



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VÝVOJ ORGANICKÝCH UV FILTRŮ NA BÁZI PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ

DEVELOPMENT OF ORGANIC UV FILTERS BASED ON NATURAL EXTRACTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Káčeríková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1390/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Martina Káčeríková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Vývoj organických UV filtrů na bázi přírodních extraktů

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše
- 2) příprava nanočástic a nanovláken na bázi PHA jako nosičů UV filtrů
- 2) funkcionalizace nosičů vybranými rostlinnými extrakty, stanovení stability
- 3) stanovení SPF vybraných extraktů a struktur
- 4) stanovení biologických účinků a nezávadnosti

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Martina Káčeríková
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca bola zameraná na vývoj organických UV filtrov. Organické UV filtre boli extrahované z prírodných látok a enkapsulované do nanomateriálových nosičov ako sú lipozómy a nanovláčna. Boli stanovované SPF jednotlivých extraktov a pripravených nosičov s extrahovanými látkami. Jednotlivé extrakty aj nosiče boli charakterizované na obsah prírodných látok. Stanovovaná bola aj ich stabilita a cytotoxicita, mikrobiálna aktivita a nezávadnosť. Pripravené materiály sa preukázali ako vhodné nosiče v kozmetickom priemysle. Štúdiu by však bolo vhodné doplniť ďalšími experimentálnymi metódami pre navýšenie účinných látok a zároveň zvýšenia SPF ochranného faktoru.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the development of organic UV filters. Organic UV filters were extracted from natural resources and encapsulated into nanomaterial-like delivery systems such as liposomes and nanofibres. SPF of particular extracts and carriers with encapsulated extracts were measured. All of the prepared extracts as well as carriers were characterised for their content of natural substances like phenolic compounds and their antioxidant activity, stability, cytotoxicity, microbial activity and their safety were studied too. All of the prepared materials were evaluated as suitable for use in cosmetic industry. However, in a future, it would be appropriate to add to the study other experimental methods to increase the active substances and at the same time increase the SPF protection factor.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

UV filtre, antioxidanty, káva, lipozómy, PHB

KEYWORDS

UV filters, antioxidants, coffee, liposomes, PHB

KÁČERÍKOVÁ, Martina. *Vývoj organických UV filtrů na bázi přírodních extraktů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123921>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať mojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej CSc., za odborné vedenie, ústretovosť a cenný čas, ktorý mi venovala. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Renáte Pavelkovej, za ochotu, trpezlivosť, ústretovosť a za čas, ktorý mi venovala pri meraniach a za pomoc a rady pri spracovávaní celej tejto práce. Špeciálne poďakovanie patrí mojej rodine a priateľom, ktorí ma podporovali po celú dobu štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Vybrané bioaktívne zložky prírodných látok	9
2.1.1	Antioxidanty prírodných látok	9
2.1.2	Fenolické látky v prírodných materiáloch	10
2.2	UV žiarenie	11
2.3	UV filtre	11
2.3.1	Fyzikálne UV filtre	12
2.3.2	Chemické UV filtre	12
2.4	Prírodné UV filtre	12
2.5	SPF	14
2.5.2	Koža	15
2.6	Vybrané prírodné látky obsahujúce UV filtre	17
2.6.1	Káva	17
2.6.2	Rast a vývin kávovníka	17
2.6.3	Zber a spracovanie kávových zŕn	18
2.6.4	Praženie kávy	18
2.7	Kávový olej	19
2.8	Nanomateriály	20
2.9	Nanončastice	21
2.9.1	Lipozómy	21
2.9.2	Materiály používané na prípravu nanočastíc	23
2.9.3	Metódy prípravy častíc	23
2.9.4	Charakterizácia častíc	24
2.9.5	Metóda charakterizácie veľkosti a stability častíc pomocou dynamického rozptylu svetla	24
2.10	Nanovlákná a metódy ich prípravy	25
2.10.1	Príprava vlákien pomocou forcespinningu	26
2.11	Testy cytotoxicity	26
2.12	Mikrobiálne testy	27
3	CIEĽ PRÁCE	29
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
4.1	Použité materiály ako vzorky	30
4.2	Použité chemikálie	30
4.3	Použité prístroje	30
4.4	Použité bunkové kultúry	31

4.5	Príprava extraktov kávy	31
4.5.1	Extrakcia podľa Soxhleeta	31
4.5.2	Maceráty	32
4.6	Všeobecná charakteristika kávových extraktov	32
4.6.1	Stanovenie fenolických látok	32
4.6.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity	32
4.7	Meranie UV spektra pomocou nanofotometra	33
4.7.1	Výpočet SPF	33
4.8	Príprava nanočastíc metódou sonikácie	33
4.8.1	Príprava nanočastíc s hexanovými extraktami metódou sonikácie	34
4.9	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nanočastíc	35
4.10	Stanovenie veľkosti nanočastíc pomocou DLS	35
4.11	Stanovenie stability častíc pomocou zetapotenciálu	35
4.11.1	Štúdium krátkodobej a dlhodobej stability častíc	35
4.12	Príprava PHB nanovláken	35
4.12.1	Príprava nanovláken pomocou metódy forcespinning	35
4.13	Testy mikrobiálnej aktivity	36
4.13.1	Testy mikrobiálnej aktivity na koliformné baktérie	36
4.13.2	Testy mikrobiálnej aktivity na kvasinky	36
4.13.3	Testy mikrobiálnej aktivity na plesne	36
4.13.4	Testy mikrobiálnej aktivity na všetky redukujúce mikroorganizmy	36
4.14	Testy cytotoxicity materiálov pomocou MTT testov	37
4.14.1	Kultivácia keratinocytov	37
4.14.2	MTT test	37
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	38
5.1	Všeobecná charakteristika extraktov	38
5.1.1	Výtťažnosť hexanových extraktov	38
5.1.2	Obsah fenolických látok v extraktoch	39
5.1.3	Antioxidačná aktivita extraktov	40
5.1.4	Stanovenie SPF hexanových extraktov	40
5.2	Príprava vláken	41
5.3	Príprava častíc	41
5.3.1	Veľkosť a stabilita častíc	41
5.3.2	Enkapsulačná účinnosť častíc	45
5.3.3	Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v časticiach	49
5.3.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity častíc	49
5.3.5	SPF častíc	50

5.4	Testy mikrobiálnej aktivity kávových materiálov	51
5.4.1	Stanovenie koliformných baktérií	51
5.4.2	Stanovenie kvasiniek	52
5.4.3	Stanovenie plesní.....	52
5.4.4	Stanovenie všetkých redukujúcich mikroorganizmov	53
5.5	Testy cytotoxicity častíc a nanovláken	54
5.6	Maceráty.....	57
6	ZÁVER	59
7	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	61
8	ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV.....	70
8.1	Zoznam skratiek	70
8.2	Zoznam symbolov.....	70

1 ÚVOD

V dnešnom svete, kedy sa zhoršuje vrstva ozónu a globálne otepľovanie nabera čoraz rýchlejší spád, slnečné lúče dopadajúce na našu Zem ovplyvňujú zdravie nás všetkých. Slnečné žiarenie sa pre ľudskú pokožku stáva viac a viac agresívnejším, a nie len počas letných mesiacov je dôležité sa chrániť.

S rýchlym vývinom vedy a techniky sa do popredia dostávajú čoraz viac aj nanotechnológie s využívaním prírodných látok. Má to za úlohu znížiť narastajúci odpad, potenciálne využívať bioodpad a tým zlepšovať stav ekologickej situácie vo svete.

Táto situácia sa dotkla všetkých oblastí života a premietla sa aj do oblasti procesov a technológií, ktoré sa využívajú v kozmetickom priemysle. Stále viac firiem a korporácií sa snaží využívať prírodné produkty, ktoré majú blahodárne účinky na ľudský organizmus. V spojitosti so slnečným žiarením sa dostávajú do popredia krémy a oleje na opaľovanie s obsahom aktívnych zložiek, ktoré boli pripravené nanotechnológiami a takisto s prídavkami účinných látok nachádzajúcich sa v prírodných materiáloch. Prírodné materiály nezaťažujú životné prostredie a dnešný spotrebiteľ víta práve takýto typ produktu, nakoľko sa všeobecná mienka udržateľnosti dostáva čoraz viac do ľudského povedomia.

Príkladným materiálom je biopolymér polyhydroxybutyrát, ktorý produkujú baktérie, ktoré ako zdroj živín môžu využívať odpadné oleje, tuky alebo ďalšie odpadné materiály. Zároveň je biodegradabilný, biokompatibilný, a teda nezaťažuje životné prostredie, a tak sa môže používať napríklad ako obalový materiál.

Ako bolo spomenuté, využívanie bioodpadu sa stáva súčasťou mnohých firiem, pričom môžu kozmetické firmy nepriamo využívať odpady z iných priemyslov. Ako príklad môže slúžiť už spomínaný odpadný fritovací olej pre výrobu PHB alebo odpadové kávové usadeniny z gastronómického priemyslu pri výrobe kávového nápoja, z ktorých sa dnes pripravujú rôzne kozmetické produkty. Vždy je však treba overiť bezpečnosť použitia podobných surovín, analyzovať zloženie a identifikovať potenciálne škodlivé látky.

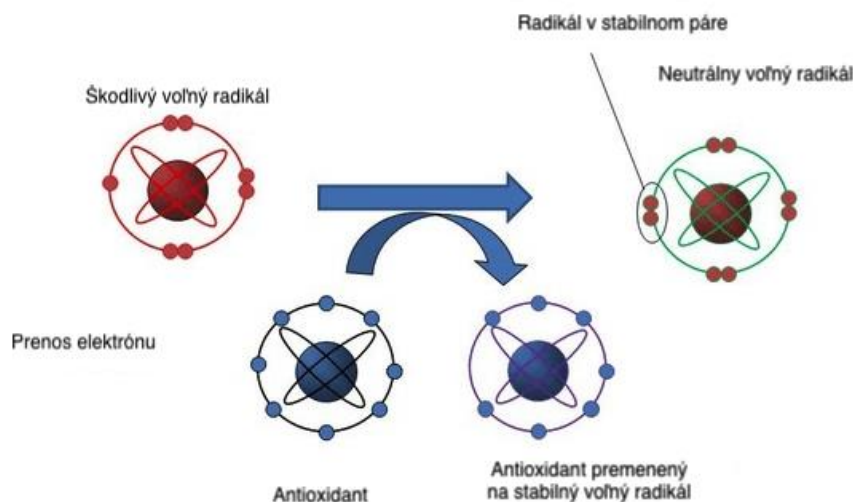
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Vybrané bioaktívne zložky prírodných látok

2.1.1 Antioxidanty prírodných látok

Voľné radikály sú častice jedného alebo viacerých nespárených elektrónov, obsahujúce molekuly, ktoré môžu poškodzovať nukleové kyseliny, sacharidy, proteíny a lipidy. Existujú dva druhy voľných radikálov. Prvou skupinou sú reaktívne častice kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Práve tieto častice vo vysokých koncentráciách poškadzujú biomolekuly ako DNA, RNA, lipidy a proteíny. Vo veľmi nízkych koncentráciách sú v bunke produkované ako sekundárni poslovia signalizačných buniek. Druhou skupinu predstavujú reaktívne častice dusíku (RNS – reactive nitrogen species) a hrajú dôležitú úlohu v ľudskej fyziológii. Voľné radikály predstavujú nekonzistenciu v ich biologickej funkcii. Na jednej strane majú za úlohu prevenciu proti ochoreniam a podporujú imunitný systém, uľahčujú bunkovú signalizáciu a hrajú dôležitú úlohu v apoptóze. Na druhej strane môžu poškodzovať vitálne makromolekuly, čo má za príčinu predčasné starnutie pokožky, karcinogézu a vývin kardiovaskulárnych ochorení.

V zdravom systéme existuje rovnováha medzi produkciou ROS a ich samotným zachytávaním antioxidantmi. Pri narušení tejto rovnováhy vzniká oxidačný stres. Antioxidačné systémy v bunke existujú, aby bunky ochránili pred ROS. Poskytujú prevenciu proti bunkovému poškodeniu znížením až elimináciou oxidačného stresu. V oxidačných reakciách je elektrón premiestnený na oxidačný agens, a tieto reťazové reakcie môžu ďalej produkovať voľné radikály, čo iniciuje poškodenie buniek. Antioxidanty terminujú tieto reťazové reakcie eliminovaním alebo stabilizovaním voľných radikálov a zabrzdia ďalšie oxidačné reakcie svojou vlastnou oxidáciou. Pri reakcii vzniká radikál antioxidant, ktorý je málo reaktívny a nedokáže teda vyvolať ďalšiu reťazovú reakciu. Má tendenciu sa spájať s ďalšími radikálmi alebo disproportionovať sa za vzniku spomenutého radikál antioxidantu a príslušného zvyšku. Priebeh oxidačnej reakcie a mechanizmu účinku antioxidantov je zobrazený na Obr. 1 [1,2].



Obr. 1 Mechanizmus účinku antioxidantov, prevzaté a upravené z [3]

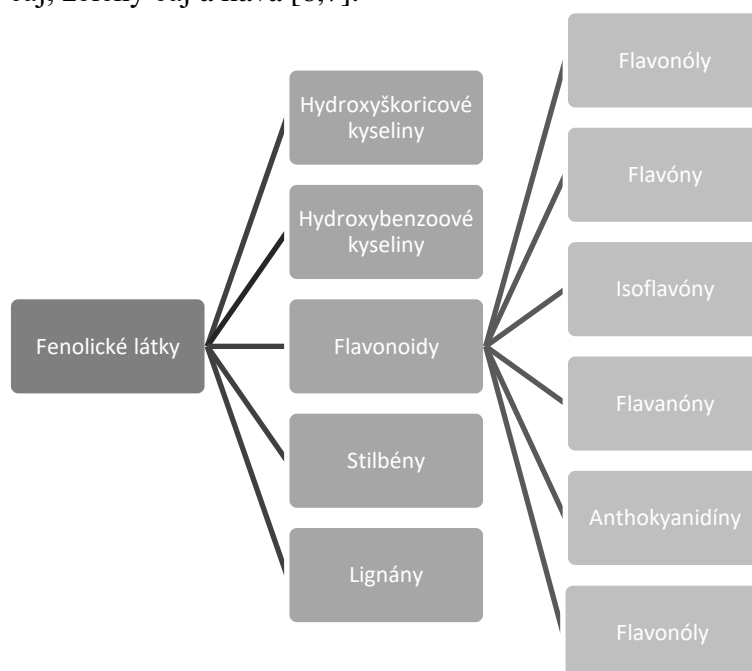
Nízkomolekulárne antioxidanty sa nachádzajú v cytozole alebo v extracelulárnych tekutinách. Typickým príkladom takýchto antioxidantov sú askorbová glutathion alebo enzýmy

ako dismutázy, katalázy a peroxidázy. Najviac ich je vyprodukovaných hlavne organelách ako peroxizómy, mitochondrie a v endoplazmatickom retikule [1,2].

2.1.2 Fenolické látky v prírodných materiáloch

Polyfenoly reprezentujú skupinu fytochemikálii, ktoré sú produkované ako sekundárne metabolity rastlín. Sú klasifikované na základe počtu benzénových kruhov substituovaných jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami zároveň obsahujúce vo svojej štruktúre funkčné bočné reťazce. Sú to heterogénne bioaktívne zlúčeniny a rozdeľujeme ich do rôznych skupín, ako napríklad hydroxybenzoové kyseliny, kde spadajú deriváty kyseliny galovej (kyselina benzoová), skupina kyseliny hydroxyškoricevej a jej deriváty ako kyselina kávová, či kyselina p-kumárová, flavón alebo stilbény [4,5].

Klasifikáciu polyfenolov prehľadne zobrazuje Obr. 2. Tieto látky preukázateľne chránia bunky pred oxidačným stresom, ďalej prispievajú v prevencii neurodegeneratívnych ochorení a takisto chránia pred kardiovaskulárnymi ochoreniami. V rade experimentov bolo preukázané, že polyfenoly majú pozitívny vplyv na ľudský gastrointestinálny systém a na jeho mikrobiotu. Vysokým zdrojom fenolických látok sú napríklad červené víno, semená hrozien, čierny čaj, zelený čaj a káva [6,7].

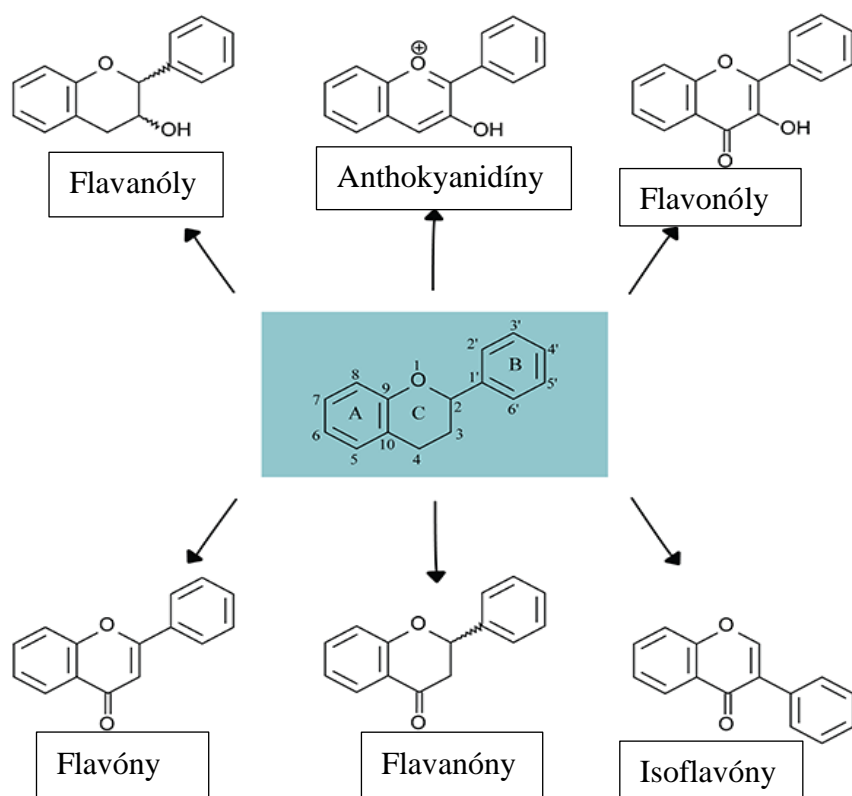


Obr. 2 Klasifikácia fenolických látok, prevzaté a upravené z [6]

2.1.2.1 Flavonoidy

Predstavujú rozsiahlu skupinu rastlinných látok, ktorých molekuly obsahujú flavanový cyklický skelet. Tento skelet pozostáva z dvoch substituovaných benzénových kruhov (A,B) a pyránového kruhu, ktorý je napojený na kruh A. Flavanový skelet je vyobrazený na Obr. 3 spolu s prehľadným rozdelením najdôležitejších skupín flavonoidov. Táto klasifikácia je založená na stupni oxidácie pyránového kruhu [8].

Flavonoidy sa prirodzene nachádzajú v ovocí, zelenine, čokoláde a nápojoch ako je čaj či víno. So zvýšeným príjmom flavonoidov v strave klesá riziko ochorení ako je rakovina pľúc, prs, hrubého čreva alebo prostaty. Majú preukázateľné protizápalové účinky, antioxidačnú aktivitu a chránia pred neurodegeneratívnymi aj kardiovaskulárnymi ochoreniami [8,9].



Obr. 3 Základná štruktúra flavonoidov a ich podtried, prevzaté a upravené z [9]

2.2 UV žiarenie

Ultrafialové žiarenie je charakterizované ako elektromagnetické vlnenie o vlnovej dĺžke v rozmedzí 100 – 380 nm. Je to neviditeľná časť elektromagnetického žiarenia Slnka. Má nepriaznivé účinky na oči a podporuje predčasné starnutie pokožky a tvorbu rakoviny kože. Delíme ho do troch pásiem v závislosti na vlnových dĺžkach. UVA pásmo spadá do vlnovej dĺžky v rozmedzí 320 – 380 nm, ďalej UVB žiarenie, pre ktoré je charakteristická vlnová dĺžka 280 – 320 nm a UVC žiarenie, tzv. vzdialené pásmo, ktorého vlnové dĺžky sú kratšie než 280 nm. UVC žiarenie je označované ako germicídne pásmo, vďaka svojim baktericídnym účinkom. UVA žiarenie preniká až na očnú sietnicu, jeho dlhodobé pôsobenie má za následok ochorenie oka ako šedý zákal, spôsobuje pigmentáciu pokožky, ktorú zároveň vysušuje. UVB žiarenie pôsobí na očnú rohovku, pokožku spáli a spôsobuje jej začervenanie a podporuje vznik rakoviny kože. Toto žiarenie je však najviac pohlcované ozónom, a preto je jeho množstvo závislé na stave ozónovej vrstvy. Okrem nepriaznivých účinkov má UV žiarenie aj pozitívny vplyv na tvorbu vitamínu D v pokožke. Bolo zistené, že toto žiarenie má vplyv na imunitný systém, stimuluje činnosť hypofýzy a štítnej žľazy. Stimulačne tiež pôsobí na metabolizmus a pri zvýšení krvného tlaku. Vďaka jeho dezinfekčným účinkom našlo UV žiarenie uplatnenie na operačných sálach, v laboratóriách a v biochémií našlo uplatnenie pri detekcii niektorých organických látok. [10,11].

2.3 UV filtre

V prípravkoch na ochranu pred UV žiarením sa používajú dva druhy UV filtrov. Rozdeľujú sa na fyzikálne a chemické UV filtre. V ideálnom prípade by tieto prípravky mali obsahovať ochranu pred UVA aj UVB žiarením [12].

2.3.1 Fyzikálne UV filtre

Fyzikálne UV filtre fungujú na základe odrazu alebo rozptylu UV žiarenia v celom rozsahu spektra. Najviac používané anorganické filtre z tejto skupiny sú TiO_2 a ZnO . Sú fotostabilné, avšak vyžadujú nanosenie hrubšej vrstvy na pokožku, aby sa dosiahlo požadovaného účinku. ZnO poskytuje lepšiu ochranu pred UVA žiarením, ale TiO_2 ochráni pred UVB žiarením niekoľkonásobne lepšie. Ďalším fyzikálnym blokátorom žiarenia je aj Fe_2O_3 , svojim sfarbením sa viac približuje prirodzenej farbe pokožky a častokrát sa v prípravkoch používa, aby prekryl bledé tóny ZnO a TiO_2 . Ako bolo spomenuté, anorganické filtre sú fotostabilné, a tak sú vhodné na používanie u malých detí a ľudí alergických na slnečné žiarenie [12,13].

2.3.2 Chemické UV filtre

Vo väčšine kozmetických prípravkoch sa využíva hlavne tento typ UV filtrov. Na rozdiel od fyzikálnych UV filtrov, ktoré fungujú na základe rozptylu alebo odrazu UV žiarenia, chemické filtre UV žiarenie absorbujú. Sú klasifikované buď ako UVA filtre (benzofenony) alebo UVB filtre (PABA deriváty, salicyláty, deriváty gáfru). UVB filtre fungujú tak, že absorbujú žiarenie a premieňajú ho na tepelnú energiu [14].

Benzofenóny sú najkomerčnejšie používané UVA filtre a poskytujú stabilnú ochranu pred UVA aj UVB žiarením. Sú však fotolabilné a v dôsledku toho sú povolené len tri benzofenóny, a to oxybenzón, sulisobenzón a dioxybenzón. Oxybenzón sa v bežných prípravkoch vyskytuje najviac, avšak spôsobuje alergické reakcie pokožky [14,15].

PABA filter bol v minulosti najviac používaný blokátor. Jeho schopnosť je viazať sa na keratinocyty a tým podporuje tmavnutie pokožky. Existuje však niekoľko evidencií, že PABA spôsobuje kontaktné alergie, preto sa začali viac používať deriváty PABA, aby sa predišlo prípadným nežiadúcim účinkom [15].

Salicyláty, najslabšie chemické UVB filtre, poskytujú najbezpečnejšiu ochranu a často sa pridávajú do kozmetických prípravkov vo vysokých koncentráciách, aby navýšili UVB ochranu [15].

Všetky tieto látky sú však používané v kombináciách, pretože jednotlivo nie sú schopné poskytnúť požadovaný SPF faktor alebo absorpciu v širokom rozsahu UV spektra. Toto kombinovanie filtrov je ale obmedzené, pretože nie sú fotostabilné a môžu vyvolávať nežiadúce účinky [14,15].

2.4 Prírodné UV filtre

V snahe nájsť efektívny fotoprotektívny substrát pre výrobu kozmetických produktov sa rastlinné preparáty osvedčili ako vhodná alternatíva aj vďaka svojej antioxidačnej aktivite.

Prírodné kožné blokátory sú proteíny (ich peptidové väzby), lipidy a nukleotidy. Vysoká koncentrácia rastlinných peptidov chráni peptidy pokožky. Skvalén (z olivového oleja) v niektorých produktoch je schopný ochrániť citlivé lipidy v pokožke. Je to tiež jeden z najdôležitejších ochranných lipidov v pokožke [16].

Alantoín je nukleotid, ktorý sa prirodzene vyskytuje v tele a absorbuje tú časť UV žiarenia, ktorá poškodzuje ľudskú DNA [17].

Mnoho štúdií preukázalo, že aj niektoré prírodné oleje obsahujú ochranné faktory. Ako príklad je možné uviesť sezamové semiačka, ktorých oleje odolávajú až 30 % UV žiarenia. Iné oleje ako napríklad olivový, kokosový blokujú 20 % UV žiarenia [16,17].

Tabuľka 1 Vybrané rastliny s fotoprotektívnymi účinkami [18]

Názov rastliny	Latinský názov rastliny	Používaná časť rastliny	Typy zlúčenín	Hlavný efekt (NF, SPE)	Biologický účinok
Bazalka pravá	<i>Ocimum basilicum</i>	Listy	Neuvedené	NF	UV absorbér
Broskyňa obyčajná	<i>Prunus persica</i>	Kvety	Kaempferolové glykozidové deriváty	SPE	Antioxidant, Inhibuje vznik poškodení vyvolaných UVB/UVC
Citrónovník pomarančový	<i>Citrus sinensis</i>	Plody	Cyanidínové 3-glykozidy	A, SPE	Antioxidant, ochraňuje pokožku pred poškodením UV žiarením
Fialka trojfarebná	<i>Viola tricolor</i>	Neuvedené	Flavonoidy	NF	Ochrana pred slnečným žiarením
Ginko dvojlaločné	<i>Ginkgo biloba</i>	Zelné listy	Neuvedené	A, SPE	Antioxidant, Znižuje počet spálenín indukovaných UV žiarením
Kávovník	<i>Coffea genus</i>	Zelené suché kávové zrná	Lipidové frakcie	NF	UV abosrbent, emolient
Nechtík lekársky	<i>Calendula officinalis</i>	Kvet	Flavonoidy, polyfenoly	SPE	Zabraňuje oxidačnému stresu indukovanému UV žiarením
Púpava lekárska	<i>Taraxacum officinale</i>	Listy a kvety	Neuvedené	A, NF, SPE	Potenciálny UV absorbér, inhibuje poškodenia vyvolané UVB žiarením

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

2.5 SPF

Je skratka vyplývajúca z anglického termínu „Sun Protection Factor“ čo predstavuje ochranný faktor pred slnečným žiarením. Je to univerzálny indikátor, ktorý popisuje efektívnosť produktov určených na ochranu pokožky pred UV žiarením. Je to pomer, ktorý vyjadruje minimálne množstvo erytémovej dávky na koži, ktorá je chránená kozmetickým prípravkom oproti minimálnej erytémovej dávke na nechránenej koži. Tento pomer je vyjadrený v Rovnica 1 [19].

$$SPF = \frac{\text{minimálna erytémová dávka v pokožke s ochranou}}{\text{minimálna erytémová dávka v pokožke bez ochrany}} \quad (1)$$

Rovnica 1 Vyjadrenie SPF ochrany kože pred UV žiarením [19]

V praxi to znamená, koľko krát si používateľ prípravku môže predĺžiť pobyt na Slnku bez rizika spálenia sa.

Škála SPF však nie je lineárna. SPF 15 blokuje 93 % UVB žiarenia, SPF 30 je schopné zablokovať 97 % UVB žiarenia a SPF 50 zablokuje až 98% UVB žiarenia.

Ďalší pohľad, ako táto ochrana funguje je, že ak sa pokožka na Slnku spáli do 10 minút, SPF 15 je schopný túto dobu predĺžiť 15-krát, a teda na 150 minút. Závisí to však aj na type pokožky a množstve použitého produktu [10,19,20,21].



Obr. 4 Ukážka princípu SPF ochrany, prevzaté a upravené z [22]

2.5.1.1 Meranie SPF

Metódy na meranie *in vitro* sa delia na dva druhy. Jedným z nich sú metódy založené na meraní absorpcie alebo transmisie UV žiarenia u ochranných produktov nanesených na kremenných doskách alebo na biomembránach. Druhé typy metód sú založené na meraní týchto produktov na základe spektrofotometrickej analýzy zriedených roztokov. Skupina chemikov pod vedením Mansura vynašli jednoduchú matematickú rovnicu, používajúcu UV spektrofotometriu [23]. Tá je znázornená v

Rovnica 2, v ktorej sú dosadené vlnové dĺžky v rozmedzí od 290 do 320 nm pri kroku 5 nm.

$$SPF_{\text{spectrofotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (2)$$

Rovnica 2 Mansurova rovnica [23]

CF predstavuje korekčný faktor (10), $Abs(\lambda)$ vyjadruje spektrofotometrickú absorbanciu pri zvolenej vlnovej dĺžke, $EE(\lambda)$ je erytmogénny účinok žiarenia pri zvolenej vlnovej dĺžke. $EE \times I$ sú konštanty, ktorých hodnoty sú zahrnuté v Tabuľka 2 Hodnoty konštant $EE \times I$ pre zvolené vlnové dĺžky 290-320 nm s krokom 5 nm [23].

Tabuľka 2 Hodnoty konštant $EE \times I$ pre zvolené vlnové dĺžky 290-320 nm s krokom 5 nm [23].

Vlnová dĺžka λ [nm]	$EE \times I$
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

2.5.2 Koža

Ludská koža je vonkajšia bariéra ľudského tela. Zároveň je to najväčší orgán tela, čo sa týka plochy a váhy. Jej funkciou je chrániť ľudské telo pred teplom, svetlom, infekciami a úrazmi. Reguluje teplotu tela a výmenu tekutín v ľudskom tele. Je to spleť nervov a nervových zakončení, žliaz a ciev, ktoré umožňujú pocity tepla, chladu, dotyku, tlaku a bolesti, a zároveň uskladňuje vodu a lipidy, aby sa zachovala správna funkcia metabolizmu. Jej štruktúra sa skladá z troch vrstiev, epidermis – pokožka, dermis – zamša a hypoderma – podkožné tkanivo – subcutis [10].

Epidermis je najvrchnejšia vrstva kože a jej hlavnou úlohou je oddelenie vnútorného prostedia od vonkajšieho. Slúži teda ako bariéra, ktorá je 50 – 150 μm hrubá, a ktorej povrch sa neustále obnovuje, a to sústavným opotrebovaním vrstiev zrohovatených plochých bezjadrových buniek. Táto neustála obnova a rast nových buniek začína v subvrstve *stratum basale*, kde sa tieto bunky diferencujú na keratinocyty. V subvrstve *stratum spinosum* sa bunky splošťujú, v *stratum granulosum* postupujú viac k povrchu, kde nastáva bunková smrť. V ďalšej subvrstve *stratum lucidum* bunky strácajú svoje jadro a prechádzajú na vonkajšiu stranu pokožky kde sa rozkladajú vo forme korneocytov. Tie následne formujú ďalšiu subvrstvu *stratum corneum*. *Stratum corneum* tak predstavuje konečnú vrstvu diferenciácie buniek, keratinizácie. Pokožka okrem keratinocytov obsahuje aj melanocyty, ktoré sú zodpovedné za sfarbenie pokožky. Okrem nich sa v pokožke nachádzajú aj Langerhansove bunky zahrnuté v imunitných reakciách kože. Epidermis je pokrytá hydrolipidickým filmom. Je to emulzia vody a lipidov, ktorá vytvára ochrannú vrstvu. Vodná časť tejto emulzie obsahuje predovšetkým kyselinu mliečnu a rôzne aminokyseliny z potu, voľné mastné kyseliny z mazu a aminokyseliny ako vedľajšie produkty z procesu keratinizácie [24].

Dermis, ako ďalšia vrstva kože je 150 μm až 4 mm hrubá a poskytuje podporu pokožke tým, že ju zásobuje živinami. Skladá sa z fibroblastov a extracelulárnej hmoty, ktoré pokožke zabezpečujú dostatočnú oporu a flexibilitu. V najvyššej vrstve dermis sú zakončenia vlasových folikulov spojených s mazovými a potnými žľazami. Dominujúce zložky dermis sú kolagén a elastín, a preto je o dermis známe, že je to silná, pevná a pružná časť kože. Tieto vlákna sú obklopené gélovitou hmotou s obsahom kyseliny hyalurónovej, ktorá viaže vodu a tak dopĺňa celkový objem kože. S rastúcim vekom sa však tvorba kolagénu a elastínu spomaľuje a schopnosť viazania vody takisto klesá. Faktory ako UV žiarenie či zmeny teplôt majú na tieto vlákna vysoký vplyv. V spojitosti s týmito faktormi bola vyvinutá klasifikácia kože. Táto

klasifikácia bola zhotovená na základe tzv Fitzpatrickovho testu. V praxi sa stretávame s názvom fototyp pokožky, ktorý je prehľadne znázornený v Tabuľka 3 [25].

Tabuľka 3 Fototypy pokožky, prevzaté a upravené z [10]

Fototyp	Pokožka	Popis	Reakcia pokožky na slnečné žiarenie	Dĺžka pobytu na slnku bez spálenia kože
I Keltský typ	Veľmi citlivá 2 %	Oči – obyčajne modré, zriedka hnedé Vlasy – ryšavé, blond Plet' – nápadne svetlá, husté pehy	Vždy sčervená, nikdy nestmavne Opálenie – žiadne, koža červená bez pigmentácie, po 1 – 2 dňoch sa lúpe Spálenie – vždy ťažké, bolestivé sčervenanie	5 – 10 min
II Európan so svetlejšou plet'ou	Citlivá 12 %	Oči – modré alebo zelené Vlasy – svetlé Plet' – tmavšia než typ I, riedke pehy	Obyčajne sčervená, stmavne málo Opálenie – málo, veľmi slabá pigmentácia, koža sa lúpe Spálenie – vždy silné, bolestivé sčervenanie	10 – 20 min
III Európan s tmavšou plet'ou	Normálna 78 %	Oči – šedé alebo hnedé Vlasy – tmavé alebo gaštanové Plet' – svetlá až svetle hnedá, žiadne pehy	Niekedy sčervená, tmavne dobre Opálenie – priemerné, priemerná pigmentácia Spálenie – zriedka, mierne	20 – 30 min
IV Stredomorský typ	Odolná 8 %	Oči – tmavé Vlasy – obyčajne hnedé až čierne Plet' – svetle hnedá, olivová, žiadne pehy	Takmer nikdy nesčervená, vždy stmavne Opálenie – rýchle, hlboká pigmentácia Spálenie – takmer nikdy	Do 40 min

Najspodnejšia vrstva kože, subcutis pôsobí ako tlmič nárazov a izolácie tela. Ďalej je to zásobáreň energie, kde sa nachádzajú tukové bunky adipocyty. Okrem zásoby energie však tuk predstavuje aj tepelnú izoláciu. Spolu so špeciálnymi kolagénnymi vláknami a krvnými cievami tvorí základnú štruktúru tejto vrstvy. Jej hrúbka sa v rôznych častiach tela líši [25,26].

2.6 Vybrané prírodné látky obsahujúce UV filtre

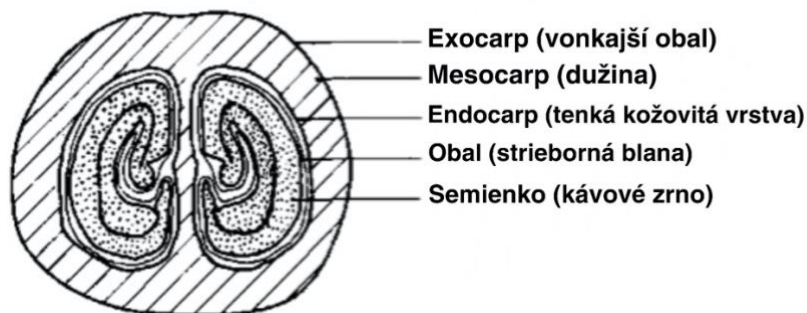
2.6.1 Káva

Kávovník je drevnatá trvalá dvojklíčnolistá rastlina patriaca do čelade *Rubiaceae* a rodu *Coffea*. Tento rod obsahuje tri hospodárske druhy, z ktorých sa pripravuje kávový nápoj. Patria sem *Coffea arabica*, *Coffea canephora (Robusta)* a *Coffea liberica*. Rod *Coffea* zahrňuje kríky a malé stromy svojim pôvodom spadajúce do južnej Afriky a Ázie. Zo všetkých troch druhov sa hospodársky najviac využíva káva Arabika. Jej produkcia predstavuje 75 – 80% z celosvetovej produkcie kávy. Káva Robusta predstavuje zvyšných 20 % svetovej produkcie a od kávy Arabiky sa líši chuťou. Jej kávové zrná sú od Arabiky robustnejšie a vytvárajú kávový nápoj s menej výraznou chuťou, za to však obsahuje viac kofeínu. Oba druhy Arabika aj Robusta dorastajú do výšky až 10 metrov, avšak producenti udržiavajú ich výšku tak, aby bol umožnený dobrý zber. Pestujú sa v oblasti subtropického až tropického pásma, napríklad v Ázii, Južnej a Strednej Amerike, Afrike, Arabskom polostrove a Indonézii [27, 28].

2.6.2 Rast a vývin kávovníka

Do troch až štyroch rokov od zasadenia začne rastlina produkovať sladko zapáchajúce kvety. Rod Arabica je schopný samoopelenia, pričom rod Robusta je závislý na krížovom opelení. Po 6 – 8 týždňoch po opelení každého kvetu sa začne bunkové delenie a kávový plod zostáva upevnený na konárkoch kríku po dobu, ktorá je závislá na klíme prostredia. Plodnice sa potom vyvinú do kôstkovice. Tento rýchly proces trva približne 15 týždňov po odkvitnutí. V tomto čase sa začne vyvíjať kôra, ktorá pripomína finálny tvar kávového zrna. Po období rýchleho nárastu sa kôra úplne vyvinie ale jej veľkosť sa nezväčší. Endosperm je po dobu 12 týždňov po odkvitnutí veľmi malý. Za túto dobu však potlačí a nahradí kôru. Endosperm úplne vyplní svoju dutinu 19 týždňov po svojom uvoľnení. Takýto endosperm je z počiatku bledej farby a navlhnutý, avšak za niekoľko mesiacov dostáva svoju finálnu tvrdosť a farbu. Počas tejto doby sa endospermu dostáva až 70 % fotosyntetických produktov produkovaných listami kávovníka. Následne vznikajú finálne plody kávovníka nazývané kávové čerešne. Svoju úrodu teda poskytuje už po troch až štyroch rokoch, avšak primeraná úroda sa dá očakávať až od štiasteho roku po zasadení. Svoju úrodu kávovník poskytuje po dobu 25 – 35 rokov závislosti na klimatických podmienkach a odrode kávovníka. Ako bolo spomenuté, káva Arabica predstavuje 75 – 80 % celosvetovej produkcie kávy, avšak len jedna pätina z celej úrody sú kvalitné kávové zrná [28].

Káva Robusta svoju úrodu dáva už do dvoch rokov po vysadení a jej plody zrejú približne počas jedného roka. Tento druh kávovníka je odolnejší voči nižším teplotám a aj ochoreniam, ktoré postihujú plantáže. Jeho zrná nedosahujú kvality kávy Arabica a obsah kofeínu je približne 2 až 3-krát väčší. V zemiach ako Afrika a juhovýchodná Ázia dávajú tomuto druhu kávy v pestovaní prednosť kvôli menej náročným požiadavkám na kvalitu pôdy a kvôli svojej vyššej úrodnosti [28,29].



Obr. 5 Priečny rez kávového plodu, prevzaté a upravené z [30]

2.6.3 Zber a spracovanie kávových zŕn

Plody kávovníku sa buď zbierajú ručne, striasaním na plachty alebo pomocou prístrojov na zber. Vzhľadom na to, že kávové bobule nenarastajú na každom kríku rovnomerne a v rovnakú dobu, stále sa najviac preferuje ručný zber. Priemerný kávovník je schopný vyprodukovať za jeden rok približne 2 000 kávových zŕn, čo je cca 0,8 až 1,2 kg. Ďalšie spracovanie pozostáva v zbavení sa obalov plodu a získajú sa tak kávové zrnká. Tento proces môže prebiehať dvoma spôsobmi, suchým a mokrým spôsobom [29].

Pri suchom spôsobe sa plody prepierajú vo vode, kde sú zbavené nečistôt a následne sú sušené na betónových dvoroch na priamom Slnku. Neustálym prehadzovaním sa plody dôkladne vysušia a následne sa pomocou lúpacích strojov odstraňuje vysušená dužina vrátane šupky. Týmto spôsobom dostávame výsledný produkt v podobe kávových zŕn [29].

Pri mokrom spôsobe sa dokonale oddelia nezrelé, ľahké plody od bobúľ, ktoré sú úplne zrelé. To má obrovský vplyv na konečnú kvalitu zelenej kávy. Kávové plody sa sypú do kontajnerov naplnených vodou aby sa odstránili nečistoty. Po ich uležaní sú prehnané mačkadlom. Tým sa oddelí vonkajší obal s dužinou od semena so šupkou. Fermentáciou sa dužina ďalej oddeľuje a potom sa zrná umývajú v práčke a usušia sa. Po olúpaní šupky na lúpacích strojoch sa zrná triedia podľa veľkosti a farby [29].

2.6.4 Praženie kávy

Surová zelená káva sa nedá použiť na prípravu kávového nápoja. Prvé počiatky úpravy kávových zŕn sa pripisujú prirodzenému javu, kedy nastal požiar a kávovníkové kríky s plodmi mu podľahli. Svoje charakteristické vlastnosti ako príjemná aróma či rôzne odtiene hnedej farby zŕn káva získava práve pražením. Celému procesu však predchádza vhodný výber a pomer kávových zŕn, čo sa po pražení odráža na kvalite a cene kávy. Týmto výberom sa dosahuje rovnováha medzi chuťou a arómou, ktorá je nezameniteľná pri každom požití kávového nápoja. Aby sa dosiahlo rovnomerného opraženia všetkých zŕn, využíva sa k tomu kolobeh horúceho vzduchu, ktorý na zrná pôsobí neustále po určitú dobu. Pri pražení zohráva dôležitú úlohu hlavne tvar a veľkosť kávového zrna. Veľké zrná potrebujú vyššiu opatnosť pri pražení než tie menšie, pretože sú jemnejšie a ľahko by sa spálili. Menej pražená káva je oproti prepraženej tmavej káve omnoho svetlejšia. Pri pražení dochádza k pyrolýze, kde kľúčovú úlohu zohráva práve teplota. Jej hodnota by sa mala pohybovať medzi 203 – 205 °C. Pri tejto teplote totiž v procese pyrolýzy dochádza k degradácii tukov a sacharidov, uvoľňujú sa delikátne oleje a uvoľňujú sa plynné látky [28,29].

Aby nedošlo k výraznej strate éterických olejov v kávových zrnách, musia sa po vybratí z pražiacej pece rýchlo ochladiť. Fenolické látky, ktoré sa tvoria pri pražení, majú za následok príjemnú kávovú arómu čerstvo praženej kávy. K vyrovnaniu tejto arómy dochádza po troch až piatich dňoch po upražení. Prítomnosť vody a rozpustných látok v kávových zrnách je ďalším dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje praženie. Dĺžka a intenzita praženia obsah týchto látok

znižujú, čo spôsobuje stratu 15 – 20 % hmotnosti zrna, naproti tomu však zrná nadobúdajú na objeme vďaka tvorbe plynných látok pri pražení [29].

Postup praženia má veľmi prísne zásady, ktoré vychádzajú z dlhoročných skúseností. Káva sa praží na rôznych stupňoch podľa spotrebiteľských návykov odberateľov. V Škandinávii sú zvyknutí na svetlejšie praženú kávu, zatiaľ čo v krajinách ako Taliansko, Francúzsko či v krajinách Južnej a Strednej Ameriky sa preferuje káva silne pražená [28,29].

Po upražení sa ešte odstraňujú vadné, zle upražené zrná, ktoré by svojou prítomnosťou mohli negatívne ovplyvniť výslednú chuť kávového nápoja. Káva sa následne balí, s ohľadom na zachovanie trvanlivosti, do ochrannej atmosféry, vakuu alebo pomocou pressurizácie [29].

2.7 Kávový olej

Ako bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, prírodné extrakty obsahujú látky účinné ako UV filtre a zlúčeniny, ktoré sa čoraz viac začínajú uplatňovať v priemyselnej výrobe nielen kozmetických prípravkov. Kávový nápoj je známy pre svoje blahodárne účinky už po stáročia. S rýchlym vývinom technológií v posledných desaťročiach však prišlo na rad aj skúmanie tohto nápoja z chemického hľadiska. Percentuálne chemické zloženie prírodných látok a biomolekúl prehľadne znázorňuje Tabuľka 4 [30].

Tabuľka 4 Chemické zloženie (%) zelených kávových zŕn druhov Arabika a Robusta [30].

	Arabika	Robusta
Minerály	3,0 – 4,2	4,0 – 4,5
Kofeín	0,9 – 1,2	1,6 – 2,4
Lipidy	12,0 – 18,0	9,0 – 13,0
Chlórgeenné kyseliny	5,5 – 8,0	7,0 – 10,0
Alifatické kyseliny	1,5 – 2,0	1,5 – 2,0
Oligosacharidy	6,0 – 8,0	5,0 – 7,0
Polysacharidy	50,0 – 55,0	37,0 – 47,0
Aminokyseliny	2,0	2,0
Proteíny	11,0 – 13,0	11,0 – 13,0

Vhodným zdrojom získavania kávového oleja z kávových zŕn sú kávové usadeniny získané z už pomletej a využitej kávy ku kávovému nápoju. Moderné technológie posledné roky začínajú využívať prírodné zdroje a biologické odpadné látky k ďalšiemu uplatneniu v rôznych odvetviach výroby. Šetrí sa tým tak životné prostredie a znižuje sa produkcia odpadu, ktorý má potenciál byť ďalej využitý [30].

Hodnoty kávového oleja sa líšia druh od druhu. Pre Arabiku je to približne 12 – 18 % oleja, pre kávu Robusta o niečo menej, teda 9 – 13 % oleja [30].

Kávový olej sa na analytické účely získava pomocou extrakcie. Extrahujú sa tak kávové usadeniny väčšinou v organických rozpúšťadlách. V minulosti to bol hlavne petroléter. Dnes sa však do popredia dostávajú aj iné organické rozpúšťadlá, ako napríklad hexán, bezvodý etanol, metanol alebo chloroform. Pred samotnou extrakciou je potrebné usadeniny vysušiť, aby sa predišlo mikrobiálnemu rastu [30].



Obr. 6 Káva pred a po procese extrakcie. A) čerstvé kávové usadeniny po prípravení kávového nápoja, (B) usušené kávové usadeniny, (C) kávové usadeniny zbavené tukov, po extrakcii oleja [31]

Pomocou kvapalinovej a plynovej chromatografie sa potom dajú analyzovať jednotlivé frakcie a obsah jednotlivých látok zastúpených v kávovom oleji [30,31].

Takto pripravený kávový olej je možné využívať v mnohých odvetviach priemyselnej výroby, najmä však v kozmetickom priemysle. Je to hlavne preto, lebo káva je potenciálny zdroj prírodných antioxidantov, fenolických látok a flavonoidov, ktoré sú schopné chrániť pokožku pred škodlivým UV žiarením [31].

2.8 Nanomateriály

Nanomateriály v posledných rokoch významne ovplyvnili rôzne disciplíny vedy a techniky. Prvým odvetvím, kde sa začali používať nanotechnológie a nanomateriály, bol kozmetický priemysel. Používanie nanomateriálov malo za účel zlepšiť doručovanie kozmetických ingrediencií do pokožky. Ďalšou úlohou ich používania bolo takisto aj zvýšenie stability určitých komponentov produktu, ktoré mali tendenciu sa v čase skôr rozpadnúť alebo znižovať svoju účinnosť v dôsledku oxidačných procesov [32,33].

Jedny z prvých nanočastíc používaných v kozmetickom priemysle boli oxid titaničitý a oxid zinočnatý. Ich účinok bol využitý hlavne v produktoch na ochranu pred slnečným žiarením, založených na odraze škodlivých UVA a UVB lúčov a sú používané dodnes. Sú však súčasťou aj iných kozmetických prípravkov, najmä v dekoratívnej kozmetike [33].

Stále však nie je presne dané, koľko druhov nanomateriálov sa v kozmetike využíva, pretože definícia nanomateriálu v kozmetike nie je pevne daná a stále sa upravuje. Americká Správa potravín a liečív (FDA) však spracovala niekoľko bodov, kde sa usmerňuje čo je nanomateriál pre kozmetický priemysel, a zároveň regulujú používanie takýchto materiálov. Jedným z týchto bodov je napríklad označenie materiálu za nano-, pokiaľ má vo svojej štruktúre aspoň jeden vonkajší alebo vnútorný rozmer v nanomerítke, tzn. od nm po 100 nm. Ďalej toto usmernenie pojednáva o fyzikálno-chemických vlastnostiach, biologických efektoch, ktorých atribúty sa pripisujú práve tomuto vnútornému alebo vonkajšiemu nanomerítke materiálu [34].

Európska únia pre reguláciu kozmetických výrobkov označuje za nanomateriál látku, ktorá je nerozpustná alebo bioperzistentná, čo znamená, že za určitých podmienok radšej ostáva v ľudskom organizme než by ním bola zničená. Je pripravená spôsobom, kde jej vonkajší rozmer alebo vnútorná štruktúra spadá do merítka od 1 – 100 nm [33,34].

Napriek týmto uzneseniam, čo je nanomateriál v kozmetike, však stále existuje niekoľko otázok nad používaním nanomateriálov v kozmetických produktoch. Ide hlavne o ich stabilitu a rozpustnosť, keď dôjde do kontaktu s ľudským organizmom. Mnohé nanomateriály používané v kozmetike totiž zaručujú zlepšenú absorpciu do pokožky, avšak pri styku s pokožkou môžu byť nestále, a tak strácajú svoju vlastnosť doručiť danú látku efektívnejšie

pod povrch pokožky. Tento vylepšený transport látky do pokožky bol jedným z hlavných cieľov, prečo sa začali nanomateriály v kozmetike hojne využívať [34].

Za stabilné a nerozpustné nanomateriály využívané v kozmetických produktoch sú označované najmä nanočastice oxidu titaničitého, zlata, striebra a polymérov. Ich stabilita bola jasne preukázaná a svojím pôsobením neohrozujú ľudský organizmus [33].

2.9 Nanončastice

Nanočastice a nanomateriály získali popredné miesto v technologickom výskume a vývoji vďaka ich laditeľným fyzikálnym, chemickým a biologickými vlastnostiam, ako napríklad bod topenia, elektrická a tepelná konduktivita, katalytická aktivita či absorpcia svetla. Nanoštruktúrne materiály môžu byť charakterizované v závislosti na ich veľkosti, zložení, tvare či pôvode. Vzhľadom na zvýšenú produkciu nanomateriálov a nanočastíc sa však na toto rozdelenie nabaľuje aj otázka toxicity, ktorú je potrebné brať do úvahy [35].

Nanometer je jednotkou SI sústavy a predstavuje 10^{-9} metra v jednotkách dĺžky. Základom nanomateriálov je však fakt, že vo svojej štruktúre dosahujú veľkosti 1 – 100 nm aspoň v jednom rozmere. Existujú rôzne klasifikácie nanočastíc a nanomateriálov. Európska únia ale aj Spojené štáty majú niekoľko legislatívnych dokumentov dotýkajúcich sa práve nanoštruktúrnych materiálov, avšak jedna, ucelená a medzinárodné platná neexistuje [32].

Väčšina najbežnejších nanočastíc môže byť rozdelená do štyroch kategórií založených na materiáloch, z ktorých sú pripravené. Uhlíkové nanomateriály (karbónové nanotrubice, fullerény), anorganické materiály, organické štruktúry ako napríklad dendriméry či lipozómy a kompozitné materiály predstavujú hlavné rozdelenie nanočastíc. Medzi ďalšie delenie môže byť zaradené aj delenie podľa pôvodu, a to na syntetické a prírodné. Prírodné nanomateriály sú prítomné bežne v prírode alebo vyprodukované určitým biologickým druhom. Tieto prírodné zdroje zároveň slúžia aj ako vhodné matrice pre ďalšiu výrobu syntetických nanoštruktúr pre technologické aplikácie [36].

2.9.1 Lipozómy

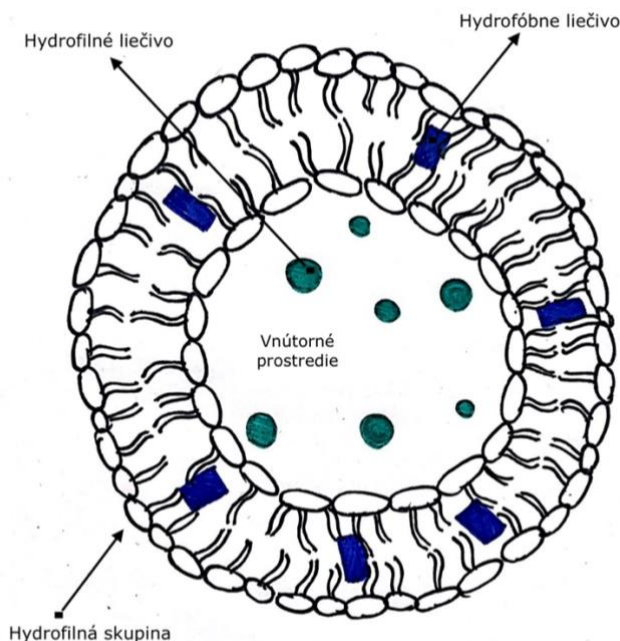
Lipozómy sú kapsulovité uzatvorené vezikuly, ktoré enkapsulujú vodnú fázu. Vo vodnom prostredí sú tvorené z rozdispergovaných fosfolipidov. Fosfolipidy sú biologicky odvodené látky, ktoré majú vysokú afinitu k ľudskej pokožke a javia sa ako bezpečné na použitie. Majú vysokú funkcionálnu a tak sa hojne využívajú v kozmetickom priemysle [37].

Mnohí vedci do lipozómov vkladajú vysoké očakávania, pretože sú skvelé absorbenty, vďaka ich vysokej permeabilite a ich schopnosti uchovávať v sebe látky vo vzťahu k pokožke, konkrétne na jej vonkajšej vrstve a v *stratum corneum*. Zlepšujú nízku afinitu málo rozpustných látok alebo aktívnych látok k ľudskej pokožke. Lipozómy môžu byť modifikované enkapsuláciou rôznych látok v závislosti na použití a konkrétnom účinku. Okrem kozmetického uplatnenia, nachádzajú svoj potenciál aj v bioinžinierstve, genetickom inžinierstve, biomembránových modeloch alebo ako nosiče v riadenom uvoľňovaní liečiv [37].

Prvý krát boli lipozómy popísané britským hematológom Alecom D. Banghamom, a to v roku 1961 pri testovaní elektrónového mikroskopu, kde po prídavku negatívneho činidla pre vysušenie fosfolipidov spozoroval podobnosť s plazmatickou membránou. Ako dôkaz slúžili aj samotné fotografie z mikroskopu, kde bolo potvrdené, že bunková membrána je tvorená lipidovou dvojvrstvou. Od tej doby sa lipozómy dostali do pozornosti mnohých vedcov a nastal rýchly vývoj týchto štruktúr [38,39].

Z fyzikálno-chemického hľadiska sú to veľmi malé sférické molekuly. Svojou veľkosťou sa však môžu líšiť. Tvoria ich lipidová dvojvrstva a vnútorný kompartment, ktorý je od vonkajšieho okolia chránený. Táto lipidová dvojvrstva je tvorená väčšinou fosfolipidmi obohatenými o fosfatidylcholín. V niektorých prípadoch sa ešte na vonkajšiu vrstvu pripájajú ligandy, ktorých úlohou je rozpoznávanie a prijatie lipozómov daným tkanivom. Lipidová

membrána za bežných podmienok nie pre priepustná pre veľké dipóly, ako sú napríklad sacharidy či proteíny, a pre ióny. Majú amfifilný charakter, vďaka čomu sa môžu využívať ako nosiče hydrofilných aj hydrofóbných látok. Najčastejšia metóda prípravy týchto častíc spočíva v narušení bunkovej membrány prírodných fosfolipidov s cholesterolom, pomocou ultrazvuku. Ich fyzikálno-chemické vlastnosti sú ovplyvnené chemickým zložením, pH, teplotou, veľkosťou, hydratáciou, technológiou prípravy a taktiež aj účinkom Van der Walsových interakcií. Vďaka tomu sa určuje ich stabilita, chovanie v organizme ale aj usporiadanosť [37,40].



Obr. 7 Štruktúra lipozómu, zdroj: vlastné spracovanie

2.9.1.1 Rozdelenie lipozómov

□ Malé unilamelárne vezikuly (SUV)

Takzvané „Small unilamellar vesicles“ (SUV), vo svojej štruktúre majú iba jednu lipidovú dvojvrstvu s priemerom < 50 nm. Majú vysoké membránové napätie, ktoré vyplýva zo značného zakrivenia membrány, a tým sa líšia od ostatných lipozómov. Vzhľadom na vysokú deformáciu membrán a z fyzikálno-chemického hľadiska sú pomerne nestabilné. Vďaka tomu je ich využitie značne obmedzené, pretože sú prepustnejšie pre hydrofilné molekuly a náchylnejšie ku fúzii s väčšími molekulami [41].

□ Veľké unilamelárne vezikuly (LUV)

Vďaka väčšiemu priemeru (> 50 nm) sú stabilnejšie a majú nižšie membránové napätie. Sú vhodnými nosičmi hydrofilných látok, vďaka svojemu vysokému obsahu vody vo svojej štruktúre [41].

□ Veľké multilamelárne vezikuly (MLV)

Sú pripravované vo veľkosti 100 – 1 000 nm a obsahujú vysoký počet lipidových dvojvrstiev, a preto spomaľujú uvoľňovanie enkapsulovaných hydrofilných liečiv. Vzhľadom na tento vysoký počet lipidov je pomer hydrofilného liečiva ku lipidom v MLV nevýhodný, preto sú vhodné skôr lipofilné látky [41].

□ Veľké oligolamelárne vezikuly (OLV)

Tieto vezikuly obsahujú mnohovorstevné membrány, spomaľujú uvoľňovanie liečiva a preto je možné podávať vyššie množstvo liečiva a predĺžiť tak jeho terapeutický efekt. Pri príprave LUV sú OLV zväčša vedľajšími produktmi [41].

□ Multivezikulárne vezikuly (MVV)

Tieto lipozómy majú vo svojej štruktúre enkapsulovaných viac menších vezikulových častíc. Ako v predošlom prípade, sú vedľajšími produktami prípravy iných typov vezikúl, predovšetkým MLV [41].

2.9.2 Materiály používané na prípravu nanočastíc

2.9.2.1 Cholesterol

Cholesterol je amfipatická zlúčenina, tvoriaca súčasť bunkových membrán, ktorá stabilizuje ich štruktúru. Bunkám zaisťuje permeabilitu membrán a podieľa sa na medzibunovej komunikácii. Tieto faktory sú v príprave nanočastíc kľúčové, pretože cholesterol dokáže znížiť priepustnosť rozpustných molekúl vo vode cez membránu. Takisto je prítomný v rôznych syntézach v ľudskom tele, napríklad pri syntéze vitamínu D, steroidných hormónov či žlčových kyselín [42,43].

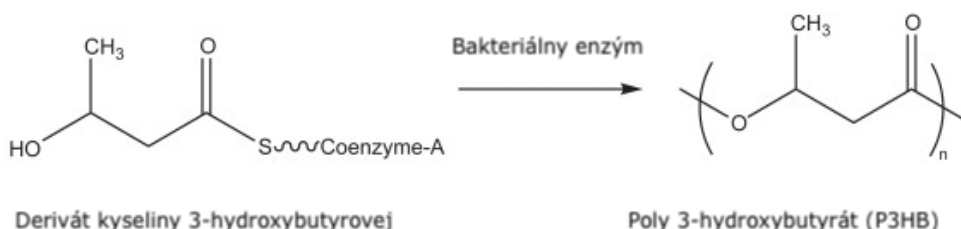
2.9.2.2 Lecitín

Lecitín alebo tiež fosfatidylcholín, je prirodzene vyskytujúca sa látka vo všetkých bunkových membránach cicavcov. Patrí do skupiny fosfolipidov, ktorého prekursorom je cholín. Je hlavnou zložkou prírodného sójového oleja, z ktorého sa rafináciou tiež získava. Zdrojom lecitínu je aj vaječný žltok [44].

Momentálne je to najviac využívaná prírodná povrchovo aktívna látka v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle, nielen vďaka jeho skvelej biokompatibilite či nízkej toxicite, ale aj vďaka tomu, že sa získava z obnoviteľných prírodných zdrojov a je využiteľný vo viacerých „eco-friendly“ procesoch za relatívne nízke náklady [45].

2.9.2.3 Poly(3-hydroxybutyrát)

PHB je kryštalický lineárny polyester kyseliny 3-hydroxybutyrovej. Slúži ako zásobáreň uhlíka mnohých druhov baktérií a priemyselne sa vyrába fermentáciou glukózy baktériou *Alcaligenes eutrophus*. Pri tejto výrobe vzniká jedna opticky aktívna forma s konfiguráciou, ktorá vysvetľuje jeho kryštalickú štruktúru [46].



Obr. 8 Syntéza P3HB, prevzaté a upravené z [46].

PHB degraduje hydrolýzou, avšak jeho hlavná výhoda je, že svojimi mechanickými vlastnosťami pripomína PET materiály. V ľudskom tele je biodegradabilný no zároveň dobre degraduje aj v pôde, takže sa hojne využíva aj v poľnohospodárskych materiáloch. Všetky tieto jeho vlastnosti sa taktiež využívajú aj biomedicínskych aplikáciách alebo tkaninovom inžinierstve [47].

2.9.3 Metódy prípravy častíc

Všetky metódy prípravy lipozómov pozostávajú z hlavných 4 krokov. Začína sa vysušením lipidov z organického rozpúšťadla, následne sa lipidy rozdispergujú vo vodnom prostredí, pokračujúc prečistením výsledného roztoku a jeho následnej analýze [48].

Existujú dve hlavné metódy prípravy, a to pasívne a aktívne techniky zaťaženia. Medzi pasívne techniky radíme metódy mechanickej disperzie, metódy disperzie rozpúšťadla a metódy založených na odstránení neenkapsulovaného materiálu [37, 49].

2.9.3.1 Sonikácia

Patrí medzi metódy mechanickej disperzie. Je to jedna z najvyužívanejších metód pri príprave SUV. Dá sa sonikovať buď sondou alebo sonikovať v kúpeli. V prípade sonikácie sondou sa sonda ponorí priamo do lipidovej disperzie. Hrot tejto sondy dodáva do disperzie vysokú energiu. To má za príčinu vznik lokálnej tepelnej energie a vďaka nej môže dôjsť k degradácii lipozómov. Preto je dôležité, aby bola nádoba obsahujúca disperziu ponorená do vodného kúpeľa a predišlo sa tak neprímeranému zahrievaniu a následnej degradácii. Ďalšou nevýhodou tejto metódy je aj fakt, že pri sonikácii sa tvoria spolu s SUV aj MLV častice [50].

V prípade sonikácie kúpeľom sa lipozómová disperzia umiestni do valca, ktorý je v kúpeľovom sonikátore. V tomto prípade sa teplota disperzie kontroluje lepšie než pri sonikácii sondou [37,49,50].

2.9.3.2 Hydratácia lipidovej dvojvrstvy

Pomocou organických rozpúšťadiel dochádza k rozpusteniu lipidov, kde najčastejším rozpúšťadlom je chloroform. Roztok pozostáva z rozpustenia 10 – 20 mg lipidu na 1 ml rozpúšťadla. Takto vzniknutý roztok sa následne nechá odpariť na rotačnej vákuovej odparke. Výsledkom je tenký film fosfolipidov na dne a stenách guľatej banky, ktorý sa prídavkom vody opäť rehydratuje a následne miešaním bez vákuua vznikajú MLV častice. Dôležitým krokom je výber správneho média, pomocou ktorého dôjde k hydratácii lipidového filmu [49].

2.9.4 Charakterizácia častíc

Pri príprave nanočastíc je posledným krokom ich samotná charakterizácia. Ku charakterizovaniu vzoriek sa dá pristupovať podľa rôznych kritérií. Medzi sledované veličiny patrí veľkosť a stabilita častíc, obsah a uvoľňovanie enkapsulovaných látok, antioxidačná aktivita, enkapsulačná účinnosť či cytotoxicita častíc [51].

2.9.4.1 Enkapsulačná účinnosť

Popisuje ju rovnica vyjadrená v

Rovnica 3 [52]. Enkapsulačná účinnosť je popísaná ako množstvo látky, ktorá je enkapsulovaná ku pomeru množstva látky, ktorá bola na enkapsuláciu použitá [52].

$$\text{Enkapsulačná účinnosť (\%)} = \frac{C_{\text{celková}} - C_{\text{uvoľnená}}}{C_{\text{celková}}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Rovnica 3 Rovnica enkapsulačnej účinnosti [52].

Množstvo látky, ktoré sa do častíc enkapsuluje, závisí na jej lipofilných a hydrofilných vlastnostiach a takisto aj svojou ochotou interagovať s lipidovou dvojvrstvou membrány. Množstvo enkapsulovanej látky vplýva aj na imunitné bunky v pokožke, ktoré sa viac alebo menej aktivujú pri prenikaní látok cez pokožku v závislosti práve na množstve látky, ktorá je enkapsulovaná [53,54].

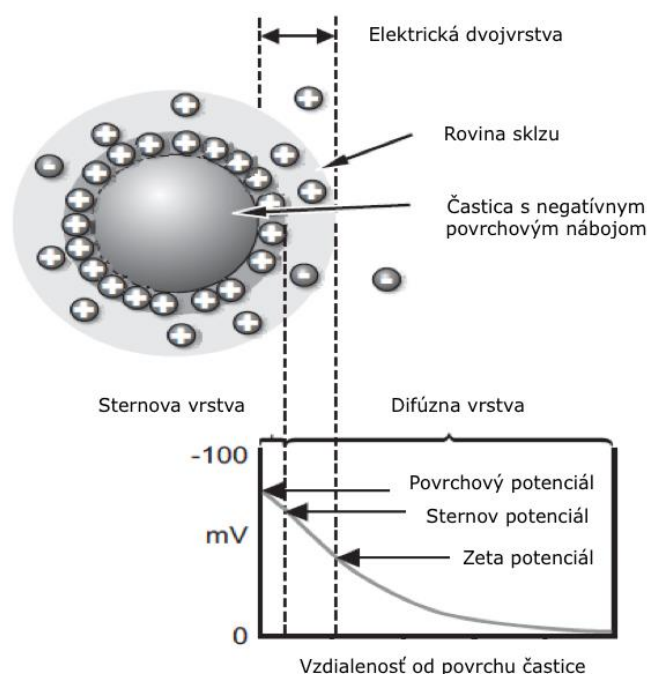
2.9.5 Metóda charakterizácie veľkosti a stability častíc pomocou dynamického rozptylu svetla

Táto metóda slúži na stanovovanie veľkosti častíc, ktorých veľkosť sa pohybuje v submikrónovej oblasti. Je to neinvazívna metóda, ktorej princíp je založený na meraní fluktuácie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja okolo jeho priemernej hodnoty. Fluktuácie nastávajú z dôvodu interferenčného zoslabovania a zosilovania svetla, ktoré sa rozptyľuje na časticách disperznej fázy, ktoré podliehajú Brownovmu pohybu. Čím sa častice pohybujú rýchlejšie, tým viac sa zvyšuje intenzita rozptýleného žiarenia. Z toho vyplýva, že rýchlosť zmeny je priamo úmerná na pohybu molekuly. Veľkosť

častíc sa následne vypočíta pomocou translačného difúzneho koeficientu D , zo Stokesovej-Einsteinovej rovnice [55].

Pred meraním je dôležité sledovať stav roztoku v kvete, v ktorej je meraný. V kvete by nemali byť prachové častice a pri naplnení by nemala obsahovať bublinky, ktoré by mohli mať vplyv na signál analytu a tým skresľovať výsledky merania [55].

Pri meraní stability častíc sa vychádza z hodnôt zeta potenciálu [55]. Tento potenciál sa nachádza na rovine sklzu medzi časticou a združenou dvojvrstvou s obklopujúcim rozpušťadlom. Odpudivé sily zapríčiňujú vznik potenciálovej bariéry. Veľkosť tejto bariéry vyjadruje vlastne veľkosť zeta potenciálu. Odpudivé sily taktiež majú za následok to, že častice sa k sebe nemôžu priblížiť tak, aby držali pohromade. V praxi to znamená, že ak majú častice vysoký negatívny alebo pozitívny zeta potenciál, v roztoku sa budú odpudzovať a tým pádom nebudú agregovať. V prípade nízkych hodnôt zeta potenciálu, sa častice budú naopak priťahovať a bude dochádzať k agregácii a tvoreniu zhlukov. O stabilných časticách hovoríme vtedy, ak sa ich hodnoty ZP pohybujú mimo hodnôt od $+30$ do -30 mV. Častice medzi týmito hodnotami sú nestabilné a pravdepodobne bude v roztokoch týchto častíc dochádzať k agregácii a teda k poklesu ich stability [55,56].



Obr. 9 Znázornenie častice so záporným povrchovým nábojom, zeta potenciál, prevzaté a upravené z [57]

2.10 Nanovláčna a metódy ich prípravy

Veľké pokroky v nanotechnológiach majú za následok vytváranie aj iných typov nanomateriálov, ako sú nanočastice. Medzi tieto materiály patria aj nanovláčna, ktoré ponúkajú vysokú produktivitu výroby za pomerne nízku cenu [58].

Priemer nanovláken sa pohybuje v jednotkách nanometrov, pričom majú veľký povrch na jednotku objemu a ich plocha je závislá práve na priemere vlákna. Čím je priemer nanovláken väčší, tým je vytvorená plocha menšia a naopak [58].

Nanovláčna je možné vyrábať z prírodných aj syntetických polymérov. Pre zlepšenie ich vlastností sa používajú aj ich kombinácie, čím sa zabezpečí ich lepšia biodegradabilita využiteľná v biomedicínskych aplikáciách [58,59].

V kozmetike či medicíne sa nanovláčnové materiály využívajú vo veľkom merítke, práve kvôli ich vynikajúcim vlastnostiam ako vysoká porozita s malou veľkosťou pórov či spomínaná

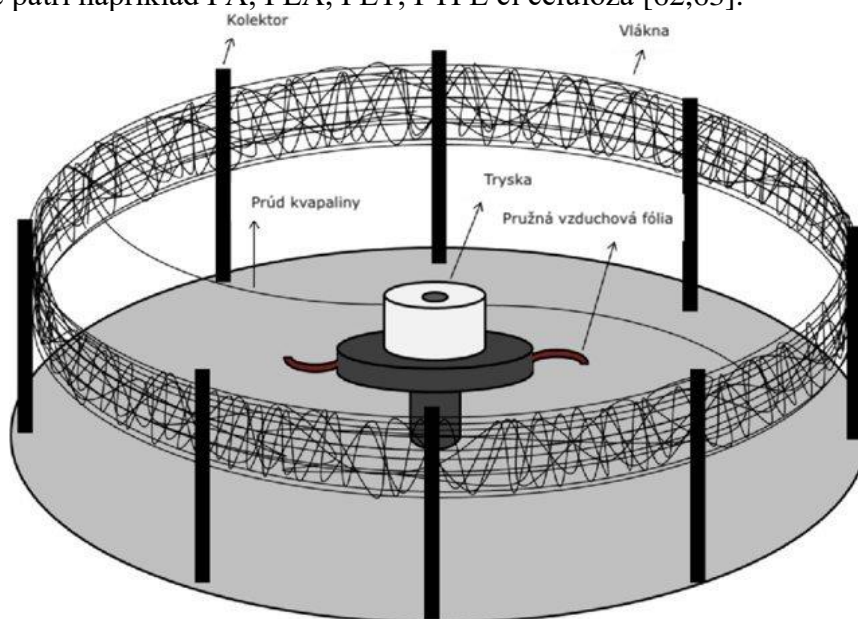
veľkosť povrchu k jednotke objemu. Spolu s nanoemulziami, lipozómami a nanopigmentmi tak predstavujú širokú skupinu materiálov, ktoré sa často vyskytujú v krémoch a olejoch na opaľovanie či vo vlasovej kozmetike, a v medicíne zas ako nosiče látok pre ciele uvoľňovanie liečiv alebo ako obvazy a kryty rán. Veľká kontaktná plocha medzi nanovláknami a pokožkou poskytuje doručenie kozmetických látok alebo liečiv do hlbších častí pokožky, čím sú čoraz častejšie využívané to má za následok aj vývin a vylepšovanie metód spojených s ich prípravou [60].

Medzi metódy prípravy nanovláken patrí samospájanie, vyfukovanie a zvlákňovanie z taveniny, odstredivé zvlákňovanie a elektrospinning [60].

2.10.1 Príprava vláken pomocou forcespinningu

Nová metóda prípravy nanovláken využíva odstredivú silu na rozdiel od síl elektrických, ako je to v príprave pomocou elektrospinningu. Forcespinning využíva pre prípravu nanovláken kvapalné roztoky, či tuhé látky rozpustené v roztokoch alebo dokonca aj taveniny, ktoré sú splietané do vláken. Nastavením kľúčových parametrov ako rýchlosť otáčajúcej sa trysky či jej teploty alebo vzdialenosťou trysky od kolektora sa dokáže zabezpečiť dokonalá geometria a morfológia vznikajúcich vláken. Touto metódou sa zamedzuje vzniku bubliniek a rôzneho priemeru vláken [61].

V prvom kroku sa roztok polyméru zahrieva nad teplotu topenia. Následné je tento roztok privedený do zvlákňovacej trysky, ktorá obsahuje mnoho otvorov. Rýchlosť otáčania zvlákňovacej trysky môže dosahovať až 20 000 ot/min. Cez otvory v tryske sa roztok polyméru vyháňa pomocou odstredivej sily v podobe vláken na kolektor. V tejto technike, na rozdiel od elektrospinningu, tu nezohrávajú úlohu dielektrické vlastnosti roztoku či jeho vodivosť. To má za následok rozšírenie škály použiteľných materiálov. Medzi obľúbené materiály na zvlákňovanie patrí napríklad PA, PLA, PET, PTFE či celulóza [62,63].



Obr. 10 Schematické znázornenie forcespinningu, prevzaté a upravené z [62]

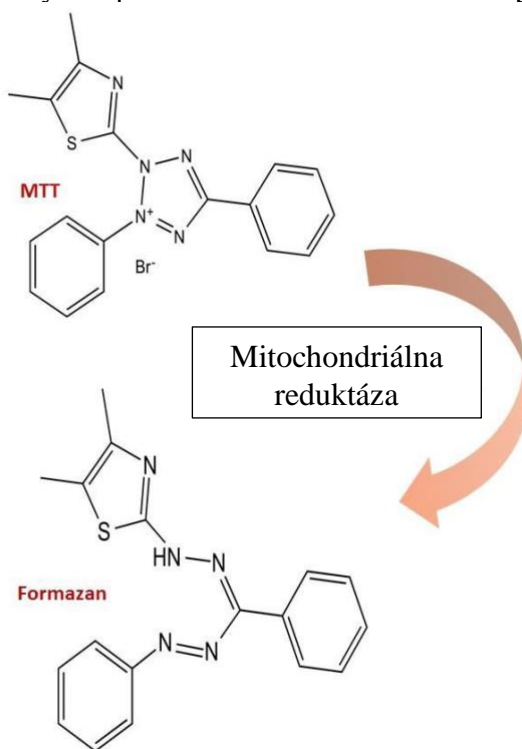
2.11 Testy cytotoxicity

V oblasti medicíny, biochémie, tkaninového inžinierstva či pri vývoji liekov sa s obľubou používajú systémy bunkových kultúr na testovanie ich cytotoxicity, pretože dokážu imitovať stav *in vivo* [63].

Metódy charakterizácie toxicity nanomateriálov *in vitro* sú štandardizované pomocou rôznych cicavčích bunkových štruktúr. Tieto testy cytotoxicity pozostávajú z priameho

kontaktu bunkových štruktúr s bunkami, kde sú pozorované bunkové zmeny pomocou rôznych mechanizmov, ako napríklad inkorporovanie farbív alebo dodanie inhibítorov na pozastavenie tvorby kolónii. Najviac používaným parametrom vyhodnotenia cytotoxicity a bunkovej viability je použitie vitálneho červeného farbiva, ktoré je vo vode rozpustné, prechádza bunkovými membránami a koncentruje sa v lyzozómoch, kde je udržiavané elektrostatickými väzbami v lyzozomálnom matrix. Mnoho látok ničí bunkové membrány a na základe zmeny intenzity odtieňa červeného farbiva je možné rozlišovať živé a mŕtve či poškodené bunky [64].

Najpopulárnejšia metóda využívajúca zmenu odtieňa farbiva je MTT test. Zavedený bol v roku 1983 Mosmannom, kde princípom metódy bolo počítanie životaschopných buniek. Tento princíp je založený na redukcii MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromidu) na fialové kryštály formazánu nerozpustné vo vodnom prostredí, kde sa kultivujú bunky. Redukčným činidlom je v tomto prípade bunková NAD(P)H oxidoreduktáza. Miera bunkovej metabolickej kapacity je podmienená schopnosťou redukcie farbiva a koreluje s počtom buniek. Enzýmy spôsobujúce redukciu farbiva sú prítomné hlavne v plazmatickej membráne, cytoplazme a sú spojené s oxidačnou fosforyláciou v mitochondriách. Pridaním SDS (dodecylsírany sodného) sa formazánové kryštály rozpustia v číry roztok, ktorý je potrebný na spektrofotometrické stanovenie [65,66].

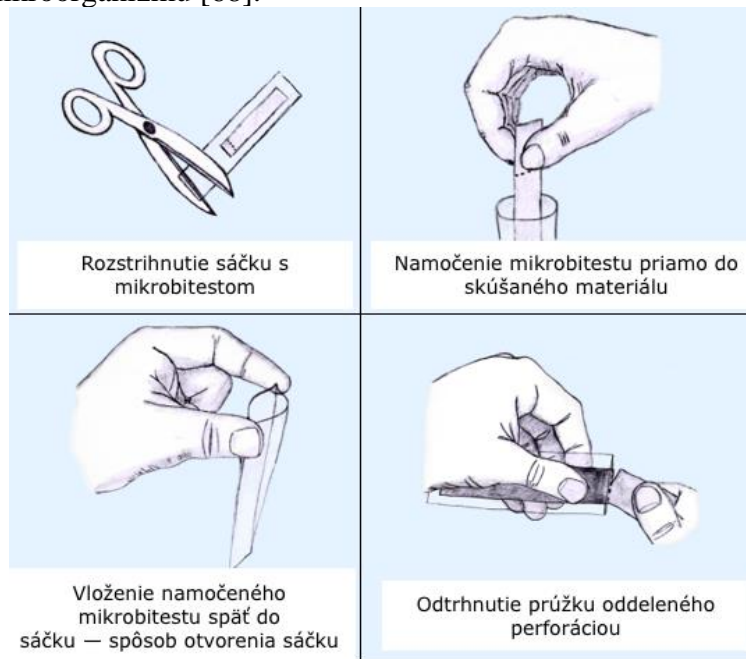


Obr. 11 Redukcia MTT na formazán, prevzaté a upravené z [67]

2.12 Mikrobiálne testy

V rôznych potravinárskych odvetviach je dôležité aby sa kontinuálne dodržiavala čistota, sanitácia a dodržiavanie technologických procesov. Mikrobiálne testy predstavujú skvelú možnosť ako tieto zásady dodržiavať. Okrem toho slúžia k jednoduchšej, pomerne lacnej a praktickej mikrobiologickej metóde určenia základných mikroorganizmov v potravinách pri mikrobiologických kontrolách. Ich jednoduchosť spočíva práve v tom, že orientačné mikrobiálne testy sú prúžky špeciálneho papiera obsahujúce optimálnu živnú pôdu na stanovenie mikroorganizmov. Jednoduchým namočením či priložením papierového prúžku do sledovaného materiálu a uzatvorením ho do priloženého PET sáčku, ktorý slúži ako kultivačné prostredie, je hotová celá kontrola. Po dodržaní všetkých doporučených postupov, ako aj

kultivačných podmienok je výsledok analýzy dostupný už do 12 hodín v závislosti na type stanovovaného mikroorganizmu [68].



Obr. 12 Postup práce s mikrobiteštami, prevzaté a upravené z [69]

Medzi hlavné výhody screeningových mikrobiálnych testov patrí hlavne nízka cena, možnosť viacerých rozborov v jednej kontrole, ďalej nižšia časová náročnosť a jednoduchosť oproti bežným mikrobiologickým kontrolám [68].

3 CIEĽ PRÁCE

Hlavný cieľ práce bolo otestovať vhodné štruktúry a aktívne zložky, ktoré mali byť využité pre prípravu UV filtrov. Aby bolo možné túto problematiku zvládnuť, boli vykonané nasledujúce čiastkové úlohy:

- Literárna rešerš, ktorá bola zameraná na prírodné UV filtre, ich využitie v kozmetickom priemysle a prípravu nanomateriálov
- Príprava nanočastíc a nanovlákien na báze PHA ako nosičov UV filtrov
- Funkcionalizácia nosičov vybranými rastlinnými extraktmi a stanovenie ich stability
- Stanovenie SPF vybraných extraktov a pripravených štruktúr obsahujúce extrakty
- Stanovenie biologických účinkov a nezávadnosti pripravených štruktúr

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité materiály ako vzorky

- Čerstvo pražená káva UGANDA ROBUSTA, zem pôvodu Uganda
- Pražená káva 100% Arabica MOTMOT, zem pôvodu Brazília
- Káva KOFIKOFI, zmes pražených zŕn 50% Arabica, 50% Robusta, zem pôvodu Arabica – Južná Amerika, zem pôvodu Robusta – Vietnam

4.2 Použité chemikálie

- Follin–Ciocalteau činidlo – p.a., LachNer (ČR)
- Uhličitan sodný – p.a., LachNer (ČR)
- Kyselina gallová – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Etanol – p.a., LachNer (ČR)
- Hexan – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- ABTS (2,2–azino–bis(3–ethylbenzothiazoline–6–sulfuric acid) diammonium salt) – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Peroxodisíran draselný – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Trolox – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Chloroform – VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- L– α –Phosphatidylcholine – for microbiology, Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Cholesterol – Sigma–Aldrich (Nemecko)
- Polyhydroxybutyrát – HYDAL 7–12/4, FCH VUT v Brne (ČR)
- Hexahydrát chloridu železitého – p.a., LachNer (ČR)
- Milcom Mikrobiteš (ČR)
 - Mikrobiteš CA-1 pre stanovenie koliformných baktérií
 - Mikrobiteš K1 pre stanovenie kvasiniek
 - Mikrobiteš P1 pre stanovenie plesní
 - Mikrobiteš PRPM1 pre stanovenie všetkých redukujúcich mikróbov
- DMEM with High Glucose, with 4.0 mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate – BioTech (CZ)
- Dodecylsírán sodný, Serva (Nemecko)
- MTT – Duchefa Biochemie (NL)
- Trypsin – Versene EDTA, P–Lab (CZ)
- FBS fetálne bovinné sérum – HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Antibiotic-Antomycotic 100X(Biosera), Biotech (Nemecko)

4.3 Použité prístroje

- Electric Coffee Grinder SCG 1050BK, SENCOR
- Vortex, Vitrum, Heidolph Reax top (Nemecko)
- Centrifúga Boeco U–32R, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Mikro 120 Centrifuge, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Centrifuge Z36HK, LaborTechnik HERMLE (Nemecko)
- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandeline (Nemecko)
- Rotačná vákuová odparka RV–ML, IKA Werke (Nemecko)
- Pumpa New Era Pump Systems model NE–300, SpringePump (USA)
- Koloidný DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)

- IMPLLEN Nanophotometer UV-VIS (Nemecko)
- SOXTHERM® C. Gerhardt GmbH & Co. KG Analytical systems (Nemecko)
- Rotačný zvláknovací prístroj (prototyp)
- CellCulture CO2 Inkubátor, ESCO (Nemecko)
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L–Scientific, Laboserv (ČR)
- Biohazard box, model Airstream, trieda II, ESCO (Nemecko)

4.4 Použité bunkové kultúry

- HaCaT cell line, Human Keratinocyte cell line, Cell Line Service (Nemecko)

4.5 Príprava extraktov kávy

V prípade vzoriek káv Arabica a Robusta boli najprv rozomleté zrná v mlynčeku na kávu, zaliate horúcou vodou a extrahované pomocou frenchpressu. Tento vodný extrakt nebol používaný na prípravu olejových extraktov. Kávové usadeniny z prvotnej vodnej extrakcie boli po vysušení použité na druhú, hexanovú extrakciu. V prípade kávy KOFIKOFI bol materiál (kávové usadeniny) odobraný od predajcov kávy KOFIKOFI, ako odpadný materiál po príprave kávového nápoja z pákového kávovaru, ktorý bol následne po vysušení použitý na hexanovú extrakciu.

4.5.1 Extrakcia podľa Soxhleta

Vysušené kávové usadeniny všetkých druhov káv boli pripravené na extrakciu nasledovne. Bolo navážených 10 g kávových usadenín do extrakčných patrón. Pre každý druh kávy sa navážilo do dvoch patrón po 10 g kávových usadenín. Následne takto pripravená patróna s materiálom bola utesnená vatou a zaliata 100 ml hexanu ako extrakčného činidla. Pomocou prístroja Soxtherm® bola spustená extrakcia kávových usadenín. Doba celej extrakcie trvala 3 hodiny a 4 minúty pri 170 °C. Po skončení extrakcie boli patróny ešte ponechané cca 20 minút v prístroji na ochladenie. Po vybratí z extrakčnej aparatúry boli patróny s materiálom vybrané zo sklenených nádob. Zo sklenených nádob vždy označených ako A a B, boli extrakty preliate do predom pripravených, čistých a zvážených baniek s guľatým dnom. Takto premiestnený materiál bol pripravený na odparenie hexánu z extraktu na rotačnej vákuovej odparke. Po odparení hexánu boli banky opäť zvážené a výsledný materiál bol odpipetovaný do čistých vialiek, následne utesnených parafilmom, umiestnených do mraziaku a skladovaných pri teplote –20 °C k ďalšiemu použitiu.



Obr. 13 Prebiehajúca extrakcia v hexane na prístroji Soxtherm

4.5.2 Maceráty

Počas práce bolo hlavným cieľom extrahovať kávové oleje extrakciou podľa Soxhleta, kde ako extrakčné činidlo bol použitý hexán. Ako vedľajšiu úlohu pre porovnanie aj iných metód extrakcie sme zaradili macerovanie. Maceráty sú extrakty, v našom prípade oleje, do ktorých sa uvoľňovali účinné látky z kávových usadenín. Doba macerácie trvala 60 dní, kedy bolo navážených 10 g kávových usadenín do plastových nádob, ku ktorým bolo pridaného 10 ml oleja. Následne boli nádoby uzatvorené, obsah v nich premiešaný a ponechaný stáť na tmavom mieste po dobu 60 dní, počas ktorých sa obsah nádob pravidelne premiešaval.

Použité boli tri druhy olejov, a to parafínový olej, rastlinný slnečnicový olej a olej sójový. Kávové usadeniny boli použité rovnaké, ako v celej práci, teda kávové usadeniny Arabica, Robusta a KOFIKOFI.

Po 60-tich dňoch boli odobrané vzorky olejov, v ktorých bolo sledované ich SPF. Postup práce v stanovovaní SPF je popísaný v bode 4.7.1.

4.6 Všeobecná charakteristika kávových extraktov

Aby bolo možné charakterizovať prírodné látky vo vzorkách, bolo potrebné stanoviť koncentráciu fenolických látok a antioxidačnú aktivitu. Toto stanovenie bolo vykonané spektrofotometricky.

4.6.1 Stanovenie fenolických látok

Pri stanovovaní celkových fenolických látok, resp. ich koncentrácie vo vzorke, je potrebné pripraviť kalibračnú radu a vyhotoviť tak kalibračnú rovnicu, podľa ktorej je možné vypočítať koncentráciu u danej vzorky. Kalibračná rada bola zhotovená v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 0,7 mg/ml, kde ako kalibračný štandard slúžila kyselina gallová. Meraný roztok pozostával z Folin-Ciocalteauovho činidla, ktorý bol zriedený vodou v pomere 1 : 9. 1 ml takto zriedeného činidla bol zmiešaný s 50 µl vzorky a použitím vortexu priemešaný. Po 5 minútach bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Roztok bol opäť priemešaný pomocou vortexu a ponechaný 15 minút stáť. Potom bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 750 nm. Výsledná kalibračná rovnica znázornená v Rovnica 4 slúžila na stanovenie koncentrácie fenolických látok vo vzorkách [70]. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

$$\begin{aligned} A &= 1,7842 \cdot c \\ R^2 &= 0,962 \end{aligned} \quad (4)$$

Rovnica 4 Kalibračná rovnica pre polyfenoly

4.6.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity

ABTS bolo potrebné rozpustiť na koncentráciu $c = 7$ mmol/l v destilovanej vode. Radikálový anión ABTS bol pripravený reakciou s 2,45 mmol/l peroxidom draselným. Roztok bolo potrebné nechať stáť minimálne 12 hodín na tmavom mieste pri laboratórnej teplote. Aby bolo možné pracovať s ABTS, bolo nutné ho najprv zriediť etanolom na absorbanciu $A = 0,700$ s toleranciou $\pm 0,050$ nm pri vlnovej dĺžke 734 nm oproti etanolu [71]. Do zúženej kyvety bol napipetovaný objem 1 ml roztoku ABTS, následne bol napipetovaný 10 µl extraktu. Celý obsah bol rýchlo priemešaný a sledoval sa pokles absorbancie ihneď po priemešaní a potom presne v 10. minúte. Ako blank bol použitý roztok 1 ml ABTS spolu s 10 µl destilovanej vody. Ako kalibračný roztok slúžil roztok Troloxu v koncentračnej rade 50 – 400 µg/ml. Antioxidačná aktivita bola následne vypočítaná pomocou kalibračnej rovnice antioxidačnej aktivity znázornenej v

Rovnica 5. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

$$A = 1,0994 \cdot c \quad (5)$$

$$R^2 = 0,9958$$

Rovnica 5 Kalibračná rovnica antioxidačnej aktivity

4.7 Meranie UV spektra pomocou nanofotometra

Pomocou nanofotometra bolo premerané absorbočné spektrum extraktov v rozsahu od 200 do 800 nm. V prípade samotných olejových extraktov bolo z každého z nich odobrané určité množstvo tak, aby sa po zriedení etanolom dostalo koncentrácie 200 µg/ml [23]. Meralo sa oproti blanku, ktorý tvoril etanol.

4.7.1 Výpočet SPF

Pri výpočte SPF sa pracovalo s rovnicou podľa Mansura, uvedenú v Rovnica 2 [23]. Ako bolo spomenuté, vzorky extraktov boli pripravené riedením v etanole na koncentráciu 200 µg/ml. Následne bolo premerané absorpčné spektrum od 200 do 800 nm, z ktorého sa vybrali absorbancie pre vlnové dĺžky v rozsahu od 290 do 320 nm s krokom 5 nm. Suma týchto hodnôt bola použitá pri výpočte celkového SPF jednotlivých extraktov [23]. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ±SD).

4.8 Príprava nanočastíc metódou sonikácie

Počas celého experimentu sa pracovalo s dvoma typmi nanočastíc. Prvé pozostávali z lecitínu a cholesterolu vo vode, druhé boli obohatené o polyhydroxybutyrát (ďalej už len PHB). Jednotlivé navážky a postup prípravy je prehľadne zobrazený v Tabuľka 5. Aby mohol byť použitý PHB, najprv bolo potrebné si pripraviť 4 % zásobný roztok. Ten bol pripravený rozpusteným potrebnej navážky PHB v chloroforme. V prípade lipozómov obohatených o 30 mg PHB toto množstvo odpovedalo 0,75 ml zásobného roztoku PHB v chloroforme.

V prvom type častíc bol pri príprave najprv vždy navážený cholesterol a lecitín. Po premiestení do kadičky sa pridalo odpovedajúce množstvo vody, jemne sa premiešalo a roztok bol pripravený na sonikáciu.

V druhom type častíc, sa do skúmaviek typu Eppendorf navážilo potrebné množstvo lecitínu a cholesterolu. Pridalo sa odpovedajúce množstvo roztoku PHB a celý obsah v skúmavke bolo potrebné poriadne premiešať do vzniku číreho roztoku. Takto pripravený roztok bol priliaty do kadičky, v ktorej bola predom pripravená destilovaná voda o danom objeme. Roztok bol pripravený na sonikáciu.

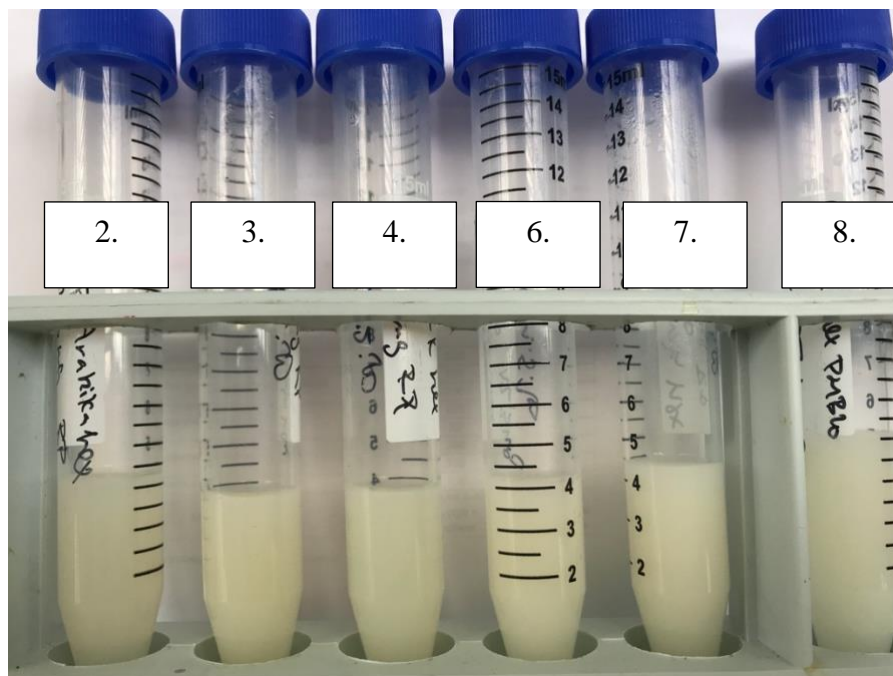
Sonikácia prebiehala pod tyčovým ultrazvukom pri intenzite 50 % za súčasného chladenia vo vodnom kúpeli. Pri druhom type častíc sa po sonikácii kadička s roztokom umiestnila do digestória na magnetickú miešačku s ohrevom na 50 °C za stáleho miešania, aby bol odparený chloroform z roztoku.

Tabuľka 5 Prehľad navážiek jednotlivých chemikálií pri príprave nanočastíc

Príprava nanočastíc – lipozómov			
	<i>I.typ</i>	<i>II.typ</i>	Sonikácia 4x15 sekúnd
Cholesterol	10 mg	10 mg	
Lecitín	90 mg	60 mg	
PHB	—	30 mg	
Destilovaná voda	10 ml	10 ml	

4.8.1 Príprava nanočastíc s hexanovými extraktami metódou sonikácie

Postup prípravy nanočastíc s obsahom olejových extraktov sa zhodoval s postupom prípravy v bode 4.8, kde sa ešte ku každému typu nanočastíc pridalo množstvo 100 μ l každého typu olejového extraktu. Okrem 100 μ l prídavku extraktu bol použitý aj prídavok 10 μ l extraktu pre optimalizáciu prípravy častíc s extraktami. Celkovo tak spolu vznikla rada 8 vzoriek, ktorá je prehľadne zobrazená v Tabuľka 6.



Obr. 14 Pripravené častice s obsahom extraktov (2. – 4.), častice s obsahom PHB a extraktov (6. – 8.)

Tabuľka 6 Rada vzoriek pripravených metódou sonikácie

Vzorka č.	Obsah	Vzorka č.	Obsah
1.	I. typ – prázdne častice	5.	II. typ – prázdne častice + PHB
2.	I. typ + 100 μ l extraktu A	6.	II. typ + 100 μ l extraktu A
3.	I. typ + 100 μ l extraktu B	7.	II. typ + 100 μ l extraktu B
4.	I. typ + 100 μ l extraktu C	8.	II. typ + 100 μ l extraktu C

Tabuľka 7 Poznámka k Tabuľka 6

Extrakt	Olejový extrakt z kávy
A	Arabica
B	KOFIKOFI
C	Robusta

4.9 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nanočastíc

Do skúmaviek typu Eppendorf bol pipetovaný 1 ml z každého druhu pripravených častíc. Tie boli odstredované najprv 5 minút pri 6 000 rpm, po odstredení bolo zo skúmavky opatrne odobraných 100 µl supernatantu. Potom pokračovalo odstredenie častíc po dobu 60 minút pri 14 500 rpm. Supernatanty boli prepipetované do čistých skúmaviek typu Eppendorf a boli použité k premeraniu a následnému stanoveniu fenolických látok v supernatante. Enkapsulačná účinnosť v percentách bola vypočítaná ako podiel enkapsulovaných fenolických látok k celkovému množstvu fenolických látok stanovených v samostatných olejových extraktoch. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

4.10 Stanovenie veľkosti nanočastíc pomocou DLS

Odobrané množstvo supernatantov po 5 minútovom odstredení popísané v bode 4.9 bolo v skúmavkách typu Eppendorf nariadené 100-krát destilovanou vodou. V sklenenej kyvete pre UV-VIS boli lipozmové častice premerané na prístroji Zetasizer nanoZS. Meraná bola priemerná veľkosť častíc zároveň s distribúciou veľkosti častíc.

Ďalšia veľkosť častíc bola zameraná aj vo vzorkách, v ktorých po 60 minútovom odstredení pri 14 500 rpm a odobratí supernatantov ostali odstredené sedimenty. Sedimenty boli rozsuspendované 1 ml destilovanej vody, nariadené 100-krát a opäť zameraná distribúcia a priemerná veľkosť častíc. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

4.11 Stanovenie stability častíc pomocou zetapotenciálu

Vzorky pripravené 5 minútovým odstredením a 100 násobným zriedením spolu so vzorkami ktoré vznikli rozsuspendovaním sedimentov v destilovanej vode a tiež stonásobným zriedením boli podrobené stabilnému meraniu. Do kyvety so vzorkom bol umiestnený elektródový nástavec. Ďalej sa so vzorkami pracovalo ako pri meraní veľkostí častíc na prístroji Zetasizer nanoZS. Meraný bol však zeta potenciál, kde na základe získaných hodnôt bolo možné odvodiť stabilitu jednotlivých pripravených častíc. Ideálna hodnota pre stabilné častice sa pohybuje mimo rozmedzia - 30 až + 30 mV. Čím vyššia bola hodnota zeta potenciálu od tohto intervalu, tým sa považovali pripravené lipozómálne častice za stabilnejšie. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

4.11.1 Štúdium krátkodobej a dlhodobej stability častíc

Krátkodobá stabilita bola sledovaná u všetkých typov vzoriek v časovom úseku siedmych dní. Merali sa vzorky v prvom dni prípravy, po troch dňoch a po týždni. Krátkodobá stabilita bola vypočítaná na základe množstva uvoľnených fenolických látok. Dlhodobá stabilita bola stanovená po 60-tich dňoch prípravy, rovnakým spôsobom ako pri stabilite krátkodobej. Príprava vzorky spočívala v 60 minútovom odstredení pri 14 500 rpm, 1 ml roztoku častíc, z ktorého bol odobraný supernatant a sediment bol rozsuspendovaný destilovanou vodou. Množstvo uvoľnených fenolických látok v odobranom supernatante bolo stanovené podľa bodu 4.6.1.

4.12 Príprava PHB nanovláken

Na prípravu nanovláken je potrebná príprava 4 % zásobného roztoku PHB. Zásobný roztok sa pripravuje rozpustením odpovedajúcej navážky PHB v chloroforme na magnetickej miešačke do úplného rozpustenia PHB.

4.12.1 Príprava nanovláken pomocou metódy forcespinning

Pri vytváraní vláken pomocou forcespinningu sa zásobný roztok PHB pomaly prikapával zhora do stredu terčíku. Extrakty boli pridané priamo do roztoku PHB rozpustenom v chloroforme v 10%-nom prídavku. Po vytvorení vláken na tyčiach prístroja, boli vlákna opatrne odobrané

z ich plôch. Nanovlákná vytvorené touto metódou pripomínajú veľmi jemnú tkaninu, štruktúrovo pripomínajúv vatú.

4.13 Testy mikrobiálnej aktivity

Mikrobitesty predstavujú jednoduchú a praktickú mikrobiologickú metódu k určaniu základných skupín mikroorganizmov pri screeningových mikrobiologických kontrolách napríklad v potravinárskom priemysle. Mikrobitesty sú prúžky špeciálneho papiera, ktoré sú napustené vhodnou živnou pôdou obohatené prídavkami indikátorov a selektívnych činidiel s určitou nasávaciou schopnosťou. Prúžky mikrobitestu sú uložené v polyetylénových sáčkoch, ktoré slúžia ako kultivačné prostredie. Po namočení vo vzorkách sa uchovávajú v termostatoch pri doporučených optimálnych teplotách, ktoré závisia od druhu určovaných skupín.

Príprava vzoriek na určenie mikrobiálnej aktivity prebiehala v sterilných podmienkach podľa návodu určeného výrobcom. Kontrole boli podrobené kávové sedimenty troch druhov káv, ktoré sa nechali sušiť na voľnom vzduchu pri laboratórnej teplote. Materiály boli ponechané schnúť po dobu jedného týždňa, pričom sa pravidelne kontrolovala ich miera usušenia. Po úplnom vysušení materiálu boli vykonané mikrobiálne testy.

Po úplnom vysušení kávových usadenín boli tieto vzorky podrobené štyrom typom mikrobiálnej kontroly, a to kontrolou na plesne, kvasinky, koliformné baktérie a všetky redukujúce mikroorganizmy.

4.13.1 Testy mikrobiálnej aktivity na koliformné baktérie

MIKROBITEST CA je určený na kontrolu koliformných baktérii. Postup spočíval v expozícii prúžku s materiálom po dobu 30 sekúnd, kedy bol prúžok úplne nasiaknutý. Po expozícii bol test opäť umiestnený do polyetylénového sáčku, uzavretý a umiestnený do termostatu s teplotou nastavenou na 37 °C po dobu 16 hodín. Pozitívny výsledok je určený ostro ohraničenými kolóniami červených bodiek.

4.13.2 Testy mikrobiálnej aktivity na kvasinky

V prípade MIKROBITEST K, určenom na kontrolu kvasiniek bol postup použitia nasledovný. Doba expozície prúžku s materiálom trvala 1 minútu. Polyetylénový sáčok s testom bol umiestnený do termostatu vyhriatom na 30 °C na 4 dni. Pozitívny výsledok testu zobrazuje kolónie kontrastujúce so zelenkavým podkladom testu.

4.13.3 Testy mikrobiálnej aktivity na plesne

MIKROBITEST P je určený na kontrolu prítomnosti plesní. Vzorka bola podrobená kontrole postupom doporučeným dodávateľom testov. V prípade kontroly na plesne, doba expozície testovacieho prúžku s materiálom trvala 5 sekúnd, po expozícii bol polyetylénový sáčok s testom uzavretý a umiestnený do termostatu nastaveného na 25 °C po dobu 5 dní. V prípade pozitívneho výsledku sa na testovacom prúžku s materiálom objavujú kolónie, ktoré dobre kontrastujú s prúžkom a rastú v prírodných farbách.

4.13.4 Testy mikrobiálnej aktivity na všetky redukujúce mikroorganizmy

Posledným testom na kontrolu prítomnosti všetkých redukujúcich mikroorganizmov bol MIKROBITEST PRPM. Doba expozície prúžku s materiálom trvala 1 minútu. Do termostatu s nastavenou teplotou na 37 °C, bol testovací prúžok v sáčku umiestnený po dobu 24 hodín. Pozitívny výsledok zobrazuje ostro ohraničené červené bodky na prúžku.

4.14 Testy cytotoxicity materiálov pomocou MTT testov

4.14.1 Kultivácia keratinocytov

Kultivácia keratinocytov HaCaT prebiehala v kultivačných nádobách v kultivačnom médiu (DMEM with High Glucose, with 4.0 mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate). Nádoby boli uchovávané v kultivačnom termostate pri teplote 37 °C s 5% obsahom CO₂. V priebehu výmeny média, ktoré bolo skladované v chladničke pri teplote 4 °C, bolo nutné médium najskôr ohriať, aby nedošlo k teplotnému šoku buniek. Pred samotnou výmenou média bol pod inverzným mikroskopom skontrolovaný stav buniek, ich príľnavosť ku dnu nádoby, a tiež prítomnosť kontaminácie. Do kultivačnej nádoby bolo pipetovaných 5 ml kultivačného média, pričom výmena média prebiehala za sterilných podmienok.

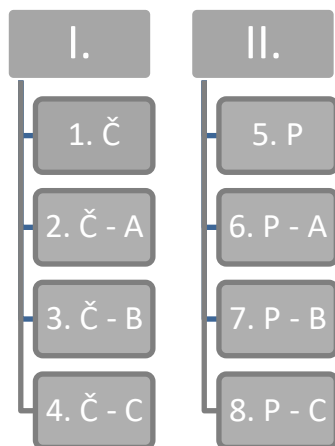
4.14.2 MTT test

Cytotoxicita vybraných druhov častíc a vlákien bola študovaná na ľudských keratinocytoch, nakoľko pripravené nanomateriály majú potenciálne využitie v kozmetike ako UV filtre. Koncentrácie častíc, ktoré boli pre test vybrané, sa pohybovali v rozmedzí 2 – 14 %. Najskôr bolo do jamiek v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky napipetovaných 100 µl bunkovej kultúry a bola ponechaná rásť v termostate po dobu 24 hodín v kultivačnom médiu. Testované častice boli zriedené 1:1 sterilnou vodou, prefiltrované cez sterilný filter (200 nm) a kultivačným médiom zriedené na požadovanú koncentráciu. Z takto pripravených vzoriek bolo do každej jamky pridaných 100 µl. Ako kontrola bolo použité kultivačné médium a ako negatívna kontrola bol použitý etanol. Po 24 hodinách bolo do každej jamky pridaných 20 µl MTT, ktoré bolo rozpustené v PBS na koncentráciu 2,5 mg/ml a sterilizované mikrofiltráciou. Doštičky boli kultivované po dobu 3 hodín. Po uplynutí doby bolo do každej jamky pridaných 100 µl 10 % SDS rozpusteného v PBS z dôvodu zvýšenia rozpustnosti tmavo fialových kryštálikov formazanu. Doštičky boli skladované v tme po dobu 24 hodín. Cytotoxicita bola vyhodnotená spektrofotometricky na ELISA Readeri pri vlnovej dĺžke 562 nm. Pre vyhodnotenie cytotoxicity boli hodnoty absorbancií porovnávané s hodnotami absorbancie blanku (kultivačné médium). Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty z troch meraní (priemer ± SD).

Pre stanovenie cytotoxicity vlákien bola použitá 24-jamková doštička. Testované vlákna boli zväžené, uchovávané v skúmavkách typu Eppendorf a sterilizované UV žiarením v laminárnom boxe po dobu 20 minút.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas všetkých experimentov sa pracovalo s tromi typmi olejových extraktov (A, B, C) a s dvoma druhmi častíc (I., II.), popísaných v kapitole 4.8. Kvôli prehľadnosti sú tieto skratky uvedené v Tabuľka 8. Pripravovalo sa vždy 8 druhov častíc, kde označenie od 1 do 4 popisuje lipozómy čisté, teda skratka Č, do ktorých sa pridávali ešte hexanové extrakty. Skratka A značí hexanový extrakt z kávy Arabica, pri skratke B ide o hexanový extrakt kávy KOFIKOFI a skratka C označuje hexanové extrakty kávy Robusta. Označenie od 5 do 8 patrí lipozómom, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú PHB, označenie P.



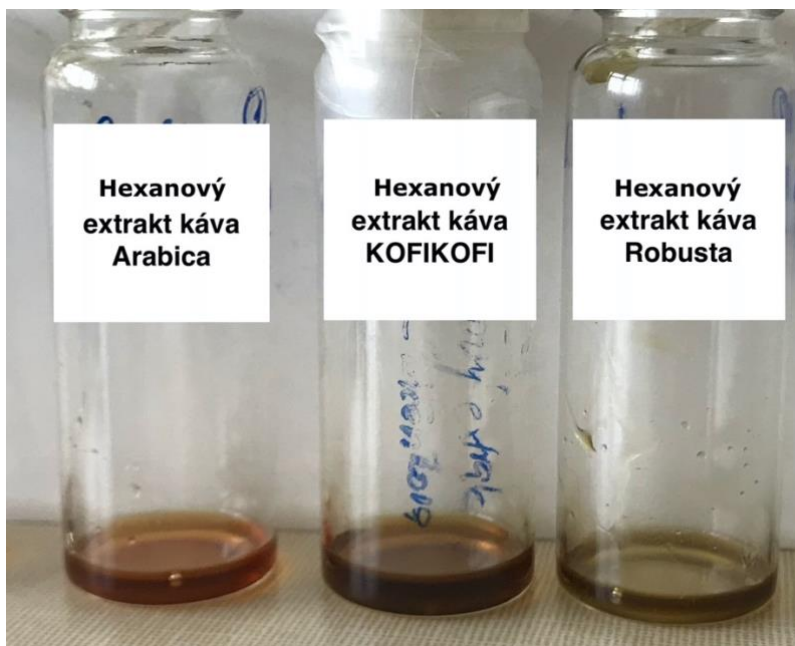
Tabuľka 8 Skratky pre častice a hexanové extrakty

5.1 Všeobecná charakteristika extraktov

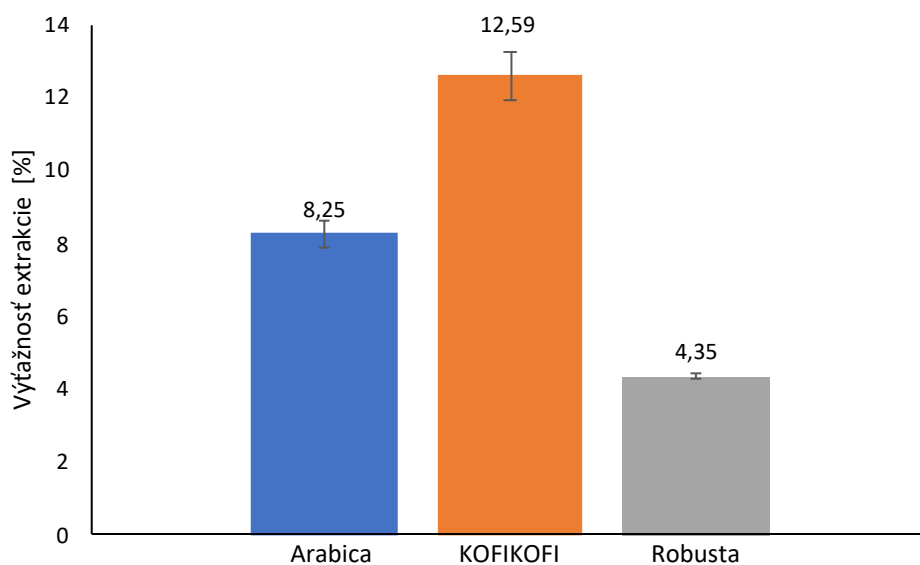
Počas celého experimentu sa pripravovali hexánové extrakty. Jednalo sa o extrakcie podľa Soxhleta pomocou plne automatizovaného extrakčného prístroja Soxtherm®. Postup práce je popísaný v kapitole 4.5.1. Pripravené hexánové extrakty boli podrobené meraniam výťažnosti extrakcie jednotlivých druhov olejov (hexánový extrakt), meraniam na stanovenie celkového obsahu fenolických látok a antioxidačnej aktivity. Spolu s touto charakterizáciou sa sledovalo aj SPF pripravených extraktov.

5.1.1 Výťažnosť hexanových extraktov

Výťažnosť extrahovaných kávových olejov z extrakcie podľa Soxhleta bola stanovená ako percento hmotnosti extraktu k pôvodnej navážke danej vzorky kávovej usadeniny. Najvyššie percento výťažku dosiahol olejový extrakt typu kávy KOFIKOFI, ktorého hodnota činila 12,59 %, o niečo nižšiu výťažnosť mal hexanový extrakt z kávy Arabica a najnižšiu výťažnosť vykazoval olejový extrakt z Robusty, ktorého hodnota činila 4,35 % z celkovej pôvodnej navážky. Na Obr. 15 sú na ukážku zobrazené pripravené hexánové extrakty.



Obr. 15 Pripravené hexánové extrakty rôznych druhov kávy



Obr. 16 Výťažnosť extrakcie podľa Soxhleta v %

5.1.2 Obsah fenolických látok v extraktoch

Tabuľka 9 zobrazuje stanovený obsah fenolických látok v jednotlivých extraktoch. Najvyššiu hodnotu fenolických látok mal hexánový extrakt, olej kávy Arabica. Výsledok potvrdil naše očakávania počas práce, pretože káva Arabica je známa svojim vysokým obsahom účinných látok, ktoré boli potvrdené aj našim meraním. Naopak najnižšiu hodnotu sme zaznamenali pri káve Robusta. Už pri samotnom začiatku prípravy kávového nápoja a následného sušenia kávových usadenín bolo zrejme, že tento druh kávy v sebe nesie o niečo menej účinných látok. Napovedala tomu intenzita arómy nápoja aj sfarbenie kávových usadenín. Zmes kávy Arabica a Robusta, káva KOFIKOFI, bola svojim obsahom fenolických látok $311,811 \pm 1,554$ mg/g približne v strede medzi hodnotami ostatných vzoriek, čo

korešponduje aj s percentuálnym zložením kávových zŕn, a teda 50%-ným obsahom kávových zŕn každého druhu kávy v zmesi KOFIKOFI..

Tabuľka 9 Celkový obsah fenolických látok v hexánových extraktoch.

Extrakt	Arabica	KOFIKOFI	Robusta
Fenolické látky [mg/g]	341,398 ± 1,611	311,811 ± 1,554	239,831 ± 1,017

5.1.3 Antioxidačná aktivita extraktov

Postup práce pri meraní antioxidačnej aktivity hexánových extraktov je uvedený v bode 4.6.2. Z nameraných hodnôt je patrné, že vysokú antioxidačnú aktivitu mal hexanový extrakt z kávy Arabica. Je všeobecne známe, že káva Arabica patrí medzi najkvalitnejšiu odrodu kávovníka a má bohatý obsah účinných látok, medzi ktoré patria aj antioxidanty. Káva KOFIKOFI bola zmes Arabicy a Robusty, hodnota jej antioxidačnej aktivity však bola o niečo vyššia ako pri káve Arabica, rozdiel ale nie je štatisticky významný. Kávové usadeniny, z ktorých bol extrakt pripravený, však prešiel inou úpravou ako ostatné dva druhy kávových zŕn. Jeho príprava spočívala v jemnejšom namletí zŕn a kávový nápoj bol pripravený pákovým kávovarom. Ostatné dva druhy boli pripravované metódou frenchpress z hrubšie namletých zŕn, čo môže byť ďalším dôvodom, prečo je hodnota obsahu antioxidantov o niečo nižšia. Namerané hodnoty prehľadne zobrazuje Tabuľka 10.

Tabuľka 10 Hodnoty antioxidačnej aktivity hexánových extraktov

Extrakt	Arabica	KOFIKOFI	Robusta
Antioxidačná aktivita [mg/g]	1,692 ± 0,099	1,766 ± 0,377	1,148 ± 0,249

5.1.4 Stanovenie SPF hexánových extraktov

Bolo premerané SPF olejových extraktov podľa postupu uvedeného v bode 4.7.1. Tabuľka 11 zobrazuje vypočítané hodnoty SPF pripravených hexánových extraktov. Hodnoty SPF boli vypočítané podľa Mansurovej rovnice uvedenej v Rovnica 2 Mansurova rovnica Najvyššiu hodnotu SPF dosiahol hexanový extrakt kávy Arabica, a to 2,010 ± 0,027.

Tieto nízke hodnoty však nevychádzajú z nedostatočnej kvality použitého materiálu. Je pravdepodobné, že použitý materiál – kávové usadeniny z už použitej kávy väčšinu svojich aktívnych látok odovzdal do pripraveného kávového nápoja a tak by výsledné hodnoty korešpondovali s nízkou nameranou hodnotou aktívnych látok.

Ďalšou možnosťou nízkeho SPF je aj fakt, že použité extrakčné činidlo, hexan, nebolo vhodným činidlom pre extrakciu UV-absorbujúcich látok fenolického typu, ktoré sú lepšie rozpustné v polárnych rozpúšťadlách. Pri extrakci hexánom pravdepodobne nedošlo k úplnému extrahovaniu účinných látok, čo takisto mohlo zapríčiniť nízke hodnoty SPF.

Kávové usadeniny po extrakci boli ešte stále zafarbené, čo naznačuje, že nejaké látky v usadeninách boli stále prítomné, dá sa teda predpokladať potenciálny vyšší výťažok. Vyriešiť by to mohla viacnásobná extrakcia.

Tabuľka 11 Stanovené hodnoty SPF jednotlivých hexánových extraktov

Extrakt	Arabica	KOFIKOFI	Robusta
SPF	2,010 ± 0,027	0,570 ± 0,008	0,179 ± 0,002

5.2 Príprava vlákien

V rámci práce boli pripravené nanovlákná pomocou metódy forcespinning. Postup prípravy nanovláken je popísaný v bode 4.12.1. Tieto vlákna boli obohatené prídavkom oleja z kávy Arabica. Pri takto pripravených vláknach bol sledovaný vplyv na viabilitu línie ľudských keratinocytov HaCaT.

5.3 Príprava častíc

V rámci celej práce sa pracovalo s dvoha druhmi častíc. Prvým druhom boli lipozómy a druhým boli lipozómy obohatené o PHB. Postup ich prípravy bol okomentovaný v bode 4.8 a 4.8.1. Kontrolné častice sa pripravovali aj samostatne, bez účinných látok (vzorky 1 a 5), a teda bez prídavku hexánových extraktov. Spolu bolo pripravených 8 typov častíc. Stanovované v nich boli SPF, enkapsulačná účinnosť a antioxidačná aktivita. Medzi najhlavnejšiu časť však bolo považované stanovenie SPF častíc.

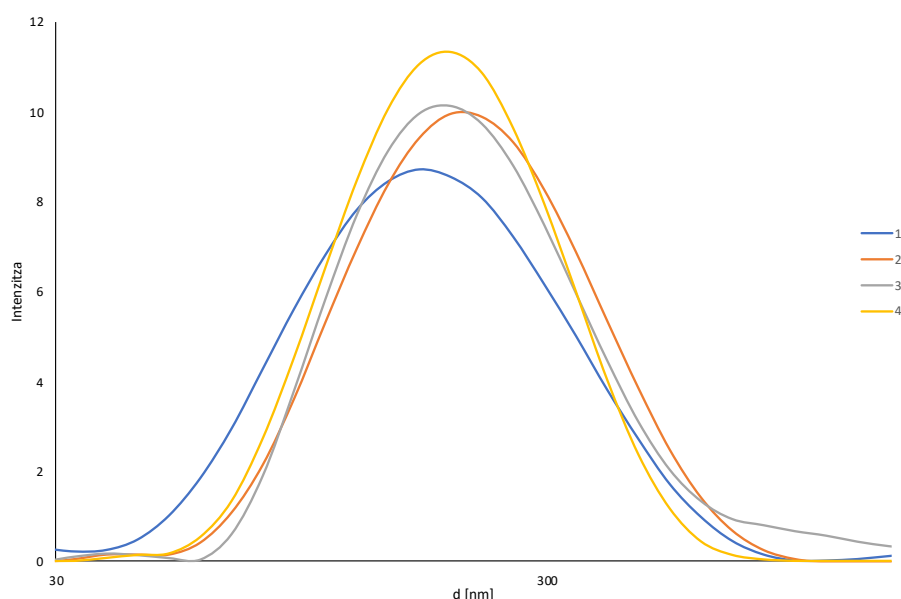
5.3.1 Veľkosť a stabilita častíc

Na prístroji Zetasizer ZS bola na princípe DLS stanovená veľkosť častíc spolu s polydisperzným indexom (Pdl). Stabilita častíc bola stanovená taktiež pomocou prístroja Zetasizer ZS na základe zeta potenciálu. Postup práce bol uvedený v bode 4.10 a 4.11. Stanovovaná veľkosť a stabilita častíc bola sledovaná pri dvoch typoch vzoriek. V prvom prípade sa sledovala veľkosť a stabilita častíc, ktoré boli odstredené po dobu 5 minút pri 6 000 rpm. Takto sa oddelili veľké častice od menších, ktoré ostali v supernatante a mohli byť podrobené veľkostnému a stabilitnému meraniu. Zároveň sa podrobili meraniu častice, ktoré boli odstreďované 60 minút pri 14 500 rpm. Týmto spôsobom sa dosiahlo oddelenia neenkapsulovaného extraktu, ktorý ostal v supernatante. V sedimente sa teda nachádzali takmer všetky častice a ich rozsuspendovaním a podrobením analýze sa zistila ich veľkosť, distribúcia a stabilita pri opätovnom styku s vodným prostredím. Tabuľka 12 a Tabuľka 13 zaznamenáva hodnoty zeta potenciálu, veľkosti a polydisperzného indexu v prvý deň a v siedmy deň od prípravy.

Najmenšia hodnota veľkosti častíc odstredených po dobu 5 minút bola $154,4 \pm 3,7$ nm a patrila lipozómom čistým, bez pridaných účinných látok, v prvom dni od prípravy. Najvyššia hodnota bola stanovená na $541,8 \pm 18,0$ nm pri lipozómoch obsahujúcich PHB, bez pridaných účinných látok, v siedmom dni od prípravy. Vo všeobecnosti je možné konštatovať, že nízke veľkosti častíc boli stanovené pri lipozómoch, ktoré neobsahovali PHB, v porovnaní s lipozómami, ktoré PHB vo svojej štruktúre mali. Je to z toho dôvodu, že PHB sa inkorporuje do fosfolipidovej dvojvrstvy [72], tým vzrastie veľkosť častíc a súčasne sú častice stabilnejšie. Polydisperzný index bol stanovený na hodnoty od $0,209 \pm 0,009$ do $0,414 \pm 0,014$, pričom môžeme z týchto hodnôt konštatovať, že častice vykazovali takmer uniformný charakter. Pripravené častice boli tiež mimoriadne stabilné o čom svedčia aj hodnoty ZP v tabuľkách. Vychádza sa z predpokladu, ktorý bol spomenutý v bode 4.11 a teda namerané hodnoty nespádajú do spomínaného intervalu -30 až $+30$ mV. Všetky častice boli ešte stabilnejšie v 7. deň od prípravy a je možné konštatovať, že nedochádzalo k agregácii častíc o čom svedčí aj znižovanie hodnôt ZP.

V Tabuľka 13 sú taktiež všetky zaznamenané hodnoty, avšak týkajú sa častíc, ktoré boli odstreďované 60 minút pri vyšších otáčkach, kde bol odobraný supernatant s neenkapsulovanými extraktmi a sediment bol rozsuspendovaný destilovanou vodou. Do roztoku sa opätovne dostala väčšina častíc v pôvodnom stave, o čom svedčia hodnoty, ktoré sa takmer nelíšili alebo líšili len veľmi málo od hodnôt pri päťminútovom odstreďovaní. Niektoré namerané hodnoty sa však zvýšili skoro až dvojnásobne, čo zas vypovedá o tom, že niektoré častice po odstredení a následnom rozsuspendovaní agregovali. Namerané stabilitné dáta však poukazujú na veľmi dobrú stabilitu častíc a bolo možné zhodnotiť, že aj takéto častice boli mimoriadne stabilné.

Keďže hovoríme o nanočasticiach, v prvý deň od prípravy bolo stanovené percento častíc, ktorých veľkosť spadala do 100 nm vid' Obr. 17. Z dát nameraných na prístroji Zetasizer ZS vyšlo, že $10,52 \pm 5,02$ % všetkých pripravených častíc odstredovaných 5 minút pri nízkych otáčkach malo nižšiu veľkosť než 100 nm. V kozmetike je však možné využiť aj častice väčšie než 100 nm. Napríklad pre stanovenie cytotoxicity takýchto častíc je možné použiť lipozómy do veľkosti 200 nm. Podľa vyhodnotených dát z veľkostného merania bolo vypočítané, že až $53,2 \pm 5,18$ % častíc spadalo pod túto veľkosť. Tieto hodnoty boli stanovené pre lipozómy obsahujúce iba olejové extrakty, bez prídavku PHB. V prípade častíc s PHB, iba $1,68 \pm 1,00$ % bolo pripravených do veľkosti 100 nm. Veľkosť do 200 nm spĺňalo $21,45 \pm 5,03$ % pripravených častíc s PHB a extraktmi. Je to spôsobené práve PHB, ktorý obohacuje obal lipozómov a tak zvyšuje ich veľkosť.



Obr. 17 Grafické znázornenie veľkosti častíc s hexanovými extraktmi, bez PHB v prvý deň prípravy, 5minútové odstredenie

Na Obr. 187 je graficky znázornená veľkosť pripravených častíc. Je nimi podporené tvrdenie, že častice mali uniformný charakter, vzhľadom na tvar kriviek. Taktiež, že lipozómy čisté, bez extraktov a bez PHB (1.) vykazovali najnižšiu veľkosť. Takisto je možné vidieť, že väčšina častíc spadala do veľkosti 200 nm, čo bolo overené aj výpočtom z nameraných dát.

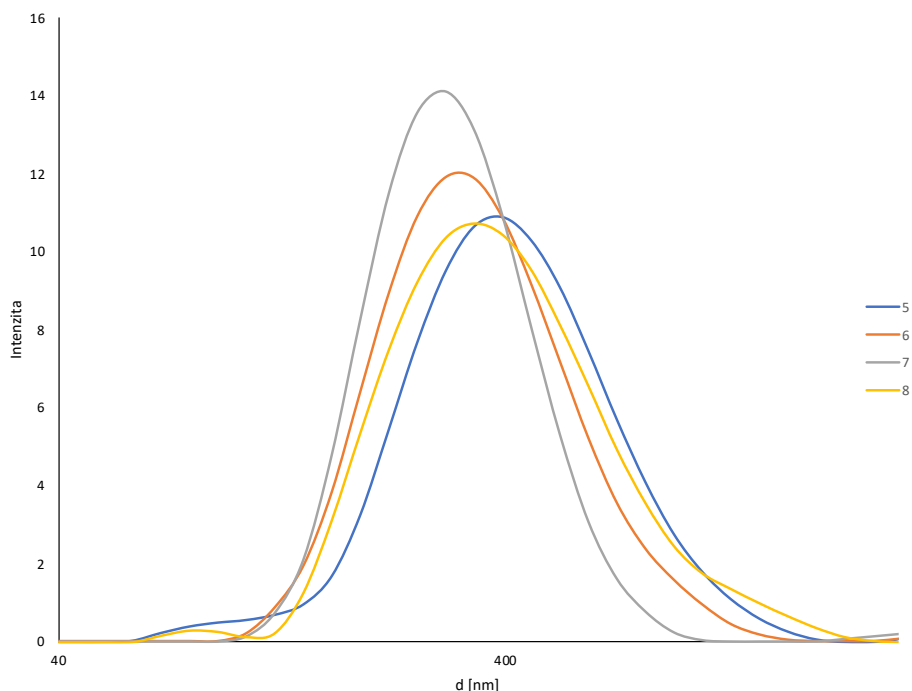
Na Obr. 18 je graficky znázornená veľkosť častíc s obsahom PHB a extraktmi, ktoré boli podrobené 60 minútovému odstredeniu pri vyšších otáčkach a následnému suspendovaniu sedimentu. Ako bolo spomenuté, častice boli väčšie vzhľadom na prítomnosť PHB v ich štruktúre. Je to aj potvrdené výpočtom z veľkostných dát, z ktorých vyplýva, že len $12,13 \pm 3,28$ % častíc spadalo do veľkosti pod 200 nm. Uniformita častíc je taktiež preukázaná tvarom kriviek.

Tabuľka 12 Hodnoty veľkosti častíc, polydisperzného indexu a zeta potenciálu pre častice odstredované po dobu 5 minút, v prvom a siedmom dni

5 minút odstredené	1. deň			7. deň		
	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
1. Lipozómy bez extraktu	154,4 ± 3,7	0,326 ± 0,040	-33,8 ± 0,8	187,8 ± 6,9	0,414 ± 0,014	-43,2 ± 3,7
2. Lipozómy + extrakt Arabica	196,3 ± 5,8	0,264 ± 0,017	-43,4 ± 0,1	202,8 ± 1,7	0,229 ± 0,017	-50,2 ± 0,6
3. Lipozómy + extrakt KOFIKOFI	199,4 ± 2,1	0,294 ± 0,047	-47,9 ± 2,0	210,9 ± 3,1	0,261 ± 0,020	-50,2 ± 0,8
4. Lipozómy + extrakt Robusta	169,1 ± 0,6	0,209 ± 0,009	-41,2 ± 1,4	204,3 ± 2,8	0,273 ± 0,017	-48,7 ± 0,6
5. Lipozómy bez extraktu, s PHB	335,2 ± 2,1	0,266 ± 0,007	-43,9 ± 1,3	541,8 ± 18,0	0,411 ± 0,039	-45,3 ± 0,4
6. Lipozómy + PHB + extrakt Arabica	292,7 ± 1,5	0,252 ± 0,013	-39,8 ± 0,4	306,1 ± 5,3	0,258 ± 0,027	-45,2 ± 0,6
7. Lipozómy + PHB + extrakt KOFIKOFI	261,2 ± 4,1	0,228 ± 0,005	-37,8 ± 1,2	273,4 ± 5,1	0,229 ± 0,013	-49,9 ± 2,3
8. Lipozómy + PHB + extrakt Robusta	289,1 ± 2,0	0,258 ± 0,047	-46,3 ± 2,6	305,1 ± 2,2	0,239 ± 0,239	-48,3 ± 1,2

Tabuľka 13 Hodnoty veľkosti častíc, polydisperzného indexu a zeta potenciálu pre častice odstredované 60 minút v prvom a v siedmom dni

60 minút odstredené	1. deň			7. deň		
	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
1. Lipozómy bez extraktu	349,5 ± 2,1	0,505 ± 0,065	-39,9 ± 3,2	383,3 ± 45,1	0,394 ± 0,029	-50,4 ± 3,2
2. Lipozómy + extrakt Arabica	308,1 ± 4,8	0,439 ± 0,038	-38,9 ± 1,5	344,5 ± 3,9	0,323 ± 0,058	-40,5 ± 1,3
3. Lipozómy + extrakt KOFIKOFI	247,3 ± 6,0	0,375 ± 0,010	-37,3 ± 2,0	347,4 ± 6,1	0,361 ± 0,014	-36,9 ± 1,3
4. Lipozómy + extrakt Robusta	198,6 ± 3,1	0,244 ± 0,014	-36,8 ± 3,1	355,2 ± 22,4	0,430 ± 0,035	-40,4 ± 1,5
5. Lipozómy bez extraktu + PHB	388,6 ± 30,5	0,300 ± 0,073	-40,4 ± 1,8	464,0 ± 11,4	0,410 ± 0,016	-50,1 ± 2,4
6. Lipozómy + PHB + extrakt Arabica	326,7 ± 1,3	0,221 ± 0,030	-36,7 ± 0,8	429,3 ± 8,8	0,387 ± 0,026	-41,7 ± 2,9
7. Lipozómy + PHB + extrakt KOFIKOFI	291,4 ± 3,4	0,190 ± 0,032	-34,0 ± 1,0	343,6 ± 15,4	0,309 ± 0,037	-42,9 ± 0,2
8. Lipozómy + PHB + extrakt Robusta	350,0 ± 5,8	0,232 ± 0,029	-29,4 ± 1,6	365,9 ± 7,2	0,233 ± 0,020	-43,7 ± 1,9



Obr. 18 Grafické znázornenie veľkosti častíc s hexanovými extraktmi, s PHB v prvý deň prípravy, 60 minútové odstredenie

V Tabuľka 14 a Tabuľka 15 sú znázornené namerané hodnoty veľkosti častíc, ich polydisperzného indexu a zeta potenciálu v prvom, treťom, siedmom a šesťdesiatom dni od prípravy. Hodnoty boli namerané pre roztoky častíc, ktoré boli odstredované pod dobu 5 minút pri nižších otáčkach a častíc odstredovaných 60 minút pri vyšších otáčkach. Niektoré roztoky častíc (vzorky 1., 2., 5., 6.) po 60 dňoch od prípravy neboli detekované, pravdepodobne kvôli mikrobiálnej aktivite plesní. V oboch prípadoch je však patrné, že veľkosť častíc sa po 60 dňoch ešte mierne zväčšila. Všetky vzorky však boli pomerne veľmi dobre stabilné v priebehu dlhodobého uchovávaní, o čom svedčia aj ich ZP v 60. dni od prípravy. Všetky vzorky je teda možné považovať za relatívne stabilné a uniformné, o čom svedčia aj ich hodnoty PdI.

5.3.2 Enkapsulačná účinnosť častíc

Postup stanovenia enkapsulačnej účinnosti bol popísaný v bode 2.9.4.1. Pri meraní enkapsulačnej účinnosti sa vychádzalo z koncentrácie uvoľnených fenolických látok po odstredení častíc pri vyšších otáčkach. K tomuto stanoveniu sme pristupovali dvoma spôsobmi. V prvom prípade sme zmerali enkapsulačnú účinnosť častíc s obsahom 100 μ l extraktu v prvom, treťom, siedmom a šesťdesiatom dni od prípravy.

Druhý spôsob spočíval v príprave častíc s prídavkom 10 μ l extraktu. Bolo to z dôvodu nízkej enkapsulačnej účinnosti pri prídavku 100 μ l extraktu. Naopak vyššie hodnoty enkapsulačnej účinnosti boli namerané pri časticiach s 10 μ l prídavkom extraktu.

Tieto výsledky boli z nedostatku času vyhodnocované len bezprostredne po príprave častíc (1. deň) a bolo by žiadúce doplniť v nadväzujúcej práci stabilitu takýchto častíc.

Tabuľka 14 Časový záznam hodnôt ZP, Pdl a veľkosti pre častice po 5 minútovom odstredení v prvom, treťom, siednom a šesťdesiatom dni od prípravy

5 minút odstredené	1. deň			3. deň			7. deň			60. deň		
	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	d [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
1.	$154,4 \pm 3,7$	$0,326 \pm 0,04_0$	$-33,8 \pm 0,8$	$271,0 \pm 7,6$	$0,444 \pm 0,019$	$-37,6 \pm 6,2$	$187,8 \pm 6,9$	$0,414 \pm 0,014$	$-43,2 \pm 3,7$	ND		
2.	$196,3 \pm 5,8$	$0,264 \pm 0,01_7$	$-43,4 \pm 0,1$	$193,9 \pm 1,9$	$0,231 \pm 0,018$	$-39,9 \pm 3,4$	$202,8 \pm 1,7$	$0,229 \pm 0,017$	$-50,2 \pm 0,6$	ND		
3.	$199,4 \pm 2,1$	$0,294 \pm 0,04_7$	$-47,9 \pm 2,0$	$188,5 \pm 1,3$	$0,229 \pm 0,003$	$-41,6 \pm 2,9$	$210,9 \pm 3,1$	$0,261 \pm 0,020$	$-50,2 \pm 0,8$	$210,4 \pm 21,9$	$0,310 \pm 0,052$	$-49,1 \pm 0,6$
4.	$169,1 \pm 0,6$	$0,209 \pm 0,00_9$	$-41,2 \pm 1,4$	$194,8 \pm 2,8$	$0,250 \pm 0,021$	$-45,5 \pm 1,0$	$204,3 \pm 2,8$	$0,273 \pm 0,017$	$-48,7 \pm 0,6$	$157,6 \pm 1,0$	$0,182 \pm 0,006$	$-44,6 \pm 0,4$
5.	$335,2 \pm 2,1$	$0,266 \pm 0,00_7$	$-43,9 \pm 1,3$	$353,5 \pm 17,7$	$0,314 \pm 0,019$	$-41,9 \pm 2,8$	$541,8 \pm 18,0$	$0,411 \pm 0,039$	$-45,3 \pm 0,4$	ND		
6.	$292,7 \pm 1,5$	$0,252 \pm 0,01_3$	$-39,8 \pm 0,4$	$304,2 \pm 1,7$	$0,290 \pm 0,047$	$-38,8 \pm 1,3$	$306,1 \pm 5,3$	$0,258 \pm 0,027$	$-41,7 \pm 2,9$	ND		
7.	$261,2 \pm 4,1$	$0,228 \pm 0,00_5$	$-37,8 \pm 1,2$	$265,4 \pm 1,2$	$0,231 \pm 0,021$	$-42,4 \pm 0,2$	$273,4 \pm 5,1$	$0,229 \pm 0,013$	$-49,9 \pm 2,3$	$321,3 \pm 4,0$	$0,267 \pm 0,014$	$-47,5 \pm 0,7$
8.	$289,1 \pm 2,0$	$0,258 \pm 0,04_7$	$-46,3 \pm 2,6$	$294,1 \pm 1,5$	$0,243 \pm 0,010$	$-38,4 \pm 5,4$	$305,1 \pm 2,2$	$0,239 \pm 0,239$	$-48,3 \pm 1,2$	$312,1 \pm 4,9$	$0,224 \pm 0,031$	$-48,6 \pm 1,0$

Tabuľka 15 Časový záznam hodnôt ZP, PDI a veľkosti pre častice po 60 minútovom odstredení, v prvom treťom a siedmom a šesťdesiatom dni od prípravy

60 minút odstredené	1. deň			3. deň			7. deň			60. deň		
	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i> [-]	<i>ZP</i> [mV]	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i> [-]	<i>ZP</i> [mV]	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i> [-]	<i>ZP</i> [mV]	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i> [-]	<i>ZP</i> [mV]
1.	349,5 ± 2,1	0,505 ± 0,0 65	-39,9 ± 3,2	376,8 ± 7,7	0,394 ± 0,012	-50,9 ± 9 ,0	383,3 ± 45,1	0,394 ± 0,029	-50,4 ± 3, 2			
2.	308,1 ± 4,8	0,439 ± 0,0 38	-38,9 ± 1,5	353,7 ± 12,2	0,370 ± 0,076	-31,3 ± 3 ,0	344,5 ± 3,9	0,323 ± 0,058	-40,5 ± 1, 3			
3.	247,3 ± 6,0	0,375 ± 0,0 10	-37,3 ± 2,0	294,1 ± 33,5	0,344 ± 0,062	-36,3 ± 0 ,3	347,4 ± 6,1	0,361 ± 0,014	-36,9 ± 1, 3	210,2 ± 0,4	0,230 ± 0,005	-39,1 ± 4, 1
4.	198,6 ± 3,1	0,244 ± 0,0 14	-36,8 ± 3,1	261,6 ± 10,4	0,342 ± 0,054	-36,8 ± 2 ,1	355,2 ± 22,4	0,430 ± 0,035	-40,4 ± 1, 5	196,5 ± 4,6	0,210 ± 0,015	-43,6 ± 0, 6
5.	388,6 ± 30, 5	0,300 ± 0,0 73	-40,4 ± 1,8	402,9 ± 15,4	0,234 ± 0,073	-29,6 ± 3 ,5	464,0 ± 11,4	0,410 ± 0,016	-50,1 ± 2, 4			
6.	326,7 ± 1,3	0,221 ± 0,0 30	-36,7 ± 0,8	328,3 ± 6,8	0,202 ± 0,036	-25,7 ± 0 ,8	429,3 ± 8,8	0,387 ± 0,026	-41,7 ± 2, 9			
7.	291,4 ± 3,4	0,190 ± 0,0 32	-34,0 ± 1,0	289,8 ± 1,5	0,179 ± 0,045	-27,3 ± 0 ,7	343,6 ± 15,4	0,309 ± 0,037	-42,9 ± 0, 2	356,5 ± 12,5	0,228 ± 0,037	-49,8 ± 0, 8
8.	350,0 ± 5,8	0,232 ± 0,0 29	-29,4 ± 1,6	342,0 ± 3,3	0,210 ± 6,971	-30,7 ± 1 ,3	365,9 ± 7,2	0,233 ± 0,020	-43,7 ± 1, 9	337,8 ± 3,3	0,241 ± 0,006	-49,6 ± 0, 3

Pre využitie v kozmetike by boli ideálne hodnoty niekde medzi týmito nameranými hodnotami a teda prídavok 40 – 60 μ l extraktu by bol vyhovujúci a hodnoty by sa pohybovali niekde na hranici 100 %, čo by pri príprave krémov na opaľovanie našlo svoje využitie. Po centrifugácii a rozsuspendovaní častíc bolo experimentálne zistené, že tento krok častice výrazne neovplyvnil a neporušil a tak by sa v kozmetike pri príprave emulzi O/V, dali využiť okrem sedimentov odstredených častíc aj supernatanty s neenkapsulovanými extraktami ako časť vodnej fázy.

Tabuľka 16 Enkapsulačná účinnosť pripravených častíc s obsahom 100 μ l hexanového extraktu v %

Častice s prídavkom 100 μ l hexanového extraktu	Enkapsulačná účinnosť [%]			
	1.deň	3. deň	7.deň	60.deň
1. Lipozómy bez extraktu	–			
2. Lipozómy + extrakt Arabica	67,166 \pm 0,014	67,742 \pm 0,012	74,539 \pm 0,021	ND
3. 3.Lipozómy + extrakt KOFIKOFI	92,816 \pm 0,008	75,734 \pm 0,027	86,759 \pm 0,026	94,727 \pm 0,006
4. 4.Lipozómy + extrakt Robusta	62,319 \pm 0,013	60,598 \pm 0,034	82,518 \pm 0,037	ND
5. Lipozómy bez extraktu, s PHB	–			
6. Lipozómy + PHB + extrakt Arabica	95,219 \pm 0,009	84,562 \pm 0,028	94,758 \pm 0,031	ND
7. Lipozómy + PHB + extrakt KOFIKOFI	94,188 \pm 0,003	79,868 \pm 0,058	92,151 \pm 0,032	95,626 \pm 0,009
8. Lipozómy + PHB + extrakt Robusta	78,986 \pm 0,006	62,409 \pm 0,009	69,837 \pm 0,028	ND

Vysvetlivky: ND (nebolo detekované)

Nedetekované hodnoty po 60-tich dňoch od prípravy častíc so 100 μ l prídavkom extraktu boli z dôvodu biologickej degradácie vzoriek, spojené s mikrobiologickou aktivitou plesní.

Tabuľka 17 Enkapsulačná účinnosť častíc s prídavkom 10 μ l hexanového extraktu v %

Častice s prídavkom 10 μ l hexanového extraktu	Enkapsulačná účinnosť [%]
1. Lipozómy + extrakt Arabica	93,260 \pm 0,007
2. Lipozómy + extrakt Robusta	87,908 \pm 0,004
3. Lipozómy + extrakt KOFIKOFI	92,900 \pm 0,002
4. Lipozómy + PHB + extrakt Arabica	96,371 \pm 0,007
5. Lipozómy + PHB + extrakt Robusta	93,886 \pm 0,002
6. Lipozómy + PHB + extrakt KOFIKOFI	96,405 \pm 0,001

5.3.3 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v časticiach

Pri stanovovaní obsahu uvoľnených fenolických látok z pripravených častíc sa postupovalo podľa bodu 4.6.1. Na meranie boli použité supernatanty odstredených roztokov častíc po 60 minútach pri vyšších otáčkach. Obsah fenolických látok sa sledoval v prvom, treťom, siedmom a šesťdesiatom dni od prípravy. Hodnoty 60 dní od prípravy však nie sú kompletne, nakoľko vzorky podľahli kontaminácii plesňami. Tieto namerané hodnoty boli použité aj pri ďalších výpočtoch, konkrétne pri stanovení enkapsulačnej účinnosti častíc.

Namerané hodnoty pri lipozómoch bez prídania PHB s hexánovými extraktmi vykazujú klesajúci charakter obsahu fenolických látok. Najvyšší obsah fenolických látok pri prvom type častíc dosiahli častice s hexánovým extraktom KOFIKOFI, a to $1,255 \pm 0,008$ mg/g. Najnižšia hodnota bola naopak nameraná v prípade častíc s hexánovým extraktom Robusta, a to $0,777 \pm 0,013$ mg/g.

V prípade častíc s prídavkom PHB a hexánových extraktov boli namerané hodnoty fenolických látok v porovnaní s hodnotami častíc bez prídavku PHB výrazne nižšie. Je to zapríčinené práve prítomnosťou PHB, ktorý zväčšuje veľkosť a teda sa v časticiach nachádza potenciálne viac priestoru pre zapudzenie látok. Vzhľadom na to, že PHB je lipofilná látka, tak extrakty by mohli byť potenciálne viazané v granulách PHB. Keď by sme porovnali hodnoty veľkosti častíc s PHB a bez, takisto aj častice s obsahom extraktov s PHB a bez PHB, je viditeľné že častice bez PHB sú menšie než tie, ktoré ho vo svojej štruktúre majú. Takisto aj častice bez PHB a s extraktmi sú svojou veľkosťou menšie v porovnaní s časticami s PHB a s prídavkom extraktov. Obsah PHB tiež zrejme prispieva k vyššej dlhodobel stabilite častíc (Tab.14, Tab. 15)

Tabuľka 18 Obsah uvoľnených fenolických látok z pripravených častíc v mg na g extraktu

Častice s prídavkom 100 μ l hexanového extraktu	Obsah fenolických látok [mg/g]			
	1 deň	3. deň	7. deň	60. deň
1. Lipozómy bez extraktu	–			
2. Lipozómy + extrakt Arabica	$1,065 \pm 0,014$	$1,046 \pm 0,012$	$0,826 \pm 0,021$	$0,164 \pm 0,006$
3. Lipozómy + extrakt KOFIKOFI	$1,255 \pm 0,008$	$0,757 \pm 0,027$	$0,413 \pm 0,026$	ND
4. Lipozómy + extrakt Robusta	$0,777 \pm 0,013$	$0,813 \pm 0,034$	$0,361 \pm 0,037$	ND
5. Lipozómy bez extraktu, s PHB	–			
6. Lipozómy + PHB + extrakt Arabica	$0,155 \pm 0,009$	$0,501 \pm 0,028$	$0,170 \pm 0,031$	$0,014 \pm 0,009$
7. Lipozómy + PHB + extrakt KOFIKOFI	$0,181 \pm 0,003$	$0,628 \pm 0,058$	$0,245 \pm 0,032$	ND
8. Lipozómy + PHB + extrakt Robusta	$0,433 \pm 0,006$	$0,775 \pm 0,009$	$0,622 \pm 0,028$	ND

Vysvetlivky: ND (nebolo detekované)

5.3.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity častíc

Postup stanovenia antioxidačnej aktivity bol popísaný v kapitole 4.6.2. Namerané hodnoty antioxidačnej aktivity zobrazuje Tabuľka 19. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovala v oboch prípadoch častíc s PHB aj bez extrakt kávy Robusta, konkrétne $0,026 \pm 0,016$ mg TE pri časticiach bez prídavku PHB a $0,022 \pm 0,001$ mg TE pri lipozómoch s obsahom PHB.

Všetky namerané hodnoty sú však príliš nízke. Je veľmi pravdepodobné, že nízky prídavok (10 µl) extraktu v celkovom objeme častíc (10 ml) zapríčinil takéto nízke hodnoty. Pri meraní antioxidačnej aktivity bola zmena abosorbancie v čase 0 a v čase 10 minút od prípravy približne 0,050, čo z kalibračnej krivky svedčí o nízkej hodnote prídavku extraktu, z čoho vyplýva, že bol pravdepodobne nameraný šum.

Tabuľka 19 Namerané hodnoty antioxidačnej aktivity pripravených častíc

Častice s prídavkom 10 µl hexanového extraktu	Antioxidačná aktivita [mg TE]
1. Lipozomy + extrakt Arabica	0,014 ± 0,003
2. Lipozomy + extrakt Robusta	0,026 ± 0,016
3. Lipozomy + extrakt KOFIKOFI	0,021 ± 0,004
4. Lipozomy + PHB + extrakt Arabica	0,009 ± 0,000
5. Lipozomy + PHB + extrakt Robusta	0,022 ± 0,001
6. Lipozomy + PHB + extrakt KOFIKOFI	0,009 ± 0,003

5.3.5 SPF častíc

Bolo sledované SPF pripravených lipozomov bez, aj s prídavkom PHB a s hexánovými extraktmi. Častice bez prídavku PHB mali v porovnaní s časticami s PHB nižšiu hodnotu SPF. Vyplýva to práve z prítomnosti PHB v štruktúre lipozomu, ktorého vlastnosti boli popísané v predošlých kapitolách. Samotný polymér PHB teda vykazuje príspevok k celkovej hodnote SPF o hodnote cca 3,5 – 4,5, čo bolo popísané aj v literatúre [72]. Po premeraní SPF všetkých lipozomov po týždni od prípravy, bola hodnota ochranného faktoru vyššia takmer dvojnásobne. Pri veľkostných meraniach bol zaznamenaný nárast veľkosti častíc po siedmom dni od prípravy. Práve nárast veľkosti častíc môže mať za príčinu zvýšenie hodnoty SPF, kde môže dochádzať k rozptylu žiarenia na samotných časticách.

Tabuľka 20 Stanovené hodnoty SPF pripravených častíc s prídavkom 10 µl hexanového extraktu v prvý a v siedmy deň od prípravy

SPF častice s prídavkom 10 µl hexanového extraktu	SPF	
	1. deň	7. deň
1. Lipozomy + extrakt Arabica	1,133 ± 0,015	2,711 ± 0,035
2. Lipozomy + extrakt Robusta	1,190 ± 0,025	3,727 ± 0,048
3. Lipozomy + extrakt KOFIKOFI	1,509 ± 0,019	2,870 ± 0,037
4. Lipozomy + PHB + extrakt Arabica	5,514 ± 0,071	6,654 ± 0,086
5. Lipozomy + PHB + extrakt Robusta	3,420 ± 0,044	7,889 ± 0,101
6. Lipozomy + PHB + extrakt KOFIKOFI	3,334 ± 0,043	7,587 ± 0,097

5.4 Testy mikrobiálnej aktivity kávových materiálov

Cieľom tejto časti experimentov bolo overiť potenciálnu kontamináciu odpadných materiálov získaných po príprave kávového nápoja, čo je potrebné overiť pre vyhodnotenie bezpečnosti týchto materiálov pre ďalšie použitie napríklad v kozmetike. Na určenie mikrobiálnej aktivity boli použité testovacie prúžky od firmy Milcom. Pracovný postup na jednotlivé stanovenia bol popísaný v kapitole 4.13. Pri stanovovaní boli jednotlivé testovacie prúžky označené nasledovne:

- 1 Mikrobiteš na stanovenie koliformných baktérií
- 2 Mikrobiteš na stanovenie kvasiniek
- 3 Mikrobiteš na stanovenie plesní
- 4 Mikrobiteš na stanovenie všetkých redukujúcich mikroorganizmov

Pri každom číselnom označení bolo ešte dodatkové označenie písmenom.

A. Kávové usadeniny druhu kávy Arabica

B. Kávové usadeniny druhu kávy KOFIKOFI (B ako blend, káva s podielom 50 % Arabica, 50 % Robusta

R. Kávové usadeniny druhu kávy Robusta

Materiály boli pri sušení uchovávané pri laboratórnej teplote v uzatvorenom priestore po dobu jedného týždňa s pravidelnou kontrolou miery vysušenia. Po týždni, teda po úplnom vysušení boli vykonané testy na mikrobiálnu aktivitu.



Obr. 19 Kávové usadeniny po vysušení

5.4.1 Stanovenie koliformných baktérií

Pracovalo sa podľa postupu uvedeného v bode 4.13.1. Po inkubačnej dobe 16 hodín v termostate nastavenom na 37 °C boli sledované zmeny na testovacom prúžku. V tomto prípade ani na jednom prúžku neboli zaznamenané ostro ohraničené červené bodky. Test na koliformné baktérie bol teda pri každom druhu kávy negatívny, čo znamená dobrý výsledok, pokiaľ ide o bezpečnosť materiálov.



Obr. 20 Negatívne testy na stanovenie koliformných baktérií

5.4.2 Stanovenie kvasiniek

Postup práce bol popísaný v kapitole 4.13.2. Po uplynutí inkubačnej doby v termostate boli pozorované zmeny na testovacích prúžkoch. Nebola pozorovaná mikrobiálna aktivita kvasiniek ani v jednom prípade z troch druhov kávy. Na prúžkoch neboli pozorované kontrastujúce kolónie so zelenou farbou testovacích prúžkov. Test bol teda považovaný za negatívny vo všetkých prípadoch.

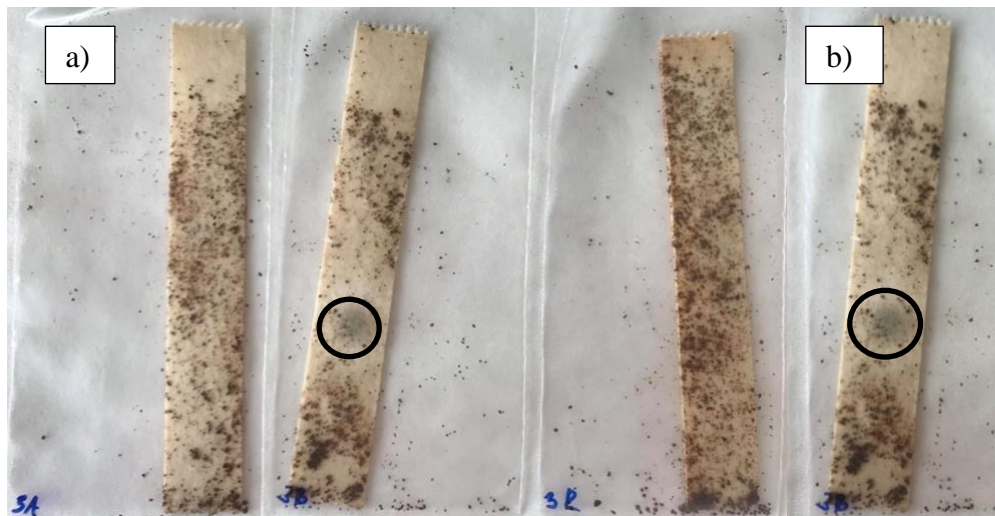


Obr. 21 Negatívne testy mikrobiálnej aktivity kvasiniek

5.4.3 Stanovenie plesní

Pri práci s testovacími prúžkami bolo postupované podľa kapitoly 4.13.3. Po uplynutí inkubačnej doby 5 dní v termostate boli pozorované kolónie plesní. Pozitívny výsledok testu ukázal druh kávy B. Na testovacom prúžku bol zreteľne vidieť nárast kolónie v prírodných farbách. Za pozitívny výsledok testu v tomto prípade môže aj fakt, že káva prešla predošlou úpravou v kávovom nápoji pomocou kávovaru. Je možné, že takto vysušené kávové usadeniny

boli náchylnejšie na kontamináciu plesňami, než kávové usadeniny pripravené metódou frenchpress ako v prípade kávy Arabica a Robusta. Keďže boli kávové usadeniny sušené pri laboratórnej teplote na voľnom vzduchu, a aby sa predišlo ich kontaminácii, je vhodné kávové usadeniny sušiť v sušiarňi pri zvýšenej teplote.



Obr. 22 a) testovacie prúžky s jedným pozitívnym výsledkom na plesne, b) pozitívny výsledok

5.4.4 Stanovenie všetkých redukujúcich mikroorganizmov

Po dodržaní inkubačnej doby a teploty termostatu popísanom v kapitole 4.13.4 boli pozorované zmeny na testovacích prúžkoch. Ani v jednom prípade testu však nedošlo k nárastu ostro ohraničených červených bodiek. Výsledok je preukázaný na Obr. 23.

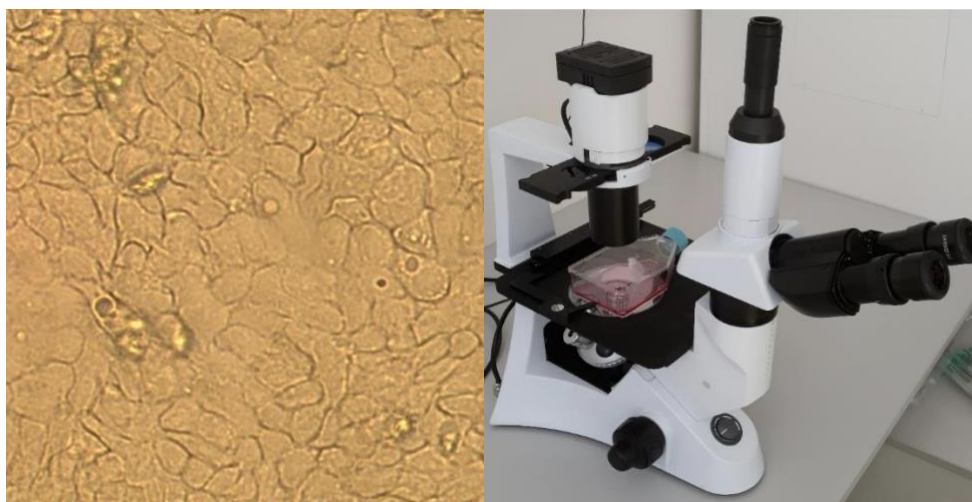
Dôvodom pomerne nízkeho nárastu mikroorganizmov je s najväčšou pravdepodobnosťou nízka hodnota vodnej aktivity, ktorá u vysušených materiálov nie je dostatočujúca pre rast a množenie najmä baktérií a kvasiniek.



Obr. 23 Testy s negatívnym výsledkom na stanovenie všetkých redukujúcich mikroorganizmov

5.5 Testy cytotoxicity častíc a nanovláken

Cytotoxicita vybraných častíc bola testovaná na keratinocytoch, vid' Obr. 24, podľa postupu, ktorý bol uvedený v kapitole 4.14. Na MTT testy boli použité častice s hexánovými extraktami, ktoré vykazovali najvyššiu nameranú hodnotu SPF.



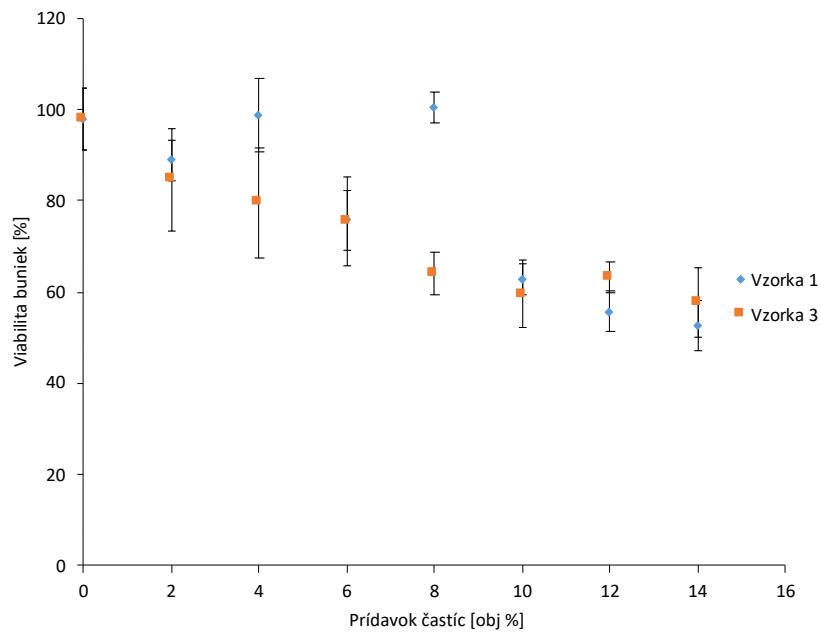
Obr. 24 Z prava – inverzný mikroskop s kultivačnou nádobou, z ľava – ľudské keratinocyty pri 200 násobnom zväčšení

V Tabuľka 21 je percentuálne vyjadrený vplyv prídavku vzoriek častíc na viabilitu buniek. Vzorka 1 predstavuje častice s extraktom Arabica, vzorka 3 predstavuje častice s extraktom KOFIKOFI, vzorky 4 a 6 sú častice s obsahom PHB a s extraktom Arabica v prípade vzorky 4 a s extraktom kávy KOFIKOFI v prípade vzorky 6.

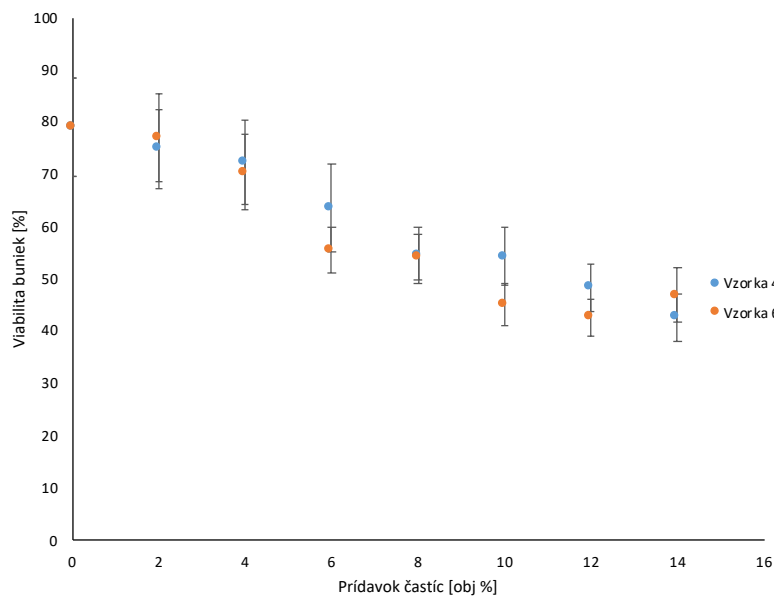
Tabuľka 21 Stanovené hodnoty viability buniek

Vzorka	1.	3.	4.	6.
	Viabilita [%]			
0	97,816 ± 6,652	97,816 ± 6,652	79,067 ± 9,385	79,067 ± 9,385
2	88,771 ± 4,355	84,538 ± 11,085	74,931 ± 7,561	76,953 ± 8,365
4	98,770 ± 8,059	79,473 ± 12,085	72,317 ± 8,036	70,387 ± 7,174
6	75,658 ± 6,380	75,360 ± 9,619	63,565 ± 8,314	55,512 ± 4,220
8	100,336 ± 3,530	63,956 ± 4,695	54,580 ± 5,452	54,248 ± 4,313
10	62,801 ± 3,256	59,546 ± 7,294	54,216 ± 5,498	45,161 ± 4,035
12	55,751 ± 4,304	63,137 ± 3,440	48,429 ± 4,529	42,719 ± 3,546
14	52,658 ± 5,560	57,621 ± 7,755	42,634 ± 4,562	46,923 ± 5,201

Celkovo je možné skonštatovať, že prítomnosť extraktov v časticiach vo väčšine prípadov nepôsobila výrazne negatívne na viabilitu buniek, v prípade lipozómov je viabilita vyššia ako 60 % až do koncentrácie 12%, v prípade lipozómov s obsahom PHB do koncentrácie cca 8%.



Obr. 25 Závislosť viability buniek od koncentrácie častíc v roztoku pre vzorky 1 a 3



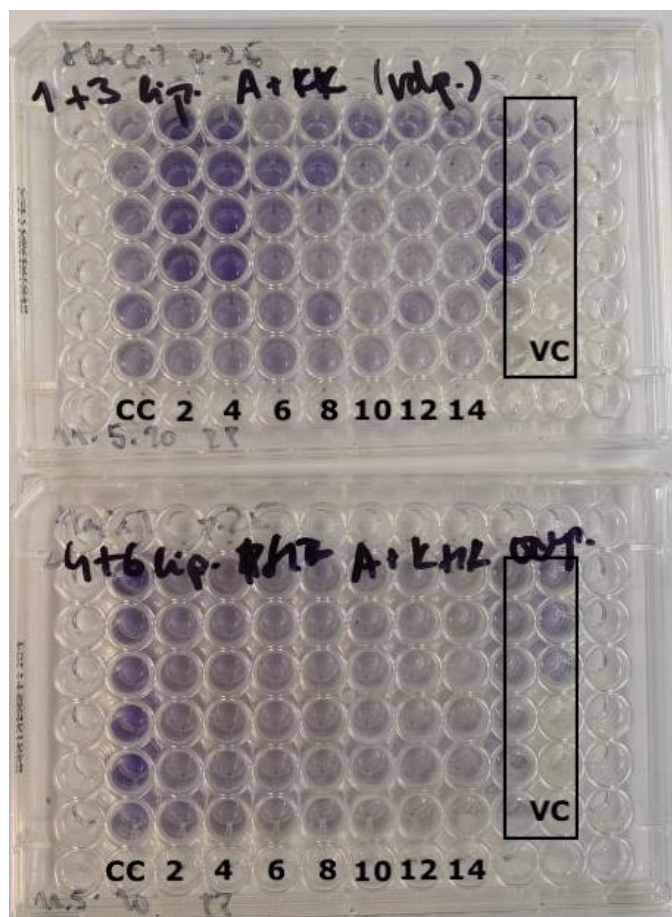
Obr. 26 Závislosť viability buniek v závislosti na koncentrácii častíc v roztoku pre vzorky 4 a 6

V súvislosti s našim meraním bola vypočítaná aj upresnená hodnota LC 50, teda hodnota prídavku vzorku, ktorý by spôsobil zníženie viability buniek na 50 %. Tieto hodnoty sú zobrazené v Tabuľka 22, pre každý druh vzorky. Tieto hodnoty korešpondujú s hodnotami v Tabuľka 21, kde je pri vzorkách 4 a 6 vidieť pokles viability pri 8%-nom prídavku častíc v roztoku. Tieto vzorky mali vo svojej štruktúre PHB. Príprava PHB pozostáva v rozpustení navážky PHB v chloroforme, pričom po vytvorení častíc sa nechá odparovať. Je veľmi pravdepodobné, že v takom malom objeme, ktorý bol použitý na stanovenie viability buniek, ešte nejaký malý zvyškový obsah chlorofomu bol, a preto vyšší prídavok koncentrácie častíc s extraktami viabilitu buniek znižoval.

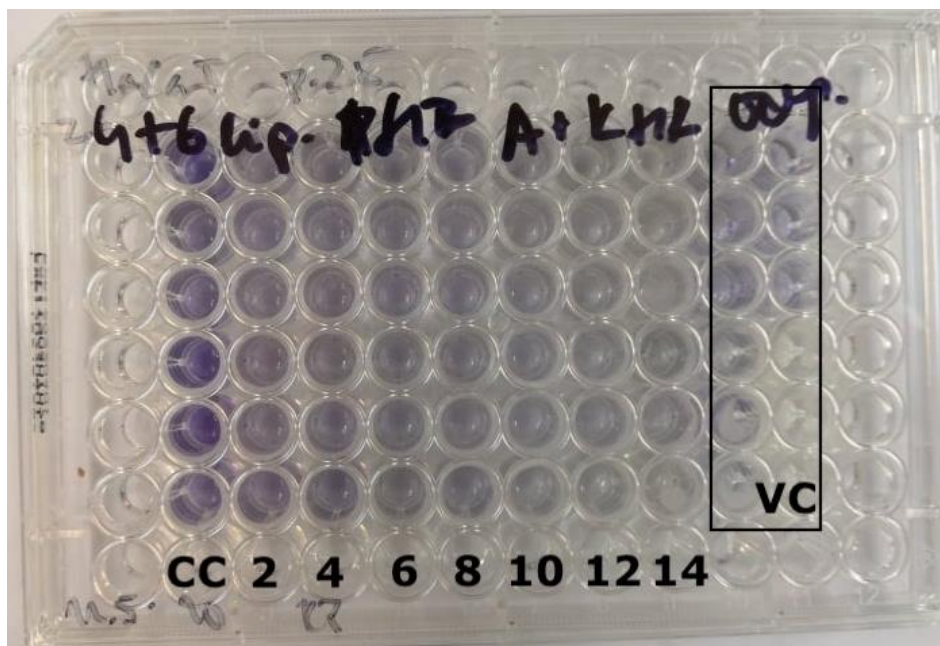
Presne stanovené hodnoty koncentrácie LC_{50} prídavku sú nižšie pre vzorku 4 (10,15 %) a pre vzorku 6 (11,18 %). Vyplýva z toho, že až viac než 10 %-ný prídavok ovplyvnil viabilitu buniek, avšak je stále možné použiť tieto častice v kozmetickom priemysle. Pre vzorky 1 a 3 všetky testované koncentrácie neovplyvnili významne viabilitu buniek, teda ich môžeme takisto považovať za využiteľné pre kozmetický priemysel. Svedčia o tom aj vypočítané hodnoty v Tabuľka 22 a korešpondujú s hodnotami v Tabuľka 21, kde pri 14%-nom prídavku bolo ešte približne nad 50 % buniek stále viabilných.

Tabuľka 22 Vypočítané hodnoty LC_{50}

	LC_{50} [%]
Častice + extrakt Arabica	15,29
Častice + extrakt KOFIKOFI	15,66
Častice + PHB + extrakt Arabica	10,15
Častice + PHB + extrakt KOFIKOFI	11,18



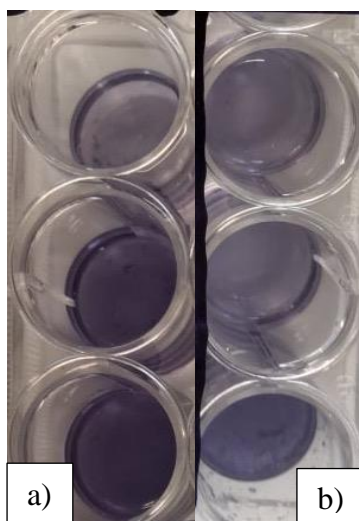
Obr. 27 Mikrotitračná doštička po MTT teste pre vzorky 1 a 3, 4 a 6, CC – kontrola nárastu buniek (médiu), VC – vehicle control, kontrola prostredia, 2 – 14 percento častíc v roztoku



Obr. 28 Mikrotitračná doštička pre vzorky 4 a 6: CC – kontrola nárastu buniek (médiu), VC – vehicle control, kontrola prostredia, 2 – 14 percento častíc v roztoku

Na stanovenie cytotoxicity boli použité vlákna nastrihané v tvare štvorčiekov s hmotnosťami 40,0 mg, 50,0 mg a 60,0 mg, umiestnené do mikrotitračných doštičiek, kde bol následne vykonaný MTT test.

V prípade stanovenia cytotoxicity nanovláken MTT test ukázal, že vlákna čiastočne ovplyvnili viabilitu buniek. Bunková viabilita bola stanovená na $67,77 \pm 4,15$ %. Hodnota okolo 70 % naznačuje mierny vplyv na ľudské bunky a vlákna sú teda potenciálne vhodné pre aplikácie v kozmetike.



Obr. 29 Výsledok MTT testu pre nanovláčna, a) CC – kontrola nárastu buniek (médiu), b) použité vzorky

5.6 Maceráty

Ako bolo spomenuté v kapitole 4.5.2, boli vyhodnocované aj tri druhy olejov, do ktorých sa priamo macerovali účinné látky z kávových usadenín.

Tabuľka 23 Stanovené hodnoty SPF vybraných druhov olejov s kávovými extraktami po šesťdesiatich dňoch

	Parafínový olej	Parafínový olej + Arabica	Parafínový olej + KOFIKOFI	Parafínový olej + Robusta
SPF	0,011 ± 0,002	0,047 ± 0,007	0,010 ± 0,002	0,005 ± 0,001
	Rastlinný olej	Rastlinný olej + Arabica	Rastlinný olej + KOFIKOFI	Rrastlinný olej + Robusta
SPF	0,011 ± 0,002	0,206 ± 0,003	0,577 ± 0,007	0,300 ± 0,004
	Sójový olej	Sójový olej + Arabica	Sójový olej + KOFIKOFI	Sójový olej + Robusta
SPF	0,019 ± 0,003	0,044 ± 0,006	0,088 ± 0,001	0,006 ± 0,011

Vo všeobecnosti je z vypočítaných a nameraných dát jasné, že najlepšie sa macerovali účinné látky do rastlinného slnečnicového oleja. V prípade parafínového oleja boli namerané hodnoty veľmi nízke. Je to z dôvodu, že parafínový olej vo svojej štruktúre obsahuje samé uhľovodíky a tak sa len veľmi ťažko mohli do jeho štruktúry extrahovať účinné látky.

Celkovo sú však namerané hodnoty veľmi nízke, aby sa mohlo hovoriť o dostatočnej SPF ochrane voči UV žiareniu vzhľadom na fakt, že extračná doba bola dostatočne dlhá na to, aby sa účinné látky dostali do olejov. Vysvetlením však môže byť, že kávové usadeniny už boli raz použité na extrakciu, a to vodnú, teda na prípravu kávového nápoja. Je viac než možné, že nízky obsah účinných látok zodpovedných za UV ochranu je spôsobený extrakčným činidlom – olejom, v ktorom sú tieto látky horšie rozpustné ako v polárnych rozpúšťadlách. Kávové usadeniny do oleja uvoľnili už len veľmi malé množstvo účinných látok, čo je znázornené práve v Tabuľka 23, ako nízka hodnota SPF.

Maceráty do olejov sú síce jednoduchšie na prípravu v porovnaní s časticami či vláknami, avšak pre využitie aktívnych látok z kávových usadenín nie sú príliš vhodnou alternatívou.

6 ZÁVER

Predložená práca mala za úlohu pripraviť a vyhodnotiť prírodné UV filtre s využitím vedľajších surovín z potravinárskych výrob a nanotechnológií. Počiatkom celej práce bolo overiť, či extrakty z odpadných materiálov pochádzajúcich zo spracovania kávy môžu byť využité v kozmetickom priemysle ako organické UV filtre. V prvej fáze práce preto bola optimalizovaná výroba kávového oleja z rôznych druhov kávových usadenín, pomocou extrakcie v hexane. V jednotlivých extraktoch boli potom stanovované obsahy fenolických látok a antioxidačná aktivita spojená so stanovením SPF. Fenolické látky z kávy sú schopné absorbovať UV žiarenie a fungovať ako UV filtre, problém je však v ich nízkej oxidačnej stabilite vo vodnom prostredí. Preto bola zvolená cesta extrakcie olejovej zložky kávových odpadov pomocou hexánu. Boli testované tri druhy kávy – Arabica, Robusta a zmes oboch druhov (KOFIKOFI).

Najvyšší obsah fenolických látok bol nameraný v káve Arabica. Pripravené extrakty boli enkapsulované do nanočastíc typu lipozómov a do nanovláken. Lipozómy boli pripravené sonikáciou zmesi lecitínu a cholesterolu, do jednej skupiny bol na základe literárnych údajov pridaný aj prírodný polymér PHB. Nanovláčna boli pripravené metódou forspinningu z roztoku PHB v chloroforme s prídavkom kávového extraktu. U všetkých druhov lipozómov bola stanovená enkapsulačná účinnosť týchto častíc, antioxidačná aktivita, ďalej obsah fenolických látok, zároveň aj ich stabilita v čase a v neposlednom rade SPF.

Všetky častice pripravené metódou sonikácie z lecitínu a cholesterolu, s prídavkom PHB ale aj bez, boli stabilné aj z dlhodobého hľadiska a svojou veľkosťou by potenciálne mohli byť vhodným nanomateriálom v kozmetických produktoch. Veľkosť lipozómov bez PHB sa pohybovala okolo 200 nm, lipozómy s obsahom PHB boli asi dvojnásobne veľké. Index polydisperzity bol v oboch prípadoch pomerne nízky, čo svedčí o vysokom stupni uniformity častíc. Pripravené častice s kávovými olejmi vykazovali nižšie hodnoty SPF, pričom neprekročili hranicu SPF 10. Optimalizácia metódy extrakcie by mohla byť v tomto smere prínosná, je žiadúca lepšia výťažnosť prírodných látok obsiahnutých v kávových usadeninách. Je treba zdôrazniť, že k hodnote SPF faktoru významne prispieva obsah PHB v časticiach. Lipozómy s obsahom PHB vykazovali až 2-3x vyššiu hodnotu SPF ako lipozómy bez PHB.

Enkapsulačná účinnosť častíc súvisí významne s množstvom pridaného extraktu k enkapsulácii. Bolo preukázané, že už 40 – 60 μ l extraktu by bolo pri enkapsulácii na hranici prakticky stopercentnej účinnosti, čo by v kozmetickom priemysle našlo veľké uplatnenie. Zároveň aj prídavok 100 μ l, používaný v tejto práci, vykazoval enkapsuláciu na hranici cca 70 %, pričom by v kozmetike mohli byť využité aj neenkapsulované extrakty v roztoku častíc, ktoré boli odstreďované, vo forme supernatantu ako súčasť vodnej fázy pri príprave emulzií O/V.

V práci boli testované aj iné spôsoby spracovania kávových materiálov, konkrétne macerácia účinných látok z kávových usadenín do rôznych druhov olejov. Bolo preukázané, že najlepšie sa látky extrahovali do rastlinného slnečnicového oleja. Tento poznatok by mohol byť po ďalšom skúmaní využiteľný v ďalšom spracovávaní kávových odpadov, aj keď získané maceráty vykazovali pomerne nízke hodnoty SPF i obsahu aktívnych látok.

Za účelom posúdenia skladovateľnosti odpadných kávových materiálov a citlivosti k mikrobiálnej kontaminácii bola počas práce sledované mikrobiálna aktivita samotných kávových usadenín pomocou orientačných screeningových testov. Táto analýza je dôležitá najmä z hľadiska posúdenia bezpečnosti využitia takýchto materiálov v kozmetike. Mikrobiálna kontaminácia bola testovaná vo vysušených vzorkách kávových usadenín. Pomocou jednorázových testov bola samostatne sledovaná kontaminácia baktériami, kvasinkami a plesňami. Bolo preukázané, že len jeden druh kávy vykazoval kontamináciu plesňami, pričom sa bralo do úvahy, že tieto kávové usadeniny boli sušené pri

laboratórnej teplote v uzatvorenom priestore. Pri optimalizácii metódy sušenia by bolo vhodnejšie kávové usadeniny sušiť pri vyšších teplotách, kde by mikrobiálna aktivita bola výrazne znížená.

Za účelom posúdenia bezpečnosti použitia odpadných kávových materiálov v kozmetike bola sledovaná cytotoxicita pripravených častíc s použitím bunkovej línie humánnych keratnocytoch HaCaT. Výsledky MTT testu potvrdili, že pripravované lipozómy, lipozómy s prídavkom PHB a PHB vlákna s obsahom kávových extraktov nevykazovali cytotoxický efekt do koncentrácie cca 10 %, a teda je možné ich používať v kozmetickom priemysle.

Z výsledkov experimentálnej časti vyplýva, že pri vývoji nanomateriálov s obsahom prírodných látok z kávových materiálov by bolo vhodné zaradiť optimalizáciu extrakcie v súvislosti s extrakčným činidlom, ďalej preskúmanie prídavku vyššej koncentrácie extraktov aby sa dosiahlo navýšenie antioxidačnej aktivity aj SPF ochranného faktora. Po takejto optimalizácii by mohli byť pripravené nanočasticové a nanovlákné štruktúry potenciálne využívané v rôznych odvetviach nielen kozmetického priemyslu, ale aj v medicíne. Ako bolo naznačené, táto práca sa zaoberala najmä prípravou nanočastíc, ktoré by sa využívali v produktoch na opaľovanie. Nanovlákné štruktúry by sa mohli v kozmetickom priemysle používať ako masky na tvár, z ktorých by sa uvoľňovali účinné látky do pokožky. V medicíne by to mohlo znamenať využívanie nanovláken ako kryty rán s obsahom prírodných látok, kde by fenolické zlúčeniny zlepšovali kondíciu pokožky a zároveň ju chránili. V tejto súvislosti je však zásadná otázka bezpečnosti materiálov, ich zložiek a surovín na prípravu nanoštruktúr, ako aj výsledných aplikačných foriem.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] CHANDRA, Priyanka, Rakesh Kumar SHARMA a Daljit Singh ARORA. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International* [online]. 2020, **129** [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108849. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307355>.
- [2] SARANGARAJAN, R., S. MEERA, R. RUKKUMANI, P. SANKAR a G. ANURADHA. Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2017, **10**(12), 1111-1116 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.10.017. ISSN 19957645. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764517311999>.
- [3] How can antioxidants benefit our health? In: *www.nutritionhelthnet.com* [online]. 2019 [cit. 2020-02-05]. Dostupné z: <https://nutritionhealthnet.com/antioxidants/>.
- [4] MANACH, Claudine, Gary WILLIAMSON, Christine MORAND, Augustin SCALBERT a Christian RÉMÉSY. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2005, **81**(1), 230S-242S [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1093/ajcn/81.1.230S. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/81/1/230S/4607515>.
- [5] *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, **66**(1) [cit. 2020-02-05]. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464620300530>.
- [6] DAWN, Amrita, Shashank DEEP, Christine MORAND, Augustin SCALBERT a Christian RÉMÉSY. Thinking beyond tradition: Polyphenols as effective refolding modulators. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **148**(1), 969-978 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.024. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019360003>.
- [7] ESTEBAN-FERNÁNDEZ, Adelaida, Irene ZORRAQUÍN-PEÑA, Dolores GONZÁLEZ DE LLANO, Begoña BARTOLOMÉ a M. Victoria MORENO-ARRIBAS. The role of wine and food polyphenols in oral health: Polyphenols as effective refolding modulators. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **69**(1), 118-130 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.09.008. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417304521>.
- [8] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0438-6.
- [9] HIGDON, Jane. Basic structure of flavonoid subclasses. In: *Lpi.oregonstate.edu* [online]. Oregon State University, 2005 [cit. 2020-02-06]. Dostupné z: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>.
- [10] KOHÚTOVÁ, Helena. Ochrana proti UV žiareniu. In: *Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky* [online]. Bratislava, 2009 [cit. 2020-02-06]. Dostupné z: http://www.uvzsr.sk/docs/bkv/info_pre_spotrebiteľov/UV_ziarenie_fototypy_dlzka_po_bytu_na_slunku_ochrana.pdf.

- [11] BENEŠ, Jiří, Jaroslava KYMPLOVÁ a František VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2015. ISBN 97-880-2474-7125
- [12] SERPONE, Nick, Daniele DONDI a Angelo ALBINI. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 2007, 360(3), 794-802 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/j.ica.2005.12.057. ISSN 00201693. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169306000259>.
- [13] GRÓF, Pál, Györgyi RONTÓ a Evelyne SAGE. A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2002, 68(1), 53-59 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/S1011-1344(02)00333-0. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134402003330>.
- [14] RASTOGI, Suresh Chandra. *UV filters in sunscreen products - a survey* [online]. , 348-351 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1034/j.1600-0536.2002.460605.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0536.2002.460605.x>
- [15] SAMBANDAN, Divya R. a Desiree RATNER. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*[online]. 2011, 64(4), 748-758 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.01.005. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962210000228>
- [16] KORAC, RadavaR a KapilM KHAMBHOLJA. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2011, 5(10) [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.4103/0973-7847.91114. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <http://www.phcogrev.com/article/2011/5/10/1041030973-784791114>.
- [17] GALANAKIS, Charis M., Philippos TSATALAS, Ioannis M. GALANAKIS, Valeria DISSETTE, Piergiacomo BUSO, Arianna FALLACARA a Silvia VERTUANI. Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. *Fitoterapia* [online]. 2018, 9, 160-168 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.eti.2017.12.002. ISSN 23521864. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186417303322>
- [18] RADICE, Matteo, Stefano MANFREDINI, Paola ZIOSI, Valeria DISSETTE, Piergiacomo BUSO, Arianna FALLACARA a Silvia VERTUANI. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia* [online]. 2016, 114(10), 144-162 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.003. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1630377X>.
- [19] ELBOURY, S, C COUTEAU, L BOULANDE, E PAPARIS, L COIFFARD, Arianna FALLACARA a Silvia VERTUANI. Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2007, 340(1-2), 1-5 [cit. 2020-02-10]. DOI:

- 10.1016/j.ijpharm.2007.05.047. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517307004589>
- [20] UV filtry. In: *slozenikosmetiky.cz* [online]. 2014, 23.04.2014 [cit. 2020-02-10]. Dostupné z: <https://www.slozenikosmetiky.cz/uvfiltry/>.
- [21] BINKS, Bernard P., Paul D.I. FLETCHER, Andrew J. JOHNSON, Ioannis MARINOPOULOS, Jonathan CROWTHER a Michael A. THOMPSON. How the sun protection factor (SPF) of sunscreen films change during solar irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2017, **333**, 186-199 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2016.10.027. ISSN 10106030. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603016307468>
- [22] WHAT IS SPF SUNSCREEN?: Sun Protection Factor Explained. In: *badgerbalm.com* [online]. New Hampshire, 2020 [cit. 2020-02-10]. Dostupné z: <https://www.badgerbalm.com/s-30-what-is-spf-sunscreen-sun-protection-factor.aspx>.
- [23] DUTRA, Elizângela Abreu, Daniella Almança Gonçalves da Costa OLIVEIRA, Erika Rosa Maria KEDOR-HACKMANN a Maria Inês Rocha Miritello SANTORO. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [online]. 2004, **40**(3), 381-385 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1590/S1516-93322004000300014. ISSN 1516-9332.
- [24] PISSARENKO, Andrei a Marc A. MEYERS. The materials science of skin: Analysis, characterization, and modeling. *Progress in Materials Science* [online]. 2019 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2019.100634. ISSN 00796425. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642519301161>.
- [25] Structure And Function Of The Skin. *Clinimed.co.uk* [online]. [cit. 2020-02-10]. Dostupné z: <https://www.clinimed.co.uk/wound-care/wound-essentials/structure-and-function-of-the-skin>
- [26] Jak kůže funguje: Struktura a funkce kůže. *Eucerin.cz* [online]. 2019 [cit. 2020-02-10]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>.
- [27] DAVIS, AARON P., RAFAEL GOVAERTS, DIANE M. BRIDSON a PIET STOFFELEN. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* [online]. 2006, **152**(4), 465-512 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x. ISSN 1095-8339. Dostupné z: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>.
- [28] Arabica and Robusta Coffee Plant: Coffee Plant Overview. *Coffeeresearch.org* [online]. Coffe Research Institute [cit. 2020-02-11]. Dostupné z: <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/coffeeplant.html>.
- [29] Vše o kávě. *Svetkavy.cz* [online]. Praha [cit. 2020-02-11]. Dostupné z: http://www.svetkavy.cz/info_kavovnik.php

- [30] FOLSTAR, P. *The Composition of Wax and Oil in Green Coffee Beans*. Landbouwhogeschool Wageningen. Promotor(en): W. Pilnik, co-promotor(en): H.C. van der Plas. - Wageningen, 1976. ISBN 9789022006139 - 65.
- [31] SOMNUK, Krit, Pichai EAWLEX a Gumpon PRATEEPCHAIKUL. Optimization of coffee oil extraction from spent coffee grounds using four solvents and prototype-scale extraction using circulation process. *Agriculture and Natural Resources* [online]. 2017, **51**(3), 181-189 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/j.anres.2017.01.003. ISSN 2452316X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452316X17303393>.
- [32] BOOKER, Richard a Earl BOYSEN. *Nanotechnology for dummies*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2005. For dummies. ISBN ISBN978-0-7645-8368-1.
- [33] KATZ, Linda M. Nanotechnology and Applications in Cosmetics: General Overview. *Cosmetic Nanotechnology* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2007, 2007-04-12, , 193-200 [cit. 2020-05-19]. ACS Symposium Series. DOI: 10.1021/bk-2007-0961.ch011. ISBN 0-8412-3996-7. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2007-0961.ch011>
- [34] MIHRANYAN, Albert, Natalia FERRAZ a Maria STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics: General Overview. *Progress in Materials Science* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2012, 2007-04-12, **57**(5), 875-910 [cit. 2020-05-19]. ACS Symposium Series. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. ISBN 0-8412-3996-7. ISSN 00796425. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642511001046>.
- [35] RAY, Suprakas Sinha a Reza SALEHIYAN. Overview of nanoparticles and their surface modification. *Nanostructured Immiscible Polymer Blends* [online]. Elsevier, 2020, 2020, , 29-64 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816707-6.00003-1. ISBN 9780128167076. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128167076000031>.
- [36] PANDEY, Rajan Kumar, Vijay Kumar PRAJAPATI a Maria STRØMME. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles: General Overview. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2018, 2007-04-12, **107**(5), 1278-1293 [cit. 2020-05-19]. ACS Symposium Series. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110. ISBN 0-8412-3996-7. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017333949>.
- [37] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1), 952-962 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>.
- [38] MICKOVA, Andrea, Matej BUZGO, Oldrich BENADA, et al. Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(4), 952-962 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1021/bm2018118. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm2018118>.

- [39] VOCETKOVÁ, K., A. MÍČKOVÁ a T. JAROŠÍKOVÁ. Liposomes—their characterisation, preparation and embedding into nanofibers. *Lékař a technika*. 5/2014, roč. 44, s. 11-18, ISSN 0301-5491
- [40] HIMENO, T., Y. KONNO a N. NAITO. Liposomes for Cosmetics. *Cosmetic Science and Technology* [online]. Elsevier, 2017, 2017, , 539-549 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802005-0.00031-8. ISBN 9780128020050. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128020050000318>.
- [41] HADAŠOVÁ, E. Lipozomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, č. 16 [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalnilekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>.
- [42] ZERBINATI, Chiara, Luigi IULIANO, Soodabeh DAVARAN, et al. Cholesterol and related sterols autoxidation: classification, preparation, and applications. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. Elsevier, 2017, 2017, **111**(1), 151-155 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013. ISBN 9780128020050. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917302162>
- [43] LAOUINI, A., C. JAAFAR-MAALEJ, I. LIMAYEM-BLOUZA, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* [online]. 2012, **1**(2), 147-168 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jcsb.2012.1020>.
- [44] MILIĆ, Jela, Bojan ČALIJA, Sanela M. ĐORĐEVIĆ, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Diversity and Functionality of Excipients for Micro/Nanosized Drug Carriers: State of the Art. *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* [online]. Elsevier, 2017, 2017, **1**(2), 95-132 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-804017-1.00004-2. ISBN 9780128040171. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128040171000042>.
- [45] KAPALKA, George M., Bojan ČALIJA, Sanela M. ĐORĐEVIĆ, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Tic Disorders: State of the Art. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents* [online]. Elsevier, 2010, 2010, **1**(2), 291-315 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374927-7.00010-8. ISBN 9780123749277. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749277000108>.
- [46] SASTRI, Vinny R., Bojan ČALIJA, Sanela M. ĐORĐEVIĆ, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Other Polymers: State of the Art. *Plastics in Medical Devices* [online]. Elsevier, 2010, 2010, **1**(2), 217-262 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2027-6.10009-1. ISBN 9780815520276. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815520276100091>.
- [47] LAN, Ching-Hung, Yi-Ming SUN, Sanela M. ĐORĐEVIĆ, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Influence of the surface properties of nano-silica on the dispersion and isothermal crystallization kinetics of PHB/silica nanocomposites: State of the Art. *Materials Chemistry and Physics* [online]. Elsevier, 2017, 2010, **199**(2), 88-

- 97 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2017.06.044. ISBN 9780815520276. ISSN 02540584. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025405841730487X>.
- [48] ZUIDAM, N.J. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York, NY: Springer New York, 2010. ISBN 978-1-4419-1007-3.
- [49] *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research: LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS* [online]. 2012, **3**(2) [cit. 2020-05-19]. ISSN 2229-4619. Dostupné z: <http://www.technicaljournalonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20I SSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [50] MÍČKOVÁ, A., K. TOMÁNKOVÁ, H. KOLÁŘOVÁ, et al. Ultrasonic Shock-Wave as a Control Mechanism for Liposome Drug Delivery System for Possible Use in Scaffold Implanted to Animals with Iatrogenic Articular Cartilage Defects. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2008, **77**(2), 285-289 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.2754/avb200877020285. ISSN 0001-7213. Dostupné z: <https://actavet.vfu.cz/77/2/0285/>.
- [51] VEMURI, Sriram, C.T RHODES, Soodabeh DAVARAN, et al. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetica* [online]. 1995, **70**(2), 95-111 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/0031-6865(95)00010-7. ISSN 00316865. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031686595000107>.
- [52] PIACENTINI, Emma, C.T RHODES, Soodabeh DAVARAN, et al. Encapsulation Efficiency: a review. *Encyclopedia of Membranes* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 2016-8-31, **70**(2), 706-707 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1007/978-3-662-44324-8_1945. ISBN 978-3-662-44323-1. ISSN 00316865. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-44324-8_1945.
- [53] NII, Tomoko, Fumiyoshi ISHII, Soodabeh DAVARAN, et al. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method: a review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, 2016-8-31, **298**(1), 198-205 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.04.029. ISBN 978-3-662-44323-1. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305003029>.
- [54] ZHANG, Yibang, Weibeng NG, Xue FENG, Fangying CAO a Huaxi XU. Lipid vesicular nanocarrier: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **516**(1-2), 225-230 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.011. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316310638>.
- [55] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. Kašpárová, J. Krejčí a P. Vltavská. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2014, č.

- 108, s. 479-482. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf.
- [56] INSTRUMENTS, Malven. STABILITA SUZPENZÍ A DISPERZÍ – PROČ JSOU PARAMETRY JAKO VELIKOST ČÁSTIC, ZETA POTENCIÁL A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI TAK DŮLEŽITÉ?. *Chemagazín*. 2011, XXI, č. 2. Dostupné z: http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf
- [57] © 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.
- [58] YILMAZ, Fulya, Gizem CELEP, Gamze TETIK, Fangying CAO a Huaxi XU. Nanofibers in Cosmetics: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *Nanofiber Research - Reaching New Heights* [online]. InTech, 2016, 2016-10-19, **516**(1-2), 225-230 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.5772/64172. ISBN 978-953-51-2528-0. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/nanofiber-research-reaching-new-heights/nanofibers-in-cosmetics>
- [59] Almetwally, A.A. & El-Sakhawy, Mohamed & Elshakankery, M.H. & Kasem, M.H.. (2017). Technology of nano-fibers: Production techniques and properties - Critical review. *Journal of the Textile Association*. 78. 5-14.
- [60] JUNCOS BOMBIN, Adrian D., Nicholas J. DUNNE, Helen O. MCCARTHY, Fangying CAO a Huaxi XU. Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *Materials Science and Engineering: C* [online]. InTech, 2020, 2016-10-19, **114**(1-2), 225-230 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110994. ISBN 978-953-51-2528-0. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493120307839>.
- [61] SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™: Quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application. *Materials Today*[online]. InTech, 2010, 2016-10-19, **13**(11), 12-14 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1. ISBN 978-953-51-2528-0. ISSN 13697021. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702110701991>
- [62] Yanılmaz, Meltem & Zhang, Xiangwu. (2015). Polymethylmethacrylate/Polyacrylonitrile Membranes via Centrifugal Spinning as Separator in Li-Ion Batteries. *Polymers*. 7. 629-643. 10.3390/polym7040629.
- [63] DOTTO, G.L., J.M.N. SANTOS, E.H. TANABE, D.A. BERTUOL, E.L. FOLETTO, E.C. LIMA a F.A. PAVAN. Chitosan/polyamide nanofibers prepared by Forcespinning® technology: A new adsorbent to remove anionic dyes from aqueous solutions. *Journal of Cleaner Production* [online]. InTech, 2017, 2016-10-19, **144**(11), 120-129 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.01.004. ISBN 978-953-51-

- [64] ANDREANI, Tatiana, Patrícia SEVERINO, Luciana M. DE HOLLANDA, Monica VAZZANA, Selma B. SOUTO, Antonello SANTINI, Amélia M. SILVA a Eliana B. SOUTO. Cancer therapies: applications, nanomedicines and nanotoxicology. *Nanostructures for Cancer Therapy*[online]. Elsevier, 2017, 2017, , 241-260 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/B978-0-323-46144-3.00009-X. ISBN 9780323461443. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032346144300009X>.
- [65] RIEBELING, Christian, Jean-Pascal PIRET, Bénédicte TROUILLER, Inge NELISSEN, Christelle SAOUT, Olivier TOUSSAINT, Andrea HAASE a Eliana B. SOUTO. A guide to nanosafety testing: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *NanoImpact* [online]. Elsevier, 2018, 2017, **10**, 1-10 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.impact.2017.11.004. ISBN 9780323461443. ISSN 24520748. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452074817301180>.
- [66] BONCLER, Magdalena, Marek RÓŻALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Anna PODSEDEK, Cezary WATALA, Olivier TOUSSAINT, Andrea HAASE a Eliana B. SOUTO. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. Elsevier, 2014, 2017, **69**(1), 9-16 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.09.003. ISBN 9780323461443. ISSN 10568719. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871913003006>.
- [67] BAHUGUNA, Ashutosh, Imran KHAN, Vivek K. BAJPAI a Sun Chul KANG. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology* [online]. 2017, **12**(2), 8-2017 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.3329/bjp.v12i2.30892. ISSN 1991-0088. Dostupné z:
<http://www.banglajol.info/bd/index.php/BJP/article/view/30892>.
- [68] MIKROBITESTY. *Milcom-as.cz* [online]. [cit. 2020-05-19]. Dostupné z:
<https://www.milcom-as.cz/vum-a-laktoflora/produkty-laktoflora/mikrobitesty.html>
- [69] MIKROBITESTY: Použití mikrobitestu. In: *Milcom-as.cz* [online]. [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://www.milcom-as.cz/vum-a-laktoflora/produkty-laktoflora/mikrobitesty.html>
- [70] BALÍK, Josef. *Vinařství: (návod do laboratorních cvičení)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-715-7317-5.
- [71] DUŠEK, Jaroslav. *Praktická cvičení z farmakognosie: (návod do laboratorních cvičení)*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2663-5.
- [72] 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. 2020-05-27]. DOI: 10.1007/s11051-019-4484-7. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-019-4484-7>

8 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Zoznam skratiek

Skratka	Význam
DLS	dynamický rozptyl svetla
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
MTT	(3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
M _w	molekulová hmotnosť
PBS	phosphate buffer solution = fosfátový tlmivý roztok o pH = 7,4
PEG	polyethylenglykol
PET	polyetylén
PdI	polydisperzitný index
PHB	Polyhydroxybutyrát
SDS	dodecylsírán sodný
SPF	Sun protecting factor
UV	ultra violet
ZP	zeta potenciál

8.2 Zoznam symbolov

Symbol	Význam
TE	Trolox equivalent