosmetických přípravků deklarovat. Při přídavku PHB 50–100 % byly hodnoty SPF nad 10, jak již bylo zmíněno v předešlém textu, s těmito vzorky se velice špatně pracovalo a docházelo ke ztrátám při jejich přípravě. Základní charakteristiky částic byly sledovány v horizontu 4 měsíců. Při porovnání můžeme říci, že jednotlivé charakteristiky částic stále odpovídají stabilním vzorkům využitelným v potravinářství a kosmetice. Naopak u částic s přídavkem PHB se hodnota PdI zvýšila, avšak částice zůstaly v rozmezí, kdy jsou stále považované za stabilní. Výjimku tvořily částice se 100% přídavkem PHB, které byly po celou dobu testování na, případně za hranicí stability.

Připravené liposomové částice s přídavkem PHB byly zobrazeny pomocí kryo-transmisní elektronové mikroskopie. Pro zobrazení byly vhodné pouze vzorky liposomů s přídavkem 0–30 % PHB. Vzorky s vyšším procentem PHB se opakovaně nepodařilo vyfotografovat. To mohlo být spojeno s jejich charakterem a horšími podmínkami pro manipulování. Fotky (Obr. 1) potvrzují, že připravené

částice se lišily velikostí. Navíc však můžeme vidět, že se částice s přídavkem PHB se od čistých liposomů liší i strukturou. Polymer PHB tvoří kulovité granule uprostřed liposomových částic. Na snímcích je zobrazen jako tmavě šedá granule, jelikož polymer je má vyšší elektronovou densitu oproti ostatním složkám samotných částic.




**Obr. 1: Liposomové částice zobrazené pomocí kry-TEM mikroskopie A – liposomy, B-liposomy PHB10, C – liposomy PHB20 a D-liposomy PHB30**

Poněvadž liposomy s přídavkem PHB nebyly dosud v literatuře podrobně popsány, byl u připravených prázdných liposomových částic sledován vliv jejich přídavku na viabilitu buněk, a tedy sledována jejich bezpečnost. Pro testování bezpečnosti byly využity imortalizované keratinocyty linie HaCaT [93]. Nejvyšší buněčnou viabilitu ve srovnání s kontrolou vykazoval vzorek liposomů s 20 % PHB při přídavku 2 obj.%. Naopak nejvíce negativní vliv na buněčnou kulturu byl pozorován při přídavku 14 obj.% vzorku liposomů se 70 % PHB. U vzorku liposomů s 20 % PHB nebyl pozorován téměř žádný nebo mírně pozitivní vliv na buněčnou viabilitu. Tento vliv byl jen minimálně ovlivněn zvýšením koncentrace vzorku v kultivačním médiu. Liposomy s 70 % a 100 % PHB významně negativně ovlivnily buněčnou životaschopnost. Tento vliv byl umocněn vyšším přídavkem částic. Můžeme říci, že cytotoxicita připravených funkcionalizovaných částic byla v testovaných koncentracích nízká.

Ze získaných dat byly dále dopočítány hodnoty $LC_{10}$, $LC_{50}$ a $LC_{90}$ zobrazených v Tab. 1. Z těchto dat můžeme vidět, že při přídavku do 10 obj. %, běžně využívaném pro aktivní látky jak v potravinářství, tak v kosmetice, neklesla viabilita buněk pod 50 %, jelikož se u nich hodnoty LC50 pohybují nad 10 obj. %. Tuto podmínku nesplnily pouze vzorky částic s přídavkem PHB 70 a 100 %. Naopak nejvyšší přídavek PHB při současném nejmenším ovlivnění viability buněk lze využít u vzorků liposomů s 20 % PHB (PHB20), čistých liposomů a případně i liposomů s 10 % PHB (PHB10). Ostatní vzorky již při přídavku do 0,5 obj. % snížily viabilitu buněk o 10 %, jak vyplývá z hodnot $LC_{10}$. Při porovnávání hodnot $LC_{90}$ vidíme, že nejpodobnější jsou si právě čisté liposomy a částice typu PHB20. Celkově však jsou hodnoty $LC_{90}$ jen teoreticky dopočítány, jelikož při testování neklesla u žádného vzorku viabilita buněk pod 35 %.

**Tab. 1: Letální koncentrace pro vzorky prázdných částic liposomového typu**

| Vzorek | $LC_{10}$ [obj.%] | $LC_{50}$ [obj.%] | $LC_{90}$ [obj.%] |
|---|---|---|---|
| liposomy | 1,0 | 14,8 | 25,0 |
| PHB 10 | 0,8 | 12,0 | 30,0 |
| PHB 20 | 5,0 | 15,0 | 25,7 |
| PHB 30 | 0,3 | 10,6 | 20,6 |
| PHB 50 | 0,2 | 14,0 | ND |
| PHB 70 | 0,1 | 6,0 | 18,2 |
| PHB 100 | 0,1 | 8,0 | 22,9 |

**ND-nelze dopočítat**

Jako další z nástrojů hodnocení vlivu vzorků kombinovaných liposomů na viabilitu buněk byl proveden LDH test. Dle výsledků aktivit extracelulární laktátdehydrogenázy můžeme konstatovat, že prázdné částice měly malý vliv na uvolnění LDH z keratinocytů v porovnání s kontrolou. Byl pozorován signifikantní rozdíl ($p<0,05$) mezi vlivem čistých liposomů a liposomů obohacených o PHB v celém rozsahu koncentrací pro vzorky PHB 20 a s vyšším obsahem PHB. Při porovnání s aktivitou LDH pro pozitivní kontrolu 2 049,4 ± 5,4 U/ml (ethanol 60 %) lze konstatovat, že se žádný vzorek liposomů této hodnotě nepřiblížil. Přesto je třeba zdůraznit, že LDH test je založen na uvolnění enzymu do kultivačního média po porušení cytoplazmatické membrány a je tedy považován za méně citlivý v porovnání s testy založenými na aktivitě respiračních enzymů mitochondrií, jako je například MTT test. Ty dokáží odhalit již brzké znaky toxicity ihned po vystavení buňky mitochondriálnímu toxinu [94]. To potvrzují i naše data, kdy při MTT testu byly jasně pozorovatelné rozdíly mezi vzorky různých typů liposomů, zatímco při LDH testu vykazovala většina vzorků i při různých koncentracích nízkou a velice podobnou aktivitu LDH.

Kromě sledování cytotoxity bylo dále provedeno měření genotoxicity kombinovaných liposomů pomocí SOS chromotestu na speciálním kmenu bakterie *E. coli*, dle postupu doporučeného výrobcem. Testovány byly liposomové částice s různým přídavkem PHB v rozmezí 0–50 %. Vzorky se nepřibližovaly se tedy

cytotoxicitě ani nejnižšího bodu kalibrační křivky a můžeme tedy konstatovat, že nevykazovaly cytotoxický vliv na buňky *E. coli* dle podmínek SOS chromotestu.

Na základě provedených testů a stanovení byly pro další práci vybrány liposomy a liposomy s 20% přídavkem PHB.

## 4.2 OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY NANOVLÁKEN

Pro přípravu nanovláken byly zvoleny dva materiály PHB a želatina. U vzorků vytvořených z PHB byly využity tři metody a to elektrospinning, forcespinning a zvlákňování pomocí srážení. U vzorků z želatiny byl optimalizován postup pro přípravu nanovláken pomocí elektrospinningu, kdy byl zkoumán vliv přídavku lipofilní aktivní látky na tvorbu, strukturu a morfologii nanovláken. Při přípravě nanovláken pomocí elektrospinningu měla vlákna uniformní průměr, byla vysoce orientována v osách X a Y a tvoří homogenní síť. Vlákna nevykazovala deformity a jejich povrch a průměr je tedy v celé délce vlákna neměnný. U přípravy PHB vláken pomocí metody forcespinning, tedy rotačního zvlákňování, vykazovala tato vlákna značné deformity. Většina nanovláken měla však stále uniformní průměr. Pozice vláken byla již méně orientovaná a vlákna vykazují částečně nahodilé uspořádání.

Vlákna připravená pomocí srážecí metody z polymeru PHB měla oproti předchozím vzorkům několikanásobně větší průměr. Co však děla tento typ vláken zajímavým, je samotný povrch. Přestože se nejedná a nanovlákna, jejich povrch nese strukturní prvky v nanorozměrech. Pro aplikace využívané v této práci nebyl tento typ vláken dále využíván. Díky velkému povrchu by se však dala vlákna využít při aplikacích tento parametr upřednostňujících, jako jsou systémy pro dopravu léčiv, enzymů a aditiv ve farmacii, kosmetice a pro využití při hojení ran [88], [95], dále jako různé nosné struktury (scaffoldy) [96], filtrační systémy či pro imobilizaci nanočástic a následné využití jako katalyzátorů [97]. Pro další práci byly pro přípravu vláken z PHB jako optimální zvoleny metody elektrospinning a forcespinning.

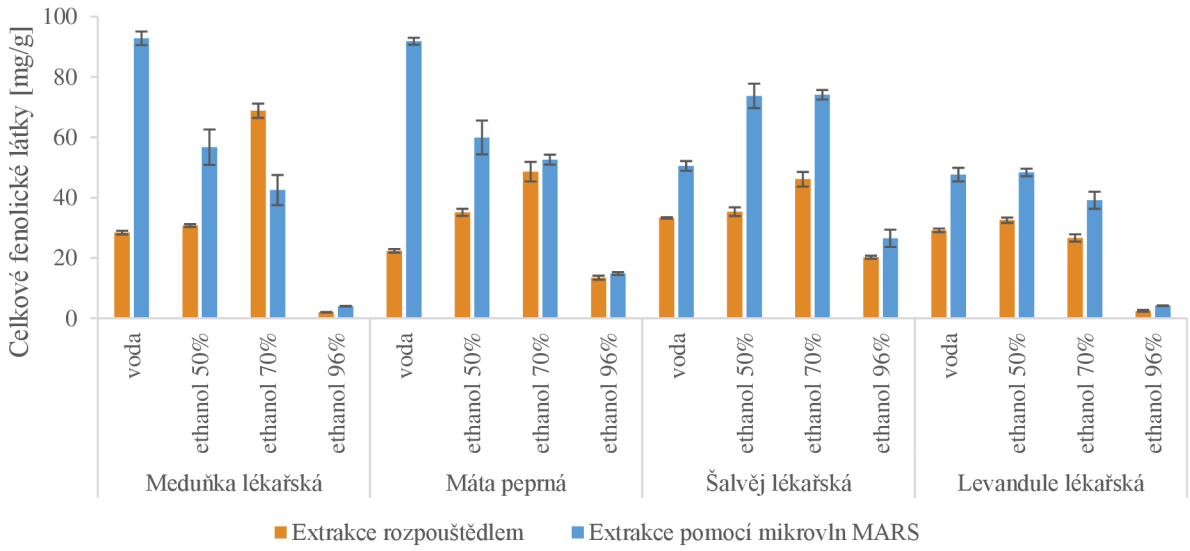
V případě želatinových vláken měl přídavek esenciálního oleje vliv na morfologii vláken. Při přídavku 20 % esenciálního oleje měla vlákna více zprohýbaný tvar v porovnání se vzorky s přídavkem 2 % a bez EO. U těchto dvou vzorků pozorujeme více orientovaná vlákna v osách X a Y a tedy vykazovala vyšší míru uspořádanosti. Průměry připravených nanovláken byly měřeny pomocí software mikroskopu. U všech vzorků měla vlákna velice uniformní hodnoty průměrů, které se pohybovaly okolo 430 nm. Při shrnutí poznatků můžeme shrnout, že pouze přídavek 20 % lipofilní aktivní látky (levandulového EO) měl vliv jak na průměr vláken a zároveň na morfologii a uspořádanost připravených nanovláken. Pro další aplikace byly však vhodné veškeré vzorky želatinových nanovláken.

## 4.3 CHARAKTERIZACE EXTRAKTŮ

Pro účely této disertační práce byla využita řada vzorků kávy, bylin, esenciálních olejů, a vzorků mikroorganismů (mikrořas, sinic a karotenogenních kvasinek). Sledována byla účinnost extrakcí, obsah aktivních látek a biologická aktivita. Vybrané vzorky byly dále testovány na vliv na lidské buňky. Nejlepší vzorky byly enkapsulovány do liposomových částic a nanovláken. Jako konečná fáze této části byly opět vybrané vzorky využity v aplikaci do potravinářství a kosmetiky.

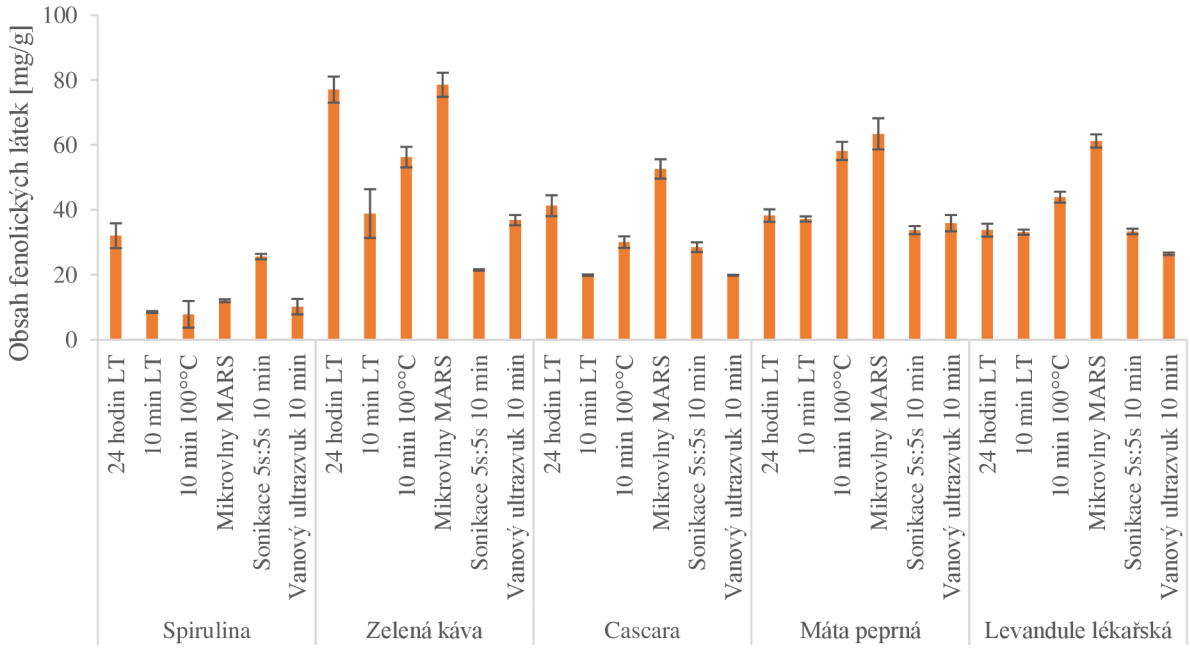
Nejvyšších výtěžností extrakcí kávových vzorků bylo dosaženo při extrakci do vody ethanolu (0–80 %) se pohybovala v rozmezí 15–28 %. Extrakce pomocí systému Soxhtex do hexanu se výtěžností pohybovaly mezi 3,5–10,5 %. Při porovnání extrakce do vody a ethanolu se obsah flavonoidů výrazně nelišil a jejich obsah se pohyboval okolo 5 mg/g. Naopak v případě celkových fenolických látek a antioxidační aktivity se navzájem lišily jak vzorky jednotlivých druhů kávy, tak i obsah těchto látek v různých extraktech. Vhodným rozpouštědlem byla tedy voda a ethanol o nižších koncentracích. To samé platilo i pro hodnoty SPF. U většiny vzorků extraktů z kávových materiálů byla nejvyšší hodnota SPF pro extrakty do 20 a 40% ethanolu. Vysokou hodnotu SPF (nad 30) měly vzorky robusta, bezkofeinová káva, směs arabika a robusta (1:1) a oba vzorky zelených káv. Druhým sledovaným parametrem v ochraně vůči slunečnímu záření byla kritická vlnová délka. Pro její hodnotu je důležitá limitní hodnota 370 nm [98]. Této hodnoty bylo docíleno jen u některých extraktů, jako byl extrakt kávy arabika do vody a 96% ethanolu, robusta v 80% ethanolu, kávový olej a bezkofeinová káva ve 20% ethanolu. Do kosmetických aplikacích by bylo vhodné použit kombinaci několika extraktů, kdy by poté výsledný preparát splňoval veškeré podmínky nutné pro kvalitní aktivní látky typu UV filtrů.

Dále byl sledován vliv rozpouštědla a techniky extrakce na obsah aktivních látek ze čtyř bylin. Na Obr. 2 vidíme porovnání obsahu fenolických látek ve vzorcích. Opět byla vhodnějším rozpouštědlem voda a ethanol o nižších koncentracích. Toho bylo využito i v druhém kroku porovnávání, kdy byla porovnávána řada vzorků a šest typů extrakcí za použití vody jako extrakčního rozpouštědla. V tomto případě při porovnávání obsahu celkových fenolických látek (Obr. 3) u jednotlivých typů extrakcí můžeme vidět, že velice záleží na povaze vzorku, který byl extrahován. U teplotně labilnějších vzorků jako je *Spirulina*, byl obsah fenolických látek nejvyšší při jednoduché extrakci po dobu 24 hodin. Druhou nejlepší byla extrakce pomocí sonikace sondovým ultrazvukem, která probíhala po dobu 10 minut. Ve studii Parniakov a kolektiv zjistili, že ideální délka pro extrakci fenolických látek do vody je při sonikace po dobu mezi 7,5–15 minutami [99], což je v souladu s našimi výsledky, kdy sonikace probíhala po dobu 10 minut.




**Obr. 2: Srovnání obsahu celkových fenolických látek při extrakci rozpouštědlem a s využitím mikrovln**

U ostatních vzorků byly nejlepšími způsoby extrakce 24 hodin při laboratorní teplotě a usnadněná extrakce pomocí mikrovln. U obou typů extrakcí obsahovaly extrakty nejvyšší obsahy jak celkových fenolických látek, tak flavonoidů a zároveň vykazovaly i nejvyšší antioxidační aktivitu.




**Obr. 3: Obsah fenolických látek pro různé typy extrakcí**

Kromě těchto vzorků byly dále analyzovány i vzorky esenciálních olejů. U kterých byla stanovena antioxidační aktivita. Většina vzorků vykazovala mírnou antioxidační aktivitu v rozmezí 0,17–0,95 mg TE/ml, avšak vzorky oregana vykazovaly výrazně vyšší antioxidační aktivitu v rozmezí 205,42–233,92 mg TE/ml. Vzorky esenciálních olejů z organa (dobromysl obecná), máty peprné a

levandule byly pořízeny od tří různých výrobců. Jednotlivé výsledky pro danou bylinu se však výrazně nelišily.

Esenciální oleje z máty peprné a levandule lékařské byly podrobeny kvantitativní a kvalitativní analýze pomocí HPLC a GC-MS. Všechny vzorky obsahovaly linalool a limonen. Oba vzorky levandule lékařské obsahovaly vysoké množství linaloolu, což je také podpořeno výsledky z literatury, jelikož linalool je hlavní složkou levandulového esenciálního oleje [80] a [100]. Vzorky máty obsahovaly eugenol v rozmezí 1,6–1,9 mg/ml (0,16–0,19 %). Eugenol se běžně v esenciálním oleji z máty peprné vyskytuje v množství 0,02–0,3 % [101] a [102]. Kromě kvantitativní analýzy pomocí HPLC byla dále provedena kvalitativní analýza pomocí GC/MS. Většina hlavních komponent se shodovala s detekcí pomocí HPLC. Ve všech vzorcích byl potvrzen limonen a eukalyptol. Pouze u vzorků esenciálního oleje z levandule byl detekován kumarin a geraniol. Naopak pouze u vzorků z máty peprné byla opět potvrzena přítomnost eugenolu. Antimikrobiální účinky těchto olejů byly potvrzeny jak pomocí deskových difuzních, tak mikrodilučních testů na kulturách bakterií *S. epidermidis* a *C. acnes*.

Dalším typem vzorků byly mikrořasy a sinice. Pro vzorek sinice *Spirulina* byla pro extrakci fenolických látek a antioxidační aktivity extrakčním činidlem voda. Naopak pro extrakci lipofilních látek jako jsou chlorofyly a karotenoidy byl 96 % ethanol a také hexan s využitím systému Soxhtec. Všechny tři extrakty vykazovaly i vysoké hodnoty antioxidační aktivity a SPF. U mikrořasy *Chlorella vulgaris* byly jednoznačně nejlepšími rozpouštědly 96 % ethanol a extrakce pomocí systému Soxhtec do hexanu. Vodné extrakty z mikrořas a sinic dále obsahovaly vysoké procento rozpustných bílkovin v rozmezí 33–57 hm. Naše data jsou v dobrém souladu s literaturou [103]. Sinice rodu *Spirulina* běžně obsahují 60–70 hm%. V našich extraktech bylo však stanoveno jen 33,7–45,4 hm. % bílkovin. Ty však dle zabarvení extraktu mohly z velké části patřit mezi fykobiliproteiny, jako je c-phykocyanin, kterého bývá 47 % z celkového obsahu proteinů v biomase [104]. U řady vzorků byla v biomase stanoven obsah mastných kyselin. Obsah PUFA se u vzorků sinic *Spirulina* pohyboval v rozmezí 30,7 ± 4,7 %. Vzorky sinice *Nostoc* se lišily obsahem MUFA a SFA. Celkový obsah PUFA byl však velice podobný a dosahoval 33,5 ± 1,5 %. Nejzajímavějším vzorkem byl vzorek *Chlorella sorokiniana*, který obsahoval až 55 % PUFA a zároveň nejméně SFA – okolo 32 %. Jakožto aktivní látky jsou právě z mastných kyselin PUFA velmi cennými především v potravinářství a farmacii [105], [106].

U vzorků karotenogenních kvasinek nakultitovaných na FCH VUT byla nejprve optimalizována metoda extrakce na kmeni *Cystofilobasidium macerans.* Při optimalizaci bylo použito několik organických rozpouštědla a jejich kombinace a ty porovnávány s metodou extrakce dle Folche. Vliv disrupce buněk na kvalitu extraktů byla provedena na kmeni *Rhodotorula kratochvilovae.* Jako nejvhodnější se v prvním kroku ukázala směs methanolu, hexanu a acetonu, případně i s DMSO, které byly srovnatelné s extrakcí dle Folche. Ze všech testovaných metod vyšla

nejlépe metoda využívající DMSO, hexan a 96% ethanol. Tato metoda byla dále využita po porovnání extraktů z několika různých kmenů karotenoidních kvasinek. Extrakty obsahovaly významné množství karotenoidních pigmentů, *R. toruloides* téměř 5 mg/g biomasy a poté *S. pararoseus* s 3,17 ± 0,4 mg/g biomasy Dále byly dobrým zdrojem ergosterolu, ubichinonu a tokoferolu. Nejvíce ergosterolu se nacházelo v extraktu kvasinky *S. pararoseus* (9,0 0,4 mg/g biomasy). Dále u extraktů z kvasinek *R. toruliodes, R. mucilaginosa* a *C. macerans* dosahovaly obsahy ergosterolu v extraktech 6,5–7,8 mg/g biomasy. Další významně zastoupenou látkou byl ubichinon, tedy koenzym $Q_{10}$ a tokoferol, jako jeden z vitamínů E. Obě tyto látky byly nejvíce zastoupeny v extraktu z kvasinky *R. mucilaginosa* 7,1 ± 0,4 mg/g a 1,7 ± 0,2 mg/g. Kromě obsahu aktivních látek byl testován vliv na dvě bakterie (*S. epidermidis* a *E. coli*) a kvasinku *C. glabrata*, kdy byly stanoveny koncentrace MIC, MBC a MFC. MIC se u vzorků pohybovaly v rozmezí 3,1–12,5 obj.% pro bakterie. MBC byly pak v rozmezí 12,5–25 obj.%. Hodnoty MIC a MFC byly pro kvasinku *C. glabrata* 25 obj.%.

## 4.4 ENKAPSULACE EXTRAKTŮ

Jako vhodné materiály pro enkapsulaci extraktů z rostlin a mikroorganismů byly v rámci práce využity liposomy, liposomy s 20% přídavkem PHB připravené metodou sonikace a dále nanovlákna připravená pomocí elektospiningu a forcespinningu.

Z kávových vzorků byly jako vhodné extrakty vybrány na základě předešlých analýz vodné a ethanolové extrakty z pražené kávy *Arabica*, zelené kávy a cascary a hexanové extrakty připravené pomocí systému Soxhtec ze šesti vzorků kávy. Nejvhodnějšími extrakty pro enkapsulaci do částic byly olejové extrakty (hexan), které měly u většiny vzorků nejvyšší enkapsulační účinnost (nad 90%) a dále velikost byla srovnatelná s částicemi bez extraktu. Naopak u ostatních vzorků vedl přídavek extraktu ke zvětšení velikosti a polydisperzity vzorku. Většina vzorků byla koloidně stabilní s hodnotami zeta-potenciálu menšími než −30 mV. U vzorků z pražené, zelené kávy a cascary byly dále proměřeny hodnoty ochranného faktoru vůči slunečnímu záření. Nejvyšší hodnoty měly vodný a ethanolový vzorek ze zelené kávy v liposomech s 20% přídavkem PHB 31,1 ± 3,5 a 37,6 ± 2,4. Postupné uvolňování bylo sledováno především u vodných vzorků zelené a pražené kávy. Ostatní vzorky enkapsulovaný extrakt chránily po dobu delší než 1 hodina v modelovém prostředí ethanolu. Dlouhodobá stabilita vzorků po dobu jednoho měsíce ukázala, že částice jsou stále stabilní a jejich velikost se výrazně oproti stavu po přípravě nezměnila.

Olejové extrakty byly dále enkapsulovány do vláken z PHB pomocí elektrospinningu a forcespinningu. Při sledování krátkodobé stability v modelovém prostředí vody a ethanolu bylo zjištěno, že u vzorků připravených pomocí metody elektrospinningu s extraktem z pražené a zelené kávy nelze pozorovat téměř žádný rozdíl mezi jednotlivými prostředími. Pouze u vzorku

cascary je patrné, že aktivní látky se mnohem ochotněji uvolňovaly do ethanolového prostředí. Naopak u vzorků připravených metodou forcespinningu docházelo k měřitelnému uvolňování aktivních látek ve sledovaném horizontu 24 hodin výhradně do vodného prostřední. V ethanolovém prostředí byly naměřeny aktivní látky v roztoku až po 24 hodinách. Vzorky byly také podrobeny dlouhodobé stabilitě. Nejvíce aktivních látek se uvolnilo při enkapsulaci extraktu ze zelené kávy, kdy se po měsíci uvolnilo ze vzorku vláken připravených metodou elektrospinning o 50 % více aktivních látek oproti hodnotám v den přípravy, zatímco u vzorku připraveného pomocí metody forcespinning to byl dvojnásobek uvolněných aktivních látek.

Dalším souborem vzorků pro enkapsulaci do částic byly esenciální oleje, jakožto zástupci lipofilních aktivních látek. Zde bylo zjištěno, že přídavek esenciálního oleje v rozmezí 10–100 ul neměl výrazný vliv na základní charakteristiky liposomových částic oproti čistým liposomům. Pro další práci byl především z ekonomického hlediska vybrán přídavek 20 a 40 ul. Částice byly koloidně stabilní v celém sledovaném horizontu jednoho měsíce.

## 4.5 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY

U vybraných extraktů byly dále provedeny testy cytotoxicity na dvě lidských buněčných liniích (HaCaT a Caco2).

Buňky linie HaCaT po přidání liposomů s přídavkem kávového extraktu vykazovaly obecně vyšší životaschopnost, a tedy vyšší rychlost metabolismu. Přídavek PHB snížil viabilitu buněk. Nicméně, PHB liposomy vykazovaly signifikantní snížení aktivity mitochondriální sukcinát dehydrogenázy u buněčné linie HaCaT po přídavku 10 % ($p<0,05$), 12 a 14 % ($p<0,01$). Signifikantní rozdíl byl pozorován mezi vzorky liposomů a PHB liposomů po 24 hodinách u všech přídavků. U liposomů s 20% přídavkem PHB obsahujícími jak vodné, tak ethanolové extrakty ze zelené kávy byl sledován rozdíl oproti kontrole alespoň ve dvou různých koncentracích. Přídavek extraktu ze zelené kávy mírně snížil negativní vliv přídavku částic na buňky. Liposomy s 20% PHB obsahující extrakt ze zelené kávy můžeme považovat za bezpečné až do přídavku 8 obj.%.

V Tab. 2 jsou uvedeny vypočítané hodnoty pro letální koncentrace daných vzorků na buněčnou linii HaCaT. Hodnoty $LC_{10}$ se pohybovaly pro většinu vzorků v rozmezí 1–3,5 obj.%. Jen pro jediný vzorek (vodný extrakt kávy robusta) byla dopočítána hodnota $LC_{10}$ nad touho hranicí, a to hodnota 5,79 obj,%. Přestože je tato hodnota téměř dvojnásobná oproti většině ostatních vzorků, lze extrakt dále využít. Hodnoty $LC_{50}$ se poté pohybuje v rozmezí 6–15,5 obj.%.

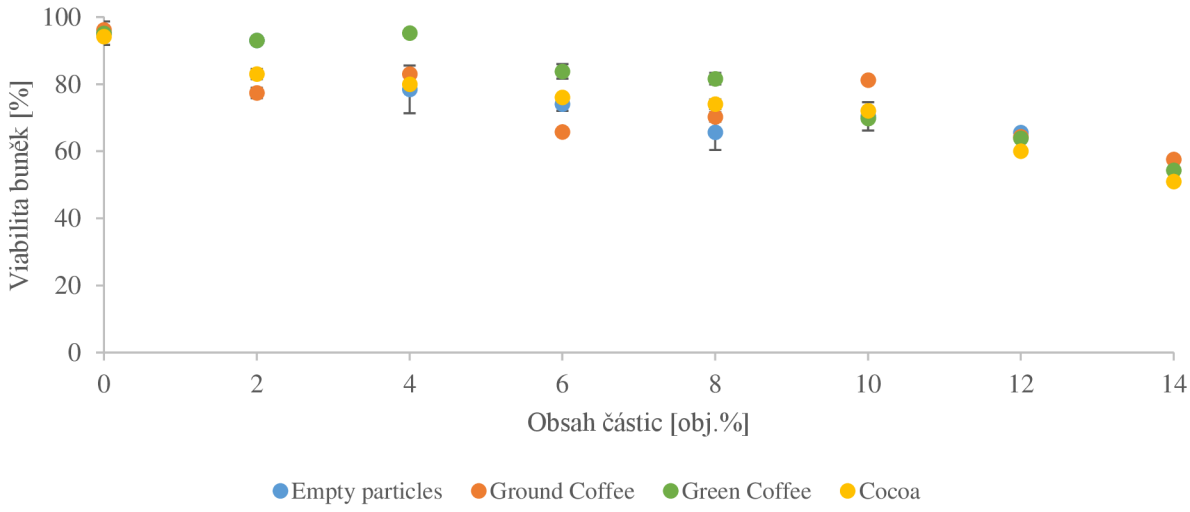
Pro otestování bezpečnosti vybraných vzorků kávy byla dále sledován jejich vliv na metabolismus buněčné linie Caco2 pro případné aplikace v potravinářství (Obr. 4). U vzorků bylo patrné, že v testovaném rozsahu koncentrací od 2–14 % neklesla viabilita buněčné linie Caco2 pod hodnotu 50 %. Nejzajímavějším

vzorkem byl vzorek liposomů se zelenou kávou, který až do přídavku 8 obj. % ovlivnil viabilitu buněčné kultury jen minimálně (viabilita nad 80 %).

**Tab. 2: Hodnoty letálních koncentrací pro jednotlivé vzorky extraktů a částic obohacených o olejové extrakty testovaných na buněčné linii HaCaT**

| Vzorek | $LC_{10}$ [obj.%] | $LC_{50}$ [obj.%] | $LC_{90}$ [obj.%] |
|---|---|---|---|
| Arabika 60% etOH | 3,25 | 8,00 | ND |
| Robusta voda | 5,79 | ND | ND |
| Zelená káva 20% etOH | 3,34 | 9,63 | ND |
| Mix 1:1 40% etOH | 2,76 | 5,89 | ND |
| Cascara voda | 6,1 | 7,9 | Nad 25 |
| Liposomy Arabica olej | 0,97 | 14,44 | 27,91 |
| Liposomy Mix 1:1 olej | 1,88 | 15,29 | 29,91 |
| PHB 20% Arabica olej | 1,67 | 11,49 | 23,04 |
| PHB 20% Mix 1:1 olej | 1,71 | 10,12 | 21,24 |
| lip zelená káva voda | 4,9 | 10,5 | 17 |
| lip zelená káva 40 % etOH | 7 až 11 | nad 14 | nad 14 |
| PHB pražená káva voda | 1 | nad 14 | nad 14 |
| PHB zelená káva voda | 5,0 | 14,5 | nad 14 |
| PHB zelená káva 40% etOH | 2 | nad 14 | nad 14 |

ND – nelze dopočítat




**Obr. 4: Vliv vzorků kávy a kakaa na viabilitu buněčné linie Caco2**

U vybraných vzorků bylinných extraktů byl sledován jejich vliv na viabilitu lidských buněk linie HaCaT. Z naměřených dat můžeme říci, že u všech vodných extraktů přídavek do 2 % téměř neovlivnil viabilitu buněčné kultury (viabilita 90 %, hodnoty $LC_{10}$). U ostatních extraktů nešla hodnota $LC_{10}$ vypočítat, nebo byla v rozmezí 0–4 %. Naopak u většiny vzorků byla hodnota pro $LC_{90}$ mimo měřený interval koncentrací. V takových případech byla buď dopočítána z průběhu předchozích koncentrací, nebo označena jako hodnota nad 25 obj. %, pokud

nemohla být hodnota dopočítána. Při enkapsulaci extraktů do liposomů došlo v obou případech ke snížení vlivu extraktu na viabilitu buněk a bylo by možné je přidat do formulací ve vyšších koncentracích.

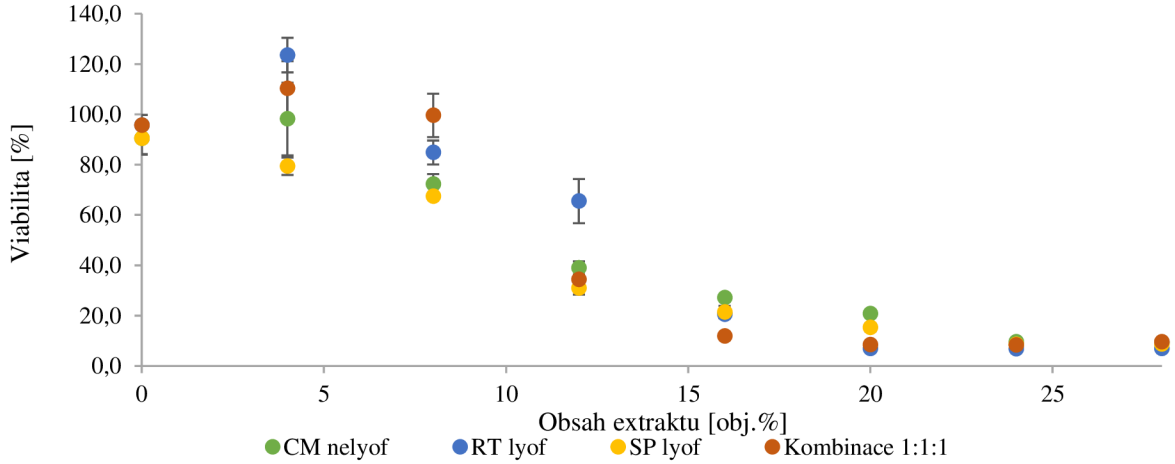
Vybrané esenciální oleje byly enkapsulovány do liposomových částic a testována jejich bezpečnost na buněčné linii Caco2 pro možné využití v potravinářství. Nejlépe v testování dopadly vzorky s esenciálním olejem z máty peprné od firmy Saloos. Zde nebylo možné dopočítat ani hodnotu $LC_{10}$, kdy přežilo 90 % buněčné kultury, jelikož veškeré testované koncentrace byly v intervalu 80–90 % viability. Druhý nejlepší byl druhý vzorek esenciálního oleje z máty peprné od firmy Fichema. U těchto vzorků byly koncentrace $LC_{10}$ nad deseti procenty. U vzorků s esenciálními oleji z levandule lékařské se pohybovala $LC_{10}$ okolo 22 % přidaného vzorku pro vzorek od firmy Fichema a okolo 9 % u vzorku od firmy Saloos. Tyto přídavky vzorků naprosto postačují pro použití jak v potravinářství, tak v kosmetice. V potravinářství řada skupin testuje přídavek esenciálních olejů do potravinářských produktů pro využití jako konzervanty a látky prodlužující dobu spotřeby [107].

Při testování vlivu extraktů na viabilitu lidských buněk bylo zjištěno, že u všech testovaných extraktů z mikrořas a sinic ve volné a enkapsulované podobě je hodnota $LC_{10}$ v rozmezí 0,4–19 obj.% a $LC_{50}$ v rozmezí 15,9–více než 25 obj.%. Tato data naznačují, že jsou testované vzorky vhodné pro další aplikace v daném koncentračním rozmezí.

U tři vzorků karotenogenních kvasinek (*C. macerans*, *R. toruloides* a *S. pararoseus*) byl zkoumán vliv na lidské buňky linie HaCaT. Z dat na Obr. 5 je parné, že u všech testovaných extraktů z karotenogenních kvasinek při koncentraci 2 % až na vzorek lyofilizované biomasy kvasinky *S. pararoseus* viabilita kultury keratinocytů vzrostla nad 100 %. To naznačuje, že vzorky podporovaly růst a metabolismus buněk a obecně na ně měly pozitivní vliv. Se vzrůstajícím přídavkem vzorků v testované kultuře se viabilita snižovala. Při vyšších koncentracích již všechny vzorky viabilitu buněk ovlivnily a ta klesla pod 40 %. To mohlo být částečně způsobeno ethanolem, ve kterém byly vzorky rozpuštěny a který ve vyšších koncentracích působí na lidské buňky cytotoxicky. Jo a kolektiv zjistili, že již 5 % přídavek ethanolu po 24 hodinové expozici ovlivnil viabilitu buněk a ta klesla na průměrnou hodnotu 45 % [108]. Naše vzorky však viability 40 % dosáhly až při přídavku 12 %. Tato skutečnost opět podporuje zjištění, že připravené extrakty obsahovaly aktivní látky, jež působily na lidské keratinocyty linie HaCaT pozitivně.

Na základě dat z Obr. 5 byly dopočítány letální koncentrace. Tato data jsou zobrazena v Tab. 3. Nejvyšší přídavek při minimálním ovlivnění buněk bylo možné přidat v případě vzorku kombinace všechny tří extraktů, a to 8,4 %. Při $LC_{50}$ se u všech vzorků pohybujeme okolo nebo mírně nad 10 % přídavkem. Takovýto přídavek by byl pro kosmetické aplikace naprosto postačující. Zároveň

obsah ethanolu 10 a více procent obsahuje i řada komerčně dostupných kosmetických formulací. Při použití emulgátoru emulsun je výrobcem doporučeno do formulace přidat maximálně 10 % ethanolu. Poté se začíná formulace destabilizovat [109].




**Obr. 5: Test cytotoxicity na linii HaCaT pro extrakty z tří kmenů karotenoidních kvasinek a jejich kombinace**

| Vzorek | $LC_{10}$ [obj.%] | $LC_{50}$ [obj.%] | $LC_{90}$ [obj.%] |
|---|---|---|---|
| **CM nelyof** | 6,34 | 11,48 | 22,86 |
| **RT lyof** | 6,94 | 13,20 | 19,10 |
| **SP lyof** | 1,89 | 9,96 | 22,20 |
| **Kombinace 1:1:1** | 8,40 | 11,87 | 18,18 |

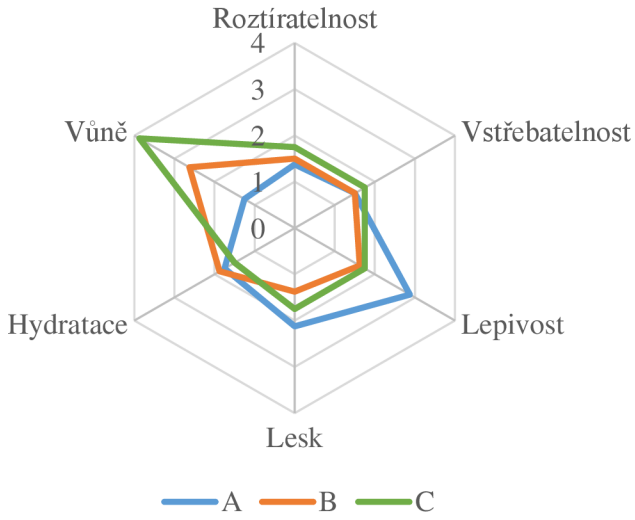
**Tab. 3: Vypočítané hodnoty letálních koncentrací pro vzorky karotenogenních kvasinek na buněčné linii HaCaT**

Pro porovnání byly připraveny liposomy obsahující komerčně dostupný β-karoten a přidány k lidským buňkám linie HaCaT. Z naměřených dat bylo patrné, že vzorek liposomů s β-karotenem neměl žádný významný vliv na viabilitu buněk v celém testovaném rozsahu koncentrací 2–14 obj.% (viabilita nad 80 %).

## 4.6 APLIKACE EXTRAKTŮ

Vybrané extrakty byly ve volné a enkapsulované formě využity jako aktivní látky kosmetických formulací. U těchto vzorků byla stanovena SPF, dále senzorická analýza a v neposlední řadě také stabilita pomocí analytické centrifugace.

Ze vzorků kávy byl jako nejlepší pro aplikaci do kosmetiky vybrán 40% ethanolový extrakt ze zelené kávy. Ten byl přidán k emulznímu extraktu ve volné a enkapsulované formě. Přídavek tohoto vzorku vedl ke zvýšení stability emulze, což bylo změřeno pomocí analytické centrifugace. Při senzorické analýze (Obr. 6) bylo zjištěno, že z šesti sledovaných parametrů (roztíratelnost, vstřebatelnost, lepivost, lesk, hydratace a vůně) ovlivnil přídavek extraktu ze zelené kávy především pozitivně lepivost a zároveň negativně vůni připravené emulze. Ostatní parametry byly hodnoceny u všech připravených emulzí velmi dobře (hodnoty 1,25–2,1 na škále od nejlepšího po nejhorší 1–5).



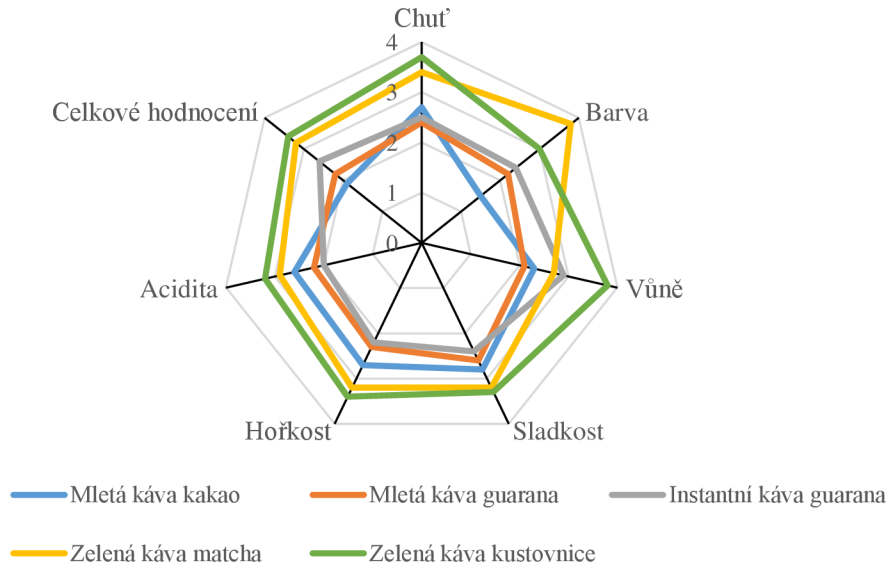

**Obr. 6: Senzorická analýza vzorků emulzí A–C**

Kromě aplikace do kosmetiky byly u kávových vzorků také připraveny modelové nápoje na bázi kávového základu s rostlinnými extrakty ve volné a enkapsulované podobě byl sledován obsah fenolických látek (Tab. 4). Obsah fenolických látek po enkapsulaci se výrazně nezměnil, nebo mírně snížil. To bylo zapříčiněno složením samotných extraktů. Pokud obsahovaly vyšší obsah fenolických látek, po enkapsulaci se celkový volný obsah fenolických látek snížil, jak tomu bylo u vzorku s extraktem z matchy (97,9 ± 5,2 mg/g fenolických látek). Můžeme tedy říci, že enkapsulace aktivních látek v rámci extraktů do liposomů byla ve všech případech úspěšná.

**Tab. 4: Obsah fenolických látek v modelových nápojích s volnými a enkapsulovanými extrakty**

| Vzorek | Obsah fenolických látek [mg/250 ml] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Kakao | 322,0 ± 5,0 | 164,4 ± 8,3 | 179,0 ± 5,0 | 811,4 ± 7,7 |
| Matcha | 434,2 ± 8,0 | 316,2 ± 8,3 | 334,5 ± 3,3 | 945,5 ± 1,6 |
| Kustovnice | 266,7 ± 4,5 | 146,6 ± 2,4 | 164,4 ± 9,4 | 569,3 ± 1,8 |
| Guarana | 328,7 ± 4,7 | 231,2 ± 3,9 | 257,3 ± 6,3 | 905,3 ± 3,3 |
| Kakao liposomy | 232,2 ± 2,4 | 135,3 ± 2,3 | 175,9 ± 5,0 | 621,0 ± 4,1 |
| Matcha liposomy | 223,3 ± 4,8 | 152,5 ± 1,4 | 211,3 ± 4,7 | 931,4 ± 11,1 |
| Kustovnice liposomy | 244,7 ± 7,9 | 142,5 ± 6,8 | 144,8 ± 1,1 | 152,4 ± 2,4 |
| Guarana liposomy | 392,5 ± 6,6 | 159,7 ± 2,2 | 171,4 ± 5,5 | 181,6 ± 2,2 |

V grafu na Obr. 7 jsou zobrazeny výsledky senzorické analýzy modelových nápojů na bázi kávy s rostlinnými extrakty. Z pěti připravených vzorků byl jako nejlepší vyhodnocen vzorek směsi mleté kávy a kakaa, mleté kávy a guarany a instantní kávy a guarany. V rámci celkového hodnocení dosáhl nejlepší známky 1,9 ± 0,7 vzorek mleté kávy s extraktem z kakaa. Tento vzorek byl nejlepší dále v porovnání barvy. Nejhůře hodnocen byl vzorek zelené kávy a kustovnice.




**Obr. 7: Senzorická analýzy kávových nápojů obohacených o rostlinné extrakty**

Jelikož právě sinice *Anabaena torulosa* a *Spirulina* obsahovaly vysoké množství řady aktivních látek (fenolické sloučeniny, proteiny, chlorofyly), které vykazují biologickou aktivitu, a to především antioxidační, byly tyto extrakty vhodné pro aplikaci do kosmetických emulzí. Připravené emulze s těmito extrakty byly celkově u většiny respondentů hodnoceny kladně. Dále byla pomocí kamery Visioscope měřena deskvamace, množství pórů, pigmentových skvrn a vrásek před a po 14-ti denní aplikaci. Deskvamace (olupování) kůže se u většiny respondentů zlepšila. Ostatní parametry se lišily v závislosti na daném respondentovi. Dále při měření vrásek došlo po aplikaci emulze L3 (parafínový olej s vodným extraktem ze sinice *Spirulina*, u respondenta č. 2 ke snížení vrásek o 7,4 %. Podobných hodnot redukce vrásek dosahovala tato emulze i u respondenta č. 3 a 5. Tato data podporuje i řada výzkumů a udělených patentů, kdy byl prokázán účinek sinice *Spirulina* při redukci vrásek [110], [111] a [112].

V rámci této práce byly dále připraveny emulze s přídavkem kvasinkového extraktu z kmenů *C. macerans*, *R. toruloides* a *S. pararoseus*. K emulznímu základu byl dále v jednom případě přidán oxid zinečnatý a dále kvasinkové extrakty. Jako nejlepší byla v rámci senzorického hodnocení vyhodnocena emulze A, tedy samotný emulzní základ. Přídavek oxidu zinečnatého (vzorek B) vedl ke zhoršení senzorických parametrů a vzorek dopadl nejhůře. Přídavek ZnO a extraktů karotenoidních kvasinek (vzorek C) vedl ke zlepšení ve všech sledovaných parametrech kromě vzhledu oproti vzorku B. Vůně, roztíratelnosti a vstřebatelnost byla u vzorků A a C srovnatelná. Naopak v rámci lepivosti byl tento vzorek hodnocen lépe než samotný emulzní základ. Celkově tedy vedlo využití kvasinkových extraktů ke zlepšení vlastností oproti emulzi obsahující pouze oxid zinečnatý.

# 5 ZÁVĚR

Cílem předložené disertační práce byla optimalizace extrakce a charakterizace extraktů z vybraných druhů rostlin a mikroorganismů, a to především ze skupiny mikrořas, sinic a karotenoidních kvasinek. Při optimalizaci extrakcí byl sledován vliv charakteru extrakčního činidla, dezintegrace buněk a dále vliv speciálních technik, které mohou extrakce usnadnit. Šlo o extrakce usnadněné pomocí sondového a vanového ultrazvuku a mikrovln. V rámci charakterizace bylo s přihlédnutím na zdrojový materiál analyzováno složení připravených extraktů. Sledován byl obsah aktivních látek, jako jsou fenolické látky, flavonoidy, kofein, lipofilní pigmenty a aktivní látky, jako je ubichinon, tokoferol a ergosterol. Z dalších lipofilních látek byl sledován profil mastných kyselin. Kromě obsahu aktivních látek byla dále zkoumána antioxidační aktivita, hodnoty ochranného faktoru vůči slunečnímu záření (SPF), kritické vlnové délky a dále vlivy na živé kultury. Ty zahrnovaly panel bakterií a jednu kvasinku (*C. glabrata*) a dále dvě linie lidských buněk, keratinocyty linie HaCaT a buňky adenokarcinomu tlustého střeva Caco2. Na lidských buňkách byl sledován vliv přídavku vzorku na viabilitu buněk pomocí MTT a LDH testu cytotoxicity. U vybraných vzorků byl dále sledován vliv na genonotoxicitu pomocí SOS chromotestu. V rámci práce byla navrhnuta a vytvořena řada aplikací připravených materiálů v potravinářství a kosmetice a u některých z nich provedena i senzorická analýza.

V části věnované rostlinným vzorkům bylo studováno několik druhů kávy a dále speciálních rostlinných druhů s výrazným biologickým účinkem. Vzorky kávy patřily mezi zástupce druhů *Arabica* i *Canephora* (Robusta) a cascara. Nejlepším extrakčním rozpouštědlem byla směs vody s ethanolem, kdy záleželo na konkrétních aktivních látkách. Pro fenolické látky, flavonoidy a antioxidační aktivitu byl nejlepším extrakčním rozpouštědlem 60% roztok ethanolu pro vzorek kávy arabika, dále voda a 20% ethanol pro vzorek kávy robusta, 40% ethanol pro směs arabiky a robusty 1:1 tyto vzorky obsahovaly průměrně 30 mg/g fenolických látek a antioxidační aktivitu srovnatelnou se 150 mgTE/g. Pro vzorky zelené kávy byl nejlepším rozpouštědlem 40% ethanol a pro cascaru voda a 20% ethanol. Dále byl u vodných extraktů stanoven obsah kofeinu, dle očekávání byl nejvyšší obsah naměřen u kávy robusta (50,1 ± 0,3 mg/g), nejméně u bezkokfeinové kávy (7,9 ± 1,9 mg/g). Ze specifických účinků byla měřena hodnota SPF a KVD. Nejvyšší hodnotu SPF měly extrakty v 40% ethanolu robusta (39,1 ± 0,4), bezkofeinová káva (35,8 ± 0,1) a zelená káva (30,7 ± 0,3). Limitní hodnota pro kritickou vlnovou délku (>370 nm) byla splněna jen u některých extraktů. Kávové oleje byly dále podrobeny analýze mastných kyselin pomocí GC. Obsah SFA byl v rozmezí 45,4 ± 1,5 %, MUFA 10,1 ± 1,8 % a PUFA 44,4 ± 1,9 %. Vybrané extrakty byly enkapsulovány do liposomů a liposomů s 20% přídavkem PHB. Nejvyšší enkapsulační účinnost přes 90 % měly kávové oleje. U většiny vzorků nepřesáhla průměrná velikost 500 nm. Nejmenší velikost okolo 180 nm byla opět u vzorků liposomů s kávovými oleji a v případě liposomů s 20% přídavkem PHB

okolo 250 nm. Většina připravených vzorků byla koloidně stabilní, a tedy mimo interval ± 30 mV. Stabilita částic s PHB byla srovnatelná nebo vyšší oproti liposomovým částicím. To platilo i pro měření dlouhodobé stability, kdy po měsíci skladování byla většina vzorků stabilní a hodnota zeta-potenciálu měla v případě částic s PHB nižší hodnotu.

Kromě částic byly kávové extrakty dále inkorporovány do struktury nanovláken z PHB, která byla připravena pomocí forcespinningu a elektrospinningu. U těchto vzorků byla sledována především stabilita a případná degradace nanovláken při skladování a ve vodě a ethanolu. U vzorků připravených pomocí elektrospinningu s extraktem z pražené a zelené kávy nelze pozorovat téměř žádný rozdíl mezi jednotlivými prostředími. Pouze u vzorku cascary se aktivní látky mnohem ochotněji uvolňovaly do ethanolového prostředí. Naopak u vzorků připravených metodou forcespinningu docházelo k měřitelnému uvolňování aktivních látek během 24 hodin výhradně do vodného prostředí, zatímco v ethanolu byly naměřeny aktivní látky až po 24 hodinách. Při porovnávání dlouhodobé stability byly nejstabilnější vzorky pražené kávy ve vláknech připravených metodou elektrospinningu a cascary připravené pomocí obou metod zvlákňování. Kávové extrakty a částice byly dále podrobeny testům cytotoxicity na buněčné linii HaCaT. Ve většině případů se $LC_{10}$ pohybovala v rozmezí 1–5 obj.% a hodnoty $LC_{50}$ v rozmezí 6–14 obj.%, což dělá tyto vzorky vhodné pro aplikace do kosmetiky. Pro aplikace v potravinářství byly vybrané vzorky otestovány i na buněčné linie Caco2. U vzorků bylo patrné, že v testovaném rozsahu koncentrací od 2–14 % neklesla viabilita buněčné linie Caco2 pod hodnotu 50 %. Nejzajímavějším vzorkem byl vzorek liposomů se zelenou kávou, který až do přídavku 8 obj. % ovlivnil viabilitu buněčné kultury jen minimálně (viabilita nad 80 %).

Vybrané vzorky kávy byly dále využity pro aplikace v potravinářství a kosmetice. Pro aplikace v potravinářství byly připraveny modelové energetické nápoje z kávových základů s vodnými extrakty z kakaa, matchy, guarany a kustovnice, které mohou zvýšit kvalitu, účinek a dynamiku uvolňování aktivních látek. V rámci celkového hodnocení dosáhl nejlepší známky 1,9 ± 0,7 vzorek mleté kávy s extraktem z kakaa a dále vzorek mleté kávy s extraktem z guarany. Tento vzorek byl zároveň nejlepší v parametu vůně. Při kosmetické aplikaci byla navržena emulze s přírodním UV filtrem. Jak při senzorické analýze, tak analýze stability pomocí analytické centrifugace vyšel jako nejlepší vzorek obsahující extrakt ze zelené kávy.

U extrakce aktivních látek byly porovnávány klasické extrakce s extrakcemi zrychlenými pomocí teploty nebo usnadněnými pomocí mikrovln a ultrazvuku. Nejprve byl sledován vliv rozpouštědla, kdy byly vzorky čtyř bylin extrahovány do řady 0–96 % ethanol po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě a pomocí extrakce usnadněné pomocí mikrovln (MARS). Nejlepším extrakčním činidlem se ukázala ve všech případech voda. Pro další porovnávání šesti typů extrakcí byla z tohoto důvodu vybrána právě voda a porovnávány vzorky sinice *Spirulina*, zelená káva,

cascara, máta peprná a levandule lékařská. Pro sinici *Spirulina* byla nejlepší extrakce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Pro ostatní vzorky však byly nejlepšími extrakcemi právě 24 hodin při laboratorní teplotě nebo 10 min s využitím mikrovln. Tato extrakce je finančně náročnější na pořízení přístroje, ale významně zkrátí čas extrakce vzorku. Ze sledovaných vzorků byl nejlepší extrakt máty peprné pomocí mikrovln, který vykazoval antioxidační aktivitu o hodnotě 80,5 ±2,1 mgTE/g. Kromě extraktů byly dále analyzovány esenciální oleje. U těchto vzorků měly nejvyšší antioxidační aktivitu vzorky esenciálních olejů z oregana (dobromysl obecná) 200–220 mgTE/g. Esenciální oleje byly dále enkapsulovány do liposomových částic. Jejich stabilita byla sledována v průběhu jednoho měsíce. Velikost částic byla vždy do 200 nm a během celého časového úseku byly koloidně stabilní.

U sinic a mikrořas byl rovněž sledován vliv rozpouštědla na extrakci aktivních látek. Přestože tyto materiály neměly vysoký obsah fenolických látek a nižší antioxidační aktivitu, obsahovaly významné množství chlorofylů, karotenoidů a vodný extrakt ze sinice *Spirulina* dále obsahoval fykobiliproteiny. Jako nejlepší extrakční rozpouštědla se pro většinu vzorků mikrořas a sinic ukázala voda, 96 % ethanol a směs metOH:ethylacetát 1:1. Při sledování profilu mastných kyselin v biomase obsahovaly vzorky sinic průměrně 25–35 % PUFA a mikrořasy 20–55 % PUFA. Při testování vlivu extraktů na viabilitu lidských buněk bylo zjištěno, že u všech testovaných extraktů ve volné a enkapsulované podobě je hodnota $LC_{10}$ v rozmezí 0,4–19 obj.% a $LC_{50}$ v rozmezí 15,9–více než 25 obj.%. Tato data naznačují, že jsou testované vzorky vhodné pro další aplikace v daném koncentračním rozmezí. Dva extrakty vodný extrakt sinice *Spirulina* a extrakt v 96% ethanolu ze sinice *Anabaena torulosa* byly využity jako zdroje aktivních látek v kosmetických emulzích. Pro srovnání byly vytvořeny dva typy základů – parafínový a rostlinný. V rámci senzorické analýzy byl vyhodnocen jako nejlepší vzorek rostlinný základ, jako další v pořadí byly vzorky ve stejném základu s jednotlivými extrakty a dále pak parafínový základ s extraktem ze sinice *A. torulosa*.

Optimalizace extrakce aktivních látek z kvasinek byla provedena pomocí dvoukrokové optimalizace, kdy byl nejprve pro omezený počet vzorků sledován vliv extrakčního rozpouštědla a následně i metoda dezintegrace buněčné stěny kvasinek. Ze všech testovaných metod vyšla nejlépe metoda využívající DMSO, hexan a 96% ethanol. Tato metoda byla dále využita po porovnání extraktů z několika různých kmenů karotenoidních kvasinek. Extrakty obsahovaly významné množství karotenoidních pigmentů, *R. toruloides* téměř 5 mg/g biomasy a poté *S. pararoseus* s 3,17 ± 0,4 mg/g biomasy Dále byly dobrým zdrojem ergosterolu, ubichinonu a tokoferolu. Nejvíce ergosterolu se nacházelo v extraktu kvasinky *S. pararoseus* (9,0 0,4 mg/g biomasy). Dále u extraktů z kvasinek *R. toruliodes, R. mucilaginosa* a *C. macerans* dosahovaly obsahy ergosterolu v extraktech 6,5–7,8 mg/g biomasy. Další významně zastoupenou látkou byl

ubichinon, tedy koenzym Q10 a tokoferol, jako jeden z vitaínů E. Obě tyto látky byly nejvíce zastoupeny v extraktu z kvasinky *R. mucilaginosa* 7,1 ± 0,4 mg/g a 1,7 ± 0,2 mg/g. Kromě obsahu aktivních látek byl dál u extraktů testován vliv na dvě bakterie jednu kvasinku, kdy byly stanoveny koncentrace MIC, MBC a MFC. MIC se u vzorků pohybovaly v rozmezí 3,1–12,5 obj.% pro bakterie. MBC byly pak v rozmezí 12,5–25 obj.%. Hodnoty MIC a MFC byly pro kvasinku *C. glabrata* 25 obj.%. Jako poslední byl u tří vybraných vzorků zkoumán vliv na lidské buňky linie HaCaT. Hodnoty Letálních koncentrací $LC_{10}$ byly v rozmezí 2–7 obj.% pro jednotlivé kvasinky. Při použití kombinace kvasinek v poměru 1:1:1 se hodnota $LC_{10}$ zvýšila na 8, Hodnoty $LC_{50}$ byly u všech extraktů i kombinací odpovídající 10 % přídavku, který by byl v kosmetice naprosto postačující.

Pro další aplikace bylo často nutné vzorky ochránit před vnějšími vlivy pomocí enkapsulačních technik. V práci byl optimalizováno složení liposomových částic s přídavkem PHB. Na základě analýz, velikosti, polydisperzitního indexu, koloidní stability, zobrazení částic pomocí kryo-TEM, stanovení SPF a změření jejich vlivu na lidské buňky byl vybrán pro další práci vzorek částic s 20% přídavkem PHB. Jako další techniky enkapsulace byly porovnávány metody přípravy nanovláken z PHB, a to pomocí tří metod, elektrospinningu, forcespinningu a pomocí srážení. Jako druhý materiál pro tvorbu vláken byla v laboratoři zavedena metoda zvlákňování želatiny pomocí elektrospinningu. V tomto případě byl sledován vliv přídavku esenciálních olejů na charakteristiky vláken. Bylo zjištěno, že při 2 % přídavku EO nedochází k významným změnám v charakteristice vláken a jejich rozložení na kolektoru. Při přídavku 20 % již byly patrné změny v orientaci vláken na kolektoru. Vlákna byla méně orientována v osách X a Y.

Celkově byly připravené extrakty bohaté na aktivní látky (fenolické látky v kávových a bylinných extraktech) a řada z nich vykazovala vysokou antioxidační aktivitu (vodný extrakt z máty peprné a esenciální olej z dobromysl obecného), SPF (robusta a zelená káva), splňovala podmínku kritické vlnové délky a měla dále pozitivní vliv na lidské buňky. Bylo navrženo několik typů aplikačních forem, které mají potenciál v průmyslové výrobě a byly podány příslušné patentové přihlášky. Při další práci by bylo vhodné spojit vybrané extrakty z různých materiálů a sledovat, jaký bude vliv těchto směsných extraktů.

# 6 BIBLIOGRAFIE


[1] FAVOR, Justin, Ethan ANDERSON a Robert HICKNER. Novel Method for Detection of Reactive Oxygen Species in vivo in Human Skeletal Muscle. *Physiol Res.* [online]. 2014, **63**(3), 387–392 [cit. 2019-04-24].

[2] CADENAS, Enrique a Lester PACKER. *Handbook of antioxidants*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 0-8247-0547-5.

[3] PHAM-HUY, LA, H HE a C PHAM-HUY. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* [online]. 2008, **4**(2), 89-96 [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614697/

[4] PHANIENDRA, Alugoju, Dinesh JESTADI a Latha PERIYASAMY. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [online]. 2015, **30**(1), 11-26 [cit. 2019-04-16]. ISSN 0970-1915. Dostupné z: doi:10.1007/s12291-014-0446-0

[5] EL GOLLI-BENNOUR, Emna a Hassen BACHA. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology* [online]. 2011, **287**(1-3), 1-7 [cit. 2019-04-11]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2011.06.002

[6] JANSEN, Rebecca, Uli OSTERWALDER, Steven WANG, Mark BURNETT a Henry LIM. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2013, **69**(6), 8671-86714 [cit. 2019-03-26]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2013.08.022

[7] HEDAYAT, Kamand, Saman AHMAD NASROLLAHI, Alireza FIROOZ, Hossein RASTEGAR a Manouchehr DADGARNEJAD. Comparison of UVA Protection Factor Measurement Protocols/p. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2020, **13**, 351-358 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1178-7015. Dostupné z: doi:10.2147/CCID.S244898

[8] YOUNG, Antony, Joël CLAVEAU a Ana ROSSI. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2017, **76**(3), 100-109 [cit. 2019-03-26]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2016.09.038

[9] JANSEN, Rebecca, Steven WANG, Mark BURNETT, Uli OSTERWALDER a Henry LIM. Photoprotection. *Journal of the American*

*Academy of Dermatology* [online]. 2013, **69**(6), 8531-85312 [cit. 2019-03-26]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2013.08.021

[10] FLORA, Swaran J. S. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, **2**(4), 191-206 [cit. 2019-04-23]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.4161/oxim.2.4.9112

[11] GULDIKEN, Burcu, Gulay OZKAN, Gizem CATALKAYA, Fatma CEYLAN, Ipek EKIN YALCINKAYA a Esra CAPANOGLU. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **119**, 37-49 [cit. 2019-03-12]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.05.050

[12] STEENKAMP, V., M.C. GOUWS, M. GULUMIAN, E.E. ELGORASHI a J. VAN STADEN. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2006, **103**(1), 71-75 [cit. 2019-04-23]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.07.007

[13] SHAN, Bin, Yi-Zhong CAI, John BROOKS a Harold CORKE. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **117**(1), 112-119 [cit. 2019-04-23]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003

[14] ZHANG, Yunbin, Xiaoyu LIU, Yifei WANG, Pingping JIANG a SiewYoung QUEK. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Control* [online]. 2016, **59**, 282-289 [cit. 2019-04-23]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.032

[15] MOSTAFA, Ashraf, Abdulaziz AL-ASKAR, Khalid ALMAARY, Turki DAWOUD, Essam SHOLKAMY a Marwah BAKRI. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2018, **25**(2), 361-366 [cit. 2019-04-23]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2017.02.004

[16] ANAND, J. a N. RAI. Anticandidal synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 2017, **27**(1), 33-45 [cit. 2019-04-23]. ISSN 11565233. Dostupné z: doi:10.1016/j.mycmed.2016.08.004

[17] CATEL-FERREIRA, Manuella, Hédia TNANI, Claire HELLIO, Pascal COSETTE a Laurent LEBRUN. Antiviral effects of polyphenols: Development of bio-based cleaning wipes and filters. *Journal of Virological Methods* [online]. 2015, **212**, 1-7 [cit. 2019-04-23]. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2014.10.008

[18] SONG, Jae-Min, Kwang-Hee LEE a Baik-Lin SEONG. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* [online]. 2005, **68**(2), 66-74 [cit. 2019-04-23]. ISSN 01663542. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2005.06.010

[19] MUELLER, Monika, Stefanie HOBIGER a Alois JUNGBAUER. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* [online]. 2010, **122**(4), 987-996 [cit. 2019-04-23]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.041

[20] RAJAGOPAL, Chitra, Manendra LANKADASARI, Jesil ARANJANI a K.B. HARIKUMAR. Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: A novel approach for cancer therapy. *Pharmacological Research* [online]. 2018, **130**, 273-291 [cit. 2019-03-24]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2017.12.034

[21] LEBOVKA, Nikolai, Eugene VOROBIEV a Farid CHEMAT, ed. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. 1. Boca Raton, Florida: crc press taylor & francis group, 2012. ISBN 978-1439845936.

[22] GRANDISON, A.S. a M.J. LEWIS, ed. *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries*. 1. Cambridge, Velká Británie: Woodhead Publishing, 2014. ISBN 978-1-85573-287-2.

[23] HAYES, Maria. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. 1. New York: Springer, 2012. ISBN 978-1-4614-1247-2.

[24] FARAH, Adriana a Thiago FERREIRA DOS SANTOS. The Coffee Plant and Beans. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, s. 5-10 [cit. 2019-04-25]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2

[25] ROSTAGNO, Mauricio, Renata CELEGHINI, Isabel DEBIEN, Gislaine NOGUEIRA a Maria MEIRELES. Phenolic Compounds in Coffee Compared to Other Beverages. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, s. 137-142 [cit. 2019-04-25]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00015-2

[26] ALVES, Rita, Cristina SOARES a M. OLIVEIRA. Isoflavones in Coffee. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, s. 143-

148 [cit. 2019-04-25]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00016-4

[27] MATOS, Ângelo. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2017, **94**(11), 1333-1350 [cit. 2018-07-14]. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-017-3050-7

[28] RAJA, R., S. HEMAISWARYA, N. KUMAR, S. SRIDHAR a R. RENGASAMY. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, **34**(2), 77-88 [cit. 2018-07-15]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/10408410802086783

[29] BLEAKLEY, Stephen a Maria HAYES. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* [online]. 2017, **6**(5), 33- [cit. 2018-07-15]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods6050033

[30] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. 1. Chichester: John Wiley, 1998. ISBN 04-719-6447-6.

[31] MAROVA, I., M. CARNECKA, A. HALIENOVA, M. CERTIK, T. DVORAKOVA a A. HARONIKOVA. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management* [online]. 2012, **95**, 338-342 [cit. 2019-04-25]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2011.06.018

[32] AKSU, Zümriye a Ayşe EREN. Production of carotenoids by the isolated yeast of Rhodotorula glutinis. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2007, **35**(2), 107-113 [cit. 2019-04-25]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2007.01.004

[33] MOREIRA, Mariana, Marcela MELO, Jéssica COIMBRA, Kelly REIS, Rosane SCHWAN a Cristina SILVA. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Management* [online]. 2018, **82**, 93-99 [cit. 2019-04-25]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2018.10.017

[34] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. In: MATOVIC, Miodrag Darko, ed., Miodrag MATOVIC. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011 [cit. 2019-04-25]. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: doi:10.5772/19235

[35] MANDAL, Subhash, Vivekananda MANDAL a Anup DAS. *Essentials of Botanical Extraction*. 1. Cambridge, Massachusetts: Academic Press, 2015. ISBN 9780128025635.

[36] ANGELA, M. a A. MEIRELES, ed. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. 1. USA: CRC Press, 2008. ISBN 9781420062373.

[37] FOLCH, Jordi, I. ASCOLI, M. LEES, J. MEATH a F. LEBARON. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *The Journal of biological chemistry*. Baltimore, etc.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology [etc.], 1951, (1912, 833-841. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/content/191/2/833.long

[38] HÁLKOVÁ, Jana a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001, 94 s. ISBN 80-864-9402-0.

[39] ARMENTA, Sergio, Salvador GARRIGUES a Miguel DE LA GUARDIA. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **71**, 2–8. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615001314

[40] PANJA, Palash. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*. 2017. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2017.11.012

[41] QI, Xiao-Lin, Xiao PENG, Yu-Yan HUANG, Lu LI, Zuo-Fu WEI, Yuan-Gang ZU a Yu-Jie FU. Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from Equisetum palustre L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. *Industrial Crops and Products*. 2015, (70), 142-148. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.026

[42] KFOURY, Miriana, Chantal GEAGEA, Steven RUELLAN, Hélène GREIGE-GERGES a Sophie FOURMENTIN. Effect of cyclodextrin and cosolvent on the solubility and antioxidant activity of caffeic acid. *Food Chemistry* [online]. 2019, **278**, 163-169 [cit. 2019-04-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.055

[43] BAREL, A., Marc PAYE a Howard MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2009. ISBN 1420069632.

[44] SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1997, **154**(2), 123-140 [cit.

2022-11-13]. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00135-x

[45] VAN TRAN, Vinh, Ju-Young MOON a Young-Chul LEE. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **300**, 114-140 [cit. 2019-04-22]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2019.03.003

[46] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1), 102-. ISSN 1556-276x. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102

[47] NAYAK, Rajkishore, Rajiv PADHYE, Illias KYRATZIS, Yen TRUONG a Lyndon ARNOLD. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal* [online]. 2011, **82**(2), 129-147 [cit. 2019-04-25]. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/0040517511424524

[48] KENRY, a Chwee LIM. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* [online]. 2017, **70**, 1-17 [cit. 2019-04-25]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002

[49] © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné také z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf

[50] Vitrobot for Life Sciences. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. USA, 2019 [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: https://www.fei.com/products/vitrobot-for-life-sciences/

[51] DANINO, Dganit. Cryo-TEM of soft molecular assemblies. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2012, **17**(6), 316-329 [cit. 2019-04-24]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2012.10.003

[52] GRELA, Ewa, Joanna KOZŁOWSKA a Agnieszka GRABOWIECKA. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* [online]. 2018, **120**(4), 303-311 [cit. 2019-04-23]. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007

[53] LÜ, Lanhai, Lihong ZHANG, Maria WAI, David YEW a Jie XU. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro* [online].

2012, **26**(4), 636-644 [cit. 2019-04-24]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2012.02.006

[54] SITTAMPALAM, G., Nathan COUSSENS a Kyle BRIMACOMBE, ed. *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/

[55] WANG, Gang, Jianping ZHANG, Abiche DEWILDE, Anoop PAL, Dhimiter BELLO, Joel THERRIEN, Susan BRAUNHUT a Kenneth MARX. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology* [online]. 2012, **299**(2-3), 99-111 [cit. 2019-04-23]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2012.05.012

[56] MERSCH-SUNDERMANN, Volker, Gilles KLOPMAN a Herbert ROSENKRANZ. Chemical structure and genotoxicity: Studies of the SOS chromotest. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* [online]. 1996, **340**(2-3), 81-91 [cit. 2019-04-25]. ISSN 01651110. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-1110(96)90041-X

[57] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2021-11-03]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

[58] NIJS, A., R. CARTUYVELS, A. MEWIS, V. PEETERS, J. RUMMENS a K. MAGERMAN. Comparison and Evaluation of Osiris and Sirscan 2000 Antimicrobial Susceptibility Systems in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(8), 3627-3630 [cit. 2022-05-24]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003

[59] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, **49**(11), 1749-1755 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/647952

[60] *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. CLSI M26-1*. Wayne: NCCLS, 1999. ISBN 1-56238-384-1.

[61] PATRAVALE, V. a S. MANDAWGADE. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International Journal of Cosmetic Science*

[online]. 2008, **30**(1), 19-33 [cit. 2022-11-08]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x

[62] *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. Editor André O Barel, Marc Paye. New York: Marcel Dekker, 2001, 886 s. ISBN 08-247-0292-1.

[63] CHIU, Hsien-Tang, Chi-Yung CHANG, Tzong-Yiing CHIANG, Ming-Tai KUO a Yu-Hsiang WANG. Using analytical centrifugation to characterize the dispersibility and particle size distributions of organic/inorganic composite coatings. *Journal of Polymer Research* [online]. 2011, **18**(6), 1587-1596 [cit. 2022-09-26]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-011-9563-0

[64] TUHRINSKÁ, Terézia. *Příprava organických vláken s přídavkem extraktů z řas*. Brno, 2021. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

[65] BELLUMORI, Maria, Marzia INNOCENTI, Arianna BINELLO, Luisa BOFFA, Nadia MULINACCI a Giancarlo CRAVOTTO. Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound- and microwave-assisted extraction procedures. *Comptes Rendus Chimie* [online]. 2016, **19**(6), 699-706 [cit. 2020-10-05]. ISSN 16310748. Dostupné z: doi:10.1016/j.crci.2015.12.013

[66] FEKI, Firas, Daniela KLISUROVA, Mohamed MASMOUDI, Sirine CHOURA, Petko DENEV, Antoaneta TRENDAFILOVA, Mohamed CHAMKHA a Sami SAYADI. Optimization of microwave assisted extraction of simmondsins and polyphenols from Jojoba (Simmondsia chinensis) seed cake using Box-Behnken statistical design. *Food Chemistry* [online]. 2021, **356** [cit. 2022-02-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.129670

[67] SAINI, Ramesh a Young-Soo KEUM. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry* [online]. 2018, **240**, 90-103 [cit. 2021-04-28]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.099

[68] RAMÓN-GONçALVES, Marina, Esther GÓMEZ-MEJÍA, Noelia ROSALES-CONRADO, María LEÓN-GONZÁLEZ a Yolanda MADRID. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Management* [online]. 2019, **96**, 15-24 [cit. 2019-11-27]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2019.07.009

[69] MEDA, Aline, Charles LAMIEN, Marco ROMITO, Jeanne MILLOGO a Odile NACOULMA. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* [online]. 2005, **91**(3), 571-577 [cit. 2022-11-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.006

[70] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1999, **26**(9-10), 1231-1237 [cit. 2020-03-31]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3

[71] VILLA, C., R. GAMBARO, E. MARIANI a S. DORATO. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **44**(3), 755-762 [cit. 2022-05-24]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2007.03.020

[72] HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* [online]. 1972, **48**(2), 422-427 [cit. 2022-11-12]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(72)90094-2

[73] LICHTENTHALER, Hartmut a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 2001, **1**(1), 431-438 [cit. 2022-10-18]. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01

[74] MARTÍNEZ, Juan, Carlota DELSO, Javier ANGULO, Ignacio ÁLVAREZ a Javier RASO. Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of Rhodotorula glutinis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2018, **47**, 421-427 [cit. 2022-10-18]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2018.04.012

[75] BYRTUSOVÁ, Dana, Martin SZOTKOWSKI, Klára KUROWSKA, Volha SHAPAVAL a Ivana MÁROVÁ. Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26—The Source of Multifunctional Metabolites. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(6) [cit. 2022-09-28]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9061280

[76] SARAF, Swarnlata a ChanchalDeep KAUR. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*.

2010, **2**(1), 22-. ISSN 0974-8490. Dostupné z: doi:10.4103/0974-8490.60586

[77] MURRAY, Clinton a Duane HOSPENTHAL. Broth Microdilution Susceptibility Testing for Leptospira spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2004, **48**(5), 1548-1552 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.48.5.1548-1552.2004

[78] ESMAEL, Ahmed, Mervat HASSAN, Mahmoud AMER, Soheir ABDELRAHMAN, Ahmed HAMED, Hagar ABD-RABOH a Mohamed FODA. Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2020, **27**(1), 448-455 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2019.11.006

[79] BLAŽEKOVIć, Biljana, Weifeng YANG, Yi WANG, Chun LI, Marija KINDL, Stjepan PEPELJNJAK a Sanda VLADIMIR-KNEŽEVIć. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of Lavandula × intermedia 'Budrovka' and L. angustifolia cultivated in Croatia. *Industrial Crops and Products* [online]. 2018, **123**, 173-182 [cit. 2022-10-18]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.041

[80] YUAN, Chao, Yanli WANG, Yawei LIU a Bo CUI. Physicochemical characterization and antibacterial activity assessment of lavender essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, **130**, 104-110 [cit. 2022-05-05]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2018.12.067

[81] LI, Xueshu, Jaroslav TURÁNEK, Pavlína KNÖTIGOVÁ et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2009, **73**(1), 65-74 [cit. 2019-11-28]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.04.023

[82] BROWN, D.M., M.R. WILSON, W. MACNEE, V. STONE a K. DONALDSON. Size-Dependent Proinflammatory Effects of Ultrafine Polystyrene Particles: A Role for Surface Area and Oxidative Stress in the Enhanced Activity of Ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2001, **175**(3), 191-199 [cit. 2020-01-06]. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1006/taap.2001.9240

[83] Genotoxicity Tests: SOS-ChromoTestTM kit, for rapid detection of genotoxicity or DNA damage. In: *Biotoxicity.com* [online]. Ontario, Kanada:

EBPI (Environmental Bio-Detection Products Inc.), 2022 [cit. 2022-09-28]. Dostupné z: https://www.biotoxicity.com/index.php/ebpi-toxicity-tests/sos-genotoxicity-tests/sos-chromotest-kit

[84] UHLÍŘOVÁ, Renata. *Využití nanočástic a nanovláken s aktivní složkou pro kosmetické aplikace*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[85] BOKROVA, Jitka, Ivana MAROVA, Petra MATOUSKOVA a Renata PAVELKOVA. Fabrication of novel PHB-liposome nanoparticles and study of their toxicity in vitro. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2019, **21**(3) [cit. 2019-10-01]. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-019-4484-7

[86] KUNDRAT, Vojtech, Nicole CERNEKOVA, Adriana KOVALCIK, Vojtech ENEV a Ivana MAROVA. Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes. *Materials* [online]. 2019, **12**(12) [cit. 2022-11-12]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12121924

[87] UPSON, Sarah, Tom O'HAIRE, Stephen RUSSELL, Kenneth DALGARNO a Ana FERREIRA. Centrifugally spun PHBV micro and nanofibres. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **76**, 190-195 [cit. 2022-11-12]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.03.101

[88] KUNDRAT, Vojtech, Petra MATOUSKOVA a Ivana MAROVA. Facile Preparation of Porous Microfiber from Poly-3-(R)-Hydroxybutyrate and Its Application. *Materials* [online]. 2020, **13**(1), 1-14 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13010086

[89] WANG, Peng, Yang LI, Cen ZHANG, Fengqin FENG a Hui ZHANG. Sequential electrospinning of multilayer ethylcellulose/gelatin/ethylcellulose nanofibrous film for sustained release of curcumin. *Food Chemistry* [online]. 2020, **308** [cit. 2022-10-18]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.125599

[90] TEA, Lingsam, Frederic RENOU, Lazhar BENYAHIA a Taco NICOLAI. Assessment of the stability of water in water emulsions using analytical centrifugation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2021, **608** [cit. 2022-09-28]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125619

[91] WAN, Miaojian, Rong HU, Xiaoyuan XIE et al. Skin Erythema, Pigmentation and Hydration Kinetics after Ultraviolet Radiation-induced Photodamage in Southern Chinese Women. *Photochemistry and*

*Photobiology* [online]. 2017, **93**(5), 1276-1281 [cit. 2022-11-09]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/php.12752

[92] WANG, Da-Yuan, Henny VAN DER MEI, Yijin REN, Henk BUSSCHER a Linqi SHI. Lipid-Based Antimicrobial Delivery-Systems for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2020, **7** [cit. 2022-09-28]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00872

[93] GOREHAM, Renee, Kathryn SCHROEDER, Amy HOLMES, Siobhan BRADLEY a Thomas NANN. Demonstration of the lack of cytotoxicity of unmodified and folic acid modified graphene oxide quantum dots, and their application to fluorescence lifetime imaging of HaCaT cells. *Microchimica Acta* [online]. 2018, **185**(2) [cit. 2022-09-28]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-018-2679-8

[94] FOTAKIS, George a John TIMBRELL. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* [online]. 2006, **160**(2), 171-177 [cit. 2022-10-18]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001

[95] LI, Zhen, Shunqi MEI, Yajie DONG, Fenghua SHE, Yongzhen LI, Puwang LI a Lingxue KONG. Functional Nanofibrous Biomaterials of Tailored Structures for Drug Delivery—A Critical Review. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2022-10-26]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12060522

[96] DEGLI ESPOSTI, Micaela, Federica CHIELLINI, Federica BONDIOLI, Davide MORSELLI a Paola FABBRI. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **100**, 286-296 [cit. 2022-10-26]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.03.014

[97] ZHU, Qi-Long a Qiang XU. Immobilization of Ultrafine Metal Nanoparticles to High-Surface-Area Materials and Their Catalytic Applications. *Chem* [online]. 2016, **1**(2), 220-245 [cit. 2022-10-26]. ISSN 24519294. Dostupné z: doi:10.1016/j.chempr.2016.07.005

[98] MCCALL, Maxine, Brian GULSON a David ANDREWS. Consumer Use of Sunscreens Containing Nanoparticles. In: *Nanotechnology Environmental Health and Safety* [online]. Elsevier, 2018, s. 389-423 [cit. 2022-07-20]. ISBN 9780128135884. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813588-4.00016-6

[99] PARNIAKOV, O., E. APICELLA, M. KOUBAA et al. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae

Nannochloropsis spp. *Bioresource Technology* [online]. 2015, **198**, 262-267 [cit. 2022-09-20]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2015.09.020

[100] VIRGILIOU, Christina, Chrysostomi ZISI, Konstantinos KONTOGIANNOPOULOS, Alexandros NAKAS, Achilleas IAKOVAKIS, Vasilios VARSAMIS, Helen GIKA a Andreana ASSIMOPOULOU. Headspace gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lavender's essential oil: Optimization by response surface methodology. *Journal of Chromatography B* [online]. 2021, **1179** [cit. 2022-05-05]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2021.122852

[101] ILIć, Zoran, Lidija MILENKOVIć, Nadica TMUŠIć, Ljiljana STANOJEVIć, Jelena STANOJEVIć a Dragan CVETKOVIć. Essential oils content, composition and antioxidant activity of lemon balm, mint and sweet basil from Serbia. *LWT* [online]. 2022, **153** [cit. 2022-05-05]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112210

[102] DESAM, Nagarjuna, Abdul AL-RAJAB, Mukul SHARMA, Mary MYLABATHULA, Ramachandra GOWKANAPALLI a Mohammed ALBRATTY. Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of Mentha×Piperita L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University - Science* [online]. 2019, **31**(4), 528-533 [cit. 2022-05-27]. ISSN 10183647. Dostupné z: doi:10.1016/j.jksus.2017.07.013

[103] SPOLAORE, Pauline, Claire JOANNIS-CASSAN, Elie DURAN a Arsène ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2006, **101**(2), 87-96 [cit. 2022-11-02]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.101.87

[104] THEVARAJAH, Bavatharny, Gannoru NISHSHANKA, Malith PREMARATNE, P.H.V. NIMARSHANA, Dillirani NAGARAJAN, Jo-Shu CHANG a Thilini ARIYADASA. Large-scale production of Spirulina-based proteins and c-phycocyanin: A biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2022, **185** [cit. 2022-11-02]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2022.108541

[105] GIVENS, D. a R. GIBBS. Very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the food chain in the UK and the potential of animal-derived foods to increase intake. *Nutrition Bulletin* [online]. 2006, **31**(2), 104-110 [cit. 2022-10-28]. ISSN 1471-9827. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-3010.2006.00554.x

[106] SCOTT D. DOUGHMAN, , SRIRAMA KRUPANIDHI a CARANI B. SANJEEVI. Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering

Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. *Current Diabetes Reviews* [online]. 2007, **3**(3), 198-203 [cit. 2022-10-28]. ISSN 15733998. Dostupné z: doi:10.2174/157339907781368968

[107] SALEH, Ayda, MirKhalil PIROUZIFARD, Mohammad ALIZADEH KHALEDABAD a Hadi ALMASI. Optimization and Characterization of Lippia citriodora Essential Oil Loaded Niosomes: A Novel Plant-based Food Nano Preservative. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2022, **650** [cit. 2022-10-27]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2022.129480

[108] JO, Hwa, Yona KIM, Hyung PARK, Hyo MOON, Seongtae BAE, JinWook KIM, Dong KIM a Sun PAEK. The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Experimental Neurobiology* [online]. 2015, **24**(3), 235-245 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1226-2560. Dostupné z: doi:10.5607/en.2015.24.3.235

[109] Emulsun - sametový emulgátor. In: *Kosuro.cz* [online]. Praha, Česká Republika: Kosuro, 2022 [cit. 2022-11-08]. Dostupné z: https://www.kosuro.cz/Emulsun-sametovy-emulgator-50-g-d841.htm

[110] RAGUSA, Irene, Giulia NARDONE, Samuele ZANATTA, Walter BERTIN a Emanuele AMADIO. Spirulina for Skin Care: A Bright Blue Future. *Cosmetics* [online]. 2021, **8**(1) [cit. 2022-11-09]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics8010007

[111] YU, Lixia. *Spirulina anti-wrinkle and anti-aging hand cream*. 2013. Čína. CN104224677A. Uděleno 24.12. 2014. Zapsáno 23. 6. 2013.

[112] NOWRUZI, Bahareh, Gisoo SARVARI a Saúl BLANCO. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research* [online]. 2020, **49** [cit. 2021-02-08]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2020.101959

# 7 ŽIVOTOPIS

**Osobní údaje**

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení: | Ing. Renata Uhlířová |
| Datum narození: | 7. 1. 1993 |
| Adresa: | Pražská 3210/63L, Znojmo, 669 02 |
| E-mail: | uhlirova@fch.vut.cz |
| Mobil: | + 420 732 379 436 |

**Vzdělání**

| | |
|---|---|
| 2017–současnost | Doktorské studium<br>Fakulta chemická – obor: Potravinářská chemie<br>Vysoké učení technické v Brně<br>Dizertační práce: Využití komplexních extraktů z rostlin a mikroorganismů v potravinářství a kosmetice |
| 2015–2017 | Navazující magisterské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická – obor: Chemie pro medicínské aplikace<br>Diplomová práce: Příprava a charakterizace biomateriálů s obsahem aktivních přírodních UV filtrů<br>https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/99323 |
| 2012–2015 | Bakalářské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická obor: Chemie pro medicínské aplikace<br>Bakalářská práce: Využití nanočástic a nanovláken s aktivní složkou pro kosmetické aplikace<br>https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/77321 |
| 2008–2012 | Gymnázium Dr. Karla Polesného Znojmo (všeobecné gymnázium) |

**Pracovní zkušenosti**

| | |
|---|---|
| 2019-současnost | Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav potravin a biotechnologií<br>vědecký pracovník |
| 2017-2018 | Vysoké učení technické v Brně, Centrum materiálového výzkumu<br>technicko-hospodářský pracovník |
| 7/2016 | Stáž ve společnosti Contipro a.s.<br>oddělení Vývoje přístrojů pro nanotechnologie |
| 9/2013–2/2014 | Pomocná vědecká síla centra CMV, VUT v Brně<br>Práce na téma: „Biotechnologická příprava vybraných mikrobiálních metabolitů“ |

**Pedagogická činnost**

| | |
|---|---|
| 2021/22 | Praktikum z kosmetologie<br>Praktikum z fyziologie a klinických metod |
| 2018/19 | Seminář a praktikum oboru CHMA<br>Praktikum z biochemie |

**Zahraniční pobyty**

| | |
|---|---|
| 2/2019–6/2019 | Erasmus, Universidade de Huelva, Huelva, Španělsko<br>Práce s lidskými buněčnými kulturami CaCo2 a HepG2 |
| 9/2015–1/2016 | Erasmus, Institute Superior Tecnico, Lisabon, Portugalsko<br>Absolvování čtyř předmětů z oblasti nanotechnologií a buněčného a tkáňového inženýrství |

# 8 PUBLIKACE

## Články v impaktovaných časopisech

PAVELKOVA, Renata, Petra MATOUSKOVA, Julie HOOVA, Jaromir PORIZKA a Ivana MAROVA. Preparation and characterisation of organic UV filters based on combined PHB/liposomes with natural phenolic compounds. *Journal of Biotechnology* [online]. 2020, **324** [cit. 2022-09-28]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.btecx.2020.100021

BOKROVA, Jitka, Ivana MAROVA, Petra MATOUSKOVA a Renata PAVELKOVA. Fabrication of novel PHB-liposome nanoparticles and study of their toxicity in vitro. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2019, **21**(3) [cit. 2019-10-01]. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-019-4484-7

RAMÍREZ-ACOSTA, S., R. UHLÍROVÁ, F. NAVARRO, J. L. GÓMEZ-ARIZA a T. GARCÍA-BARRERA. Antagonistic Interaction of Selenium and Cadmium in Human Hepatic Cells Through Selenoproteins. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2022, **10** [cit. 2022-09-28]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2022.891933

## Sborníky s plným uvedením textu

PAVELKOVÁ, Renata, Monika PLACHÁ, Matěj TARAGEĽ, Agáta BENDOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ a Ivana MÁROVÁ. *APPLICATION OF PHB-LIPOSOME PARTICLES AND NANOFIBERS IN COSMETICS* [online]. In:. 2020, s. 514-519 [cit. 2022-09-28]. Dostupné z: doi:10.37904/nanocon.2019.8709

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

MÁROVÁ, I.; PAVELKOVÁ, R.; KUNDRÁT, V. Souhrnná zpráva o řešení smluvního výzkumu. FCH VUT v Brně: 2018. s. 1-16.

PAVELKOVÁ, R.; ROMANOVSKÁ, D.; PLACHÁ, M.; PLÁŠKOVÁ, A.; MATOUŠKOVÁ, P.; HÁRONIKOVÁ, A.; MÁROVÁ, I. THE USE OF NATURAL EXTRACTS IN COSMETICS AND SUBSEQUENT DETECTION OF PLANT DNA USING MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 141-142. ISBN: 978-80-214-5488-0.

MATOUŠKOVÁ, P.; BOKROVÁ, J.; SOSKOVÁ, S.; PAVELKOVÁ, R.; HÁRONIKOVÁ, A.; MÁROVÁ, I. Příprava a charakterizace moderních kosmetických přípravků s antimikrobiálním účinkem. In *Mezinárodní kosmetologická konference Mikulov 2017 Sborník přednášek.* Lednice: Kosmetologická společnost České republiky, 2017. s. 54-57. ISBN: 978-80-904679-8-9.

**Patenty**

MÁROVÁ, Ivana, Renata PAVELKOVÁ, Vojtěch KUNDRÁT a Petra MATOUŠKOVÁ, A UV FILTER BASED ON POLYHYDROXYBUTYRATE AND A METHOD OF ITS PREPARATION, 2019, Evropská unie, EP 3 560 479 A1, Zapsáno 23. 04. 2019

**Příspěvky na konferencích**

PAVELKOVÁ, R.; DUDROVÁ, M.; PLACHÁ, M.; PETRŽELKOVÁ, M.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Unconvential use of extracts from Coffea genus and Theobroma cacao. 19th International Nutrition & Diagnostics Conference. 2019. p. 66-66. ISBN: 978-80-7560-245-9.

**Příspěvky na konferencích ve formě posteru**

UHLÍŘOVÁ, R.; JANDEROVÁ, Š.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Cosmetic application of Spirulina extracts with photochemoprotective effect.* Praha: 2022.

UHLÍŘOVÁ, R.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Comparison of valuable active compounds from red yeasts and conventional sources.* Mikulov: 2022.

UHLÍŘOVÁ, R.; TUHRINSKÁ, T.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Bioactive Compounds from Microalgae and Cyanobacteria and their Use in Cosmetic Industry.* NANOCON 2021 - Abstracts. 1st Edition, 2021. Brno: Tanger, Ostrava, 2021. s. 118-118. ISBN: 978-80-88365-00-6.

PAVELKOVÁ, R.; RAMÍREZ ACOSTA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Application of liposomes and PHB-liposome particles with encapsulated plant and microalgae extracts in cosmetics and food industry.* Biotechnology & Biotechnological Equipment, Special Issue:European Biotechnology Congress 2020. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 35. Prague: 2021. s. 121-121. ISBN: 1310-2818. ISSN: 1314-3530.

UHLÍŘOVÁ, R.; BOČÁN, D.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Skin protecting activity of microbial extracts.* The EuroBiotech Journal. 2021. s. 84-84. ISSN: 2564-615X.

Denisa Langová, Renata Pavelková, Ivana Márová. *Antimicrobial activity of nanofibers enriched by essential oils against Cutibacterium acnes and*

*Staphylococcus epidermidis*. Brno: Masarykova univerzita, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně, 2021. s. 20-20.

MÁROVÁ, I.; PAVELKOVÁ, R.; KUNDRÁT, V.; MATOUŠKOVÁ, P.; KOVALČÍK, A.; BOKROVÁ, J. *Preparation and application of PHA based nanofibers and nanoparticles as natural organic UV filtres with anti-inflammatory effect.* JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. AMSTERDAM: ELSEVIER, 2019. s. S5 (S5 s.)ISSN: 1873-4863.

BENDOVÁ, A.; PAVELKOVÁ, R.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Preparation of bioactive wound dressings and testing their interaction with human cells.* Nanocon 2019 - Abstracts. 2019. s. 123-124. ISBN: 978-80-87294-94-9.

PAVELKOVÁ, R.; MATOUŠKOVÁ, P.; BOKROVÁ, J.; PLACHÁ, M.; TARAGEĽ, M.; MÁROVÁ, I. *CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF PHA/LIPOSOME PARTICLES WITH ENCAPSULATED EXTRACTS FROM COFFEA ARABICA.* NANOCON 2018 - Abstracts. 1 st edition. Ostrava: AMOS repro Ltd., 1. maje 3236/103, 703 00 Moravska Ostrava, Czech Republic, EU, 2018. s. 117 ( s.)ISBN: 978-80-87294-85-7.

MATOUŠKOVÁ, P.; TILŠAROVÁ, K.; SOSKOVÁ, S.; KUNDRÁT, V.; PAVELKOVÁ, R.; KOVALČÍK, A.; MÁROVÁ, I. Preparation and application of functionalized nanofibers from poly(3-hydroxybutyrate). Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 61-61.

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

PAVELKOVÁ, R.; MATOUŠKOVÁ, P.; BOKROVÁ, J.; PLACHÁ, M.; MÁROVÁ, I. The effect of active ingredients on emulsion stability. HRUS 2018 International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy (HR-US) Final Program, Book of Abstract, and Practical Courses. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2018.

PAVELKOVÁ, R.; MATOUŠKOVÁ, P.; BOKROVÁ, J.; PLACHÁ, M.; TARAGEĽ, M.; MÁROVÁ, I. CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF PHA/LIPOSOME PARTICLES WITH ENCAPSULATED EXTRACTS FROM COFFEA ARABICA. NANOCON 2018 - Abstracts. 1 st edition. Ostrava: AMOS repro Ltd., 1. maje 3236/103, 703 00 Moravska Ostrava, Czech Republic, EU, 2018. s. 117 ( s.)ISBN: 978-80-87294-85-7.

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

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

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

**Projekty**

2022–současnost Příspěvek k rozvoji moderních potravinářských věd, zahájení: 01.03.2022, ukončení: 28.02.2023

2021 Vývoj a využití progresivních postupů při zpracování, analýze a hodnocení potravin, potravinářských surovin a odpadů., zahájení: 01.03.2021, ukončení: 28.02.2022

2020 Aplikace progresivních metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01.03.2020, ukončení: 28.02.2021

2020–2023 projekt TAČR Trend **FW01010649**, Výzkum a vývoj nové generace inkontinenční pomůcky (spolupráce s FIDE, spol. s r.o.)

2019 Využití pokročilých metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01.03.2019, ukončení: 28.02.2020

2018 Aplikace moderních postupů při výrobě, zpracování a analýze potravin, jejich složek a surovin a při valorizaci odpadů. , zahájení: 01.03.2018, ukončení: 28.02.2019

2017–2019 Projekt spolupráce s průmyslem – HS (Nafigate, a.s.): Aplikace biopolymeru PHB, zahájení: 01.01.2017, ukončení: 30.12.2019

2014 – 2018 „Materials Research Centre – udržitelnost a rozvoj“, LO1212; MŠMT; 2014-2018; výzkumný pracovník v rámci skupiny Biotechnologie a biomateriály

**Zahraniční stáže**

2/2019–6/2019 Erasmus, Universidade de Huelva, Huelva, Španělsko

Práce s lidskými buněčnými kulturami CaCo2 a HepG2

9/2015–1/2016 Erasmus, Institute Superior Tecnico, Lisabon, Portugalsko

Absolvování čtyř předmětů z oblasti nanotechnologií a buněčného a tkáňového inženýrství