



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA ORGANICKÝCH VLÁKEN S PŘÍDAVKEM
EXTRAKTŮ Z ŘAS**

PREPARATION OF ORGANIC FIBERS WITH THE ADDITION OF ALGAE EXTRACTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Terézia Tuhrinská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1701/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Terézia Tuhrinská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava organických vláken s přídavkem extraktů z řas

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Kultivace vybraných řas a příprava jejich extraktů
- 3) Přídavek vybraných řasových extraktů do organických vláken
- 4) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Terézia Tuhrinská
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca je zameraná na prípravu a charakterizáciu organických vlákien s prímiesou predpripravených extraktov mikrorias a siníc obsahujúcich cenné aktívne zlúčeniny. Teoretická časť popisuje vybrané metabolity mikrorias a siníc, metódy ich analýzy, problematiku enkapsulácie a inkorporácie aktívnych látok do nanovláknien a približuje niektoré metódy ich príprav. V experimentálnej časti práce boli najprv kultivované vybrané kmene zo zbierky CCALA. Následne boli pripravené vodné, etanolové a hexánové extrakty biomasy nakultivovaných aj komerčných rias a siníc. Pripravené extrakty boli spektrofotometricky charakterizované z hľadiska koncentrácie prítomných chlorofylov, karotenoidov, antioxidantov, polyfenolov a celkových proteínov. Extrakty do 96 % etanolu boli navyše podrobené aj presnejšej analýze chlorofylov a karotenoidov pomocou HPLC. Najvyššie antioxidačné aktivity dosahovali vodné extrakty. Pomocou elektrospinningu boli vytvorené nanovlákná zo želatíny s obsahom vybraných extraktov. Pre vytvorené vlákna bol zistený hmotnostný zlomok inkorporovaných látok pochádzajúcich z rias a siníc. Vlákna boli ďalej analyzované TEAC testom antioxidačnej aktivity. Najvýraznejší antioxidačný účinok bol detegovaný pre vlákna s inkorporovaným vodným extraktom sinice *Arthrospira maxima*. Vlákna boli na záver práce testované z hľadiska ich bezpečnosti pri kontakte s ľudskými bunkami. Pri použitom množstve vlákien nebol preukázaný cytotoxický účinok na ľudské keratinocyty a testované materiály je tak možno považovať za bezpečné pre aplikáciu v kozmetike.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Mikroriasy, sinice, kozmetika, extrakty, nanovlákná, elektrostatické zvlákňovanie, želatína, enkapsulácia, antioxidanty, MTT test

ABSTRACT

The presented bachelor thesis is focused on the preparation and characterization of organic fibers with an admixture of pre-prepared extracts of microalgae and cyanobacteria containing valuable active compounds. The theoretical part describes selected metabolites of microalgae and cyanobacteria, methods of their analysis, the issue of encapsulation and incorporation of active substances into nanofibers and presents some methods of their preparation. In the experimental part of this thesis, selected strains from the CCALA collection were first cultured. Subsequently, aqueous, ethanol and hexane extracts of biomass from cultured and commercial microalgae and cyanobacteria were prepared. The prepared extracts were spectrophotometrically evaluated in terms of the concentration of chlorophylls, carotenoids, antioxidants, polyphenols, and total proteins present. In addition, 96 % ethanol extracts were subjected to more accurate analysis of chlorophylls and carotenoids by HPLC. The highest antioxidant activity was observed for aqueous extracts. Gelatin nanofibers containing selected extracts were formed by electrospinning method. The formed fibers were examined afterwards to identify a mass fraction of incorporated microalgal and cyanobacterial substances. The fibers were further tested for antioxidant activity with the TEAC assay. The most pronounced antioxidant effect was detected for the fiber with incorporated aqueous extract of the cyanobacterium *Arthrospira maxima*. Finally, the fibers were tested for their safety in contact with human cells. The amount of fibers used did not show any cytotoxic effect on human keratinocytes and the tested materials can thus be considered safe for application in cosmetics.

KEY WORDS

Microalgae, cyanobacteria, cosmetics, extracts, nanofibers, electrospinning, gelatin, encapsulation, antioxidants, MTT test

TUHRINSKÁ, Terézia. Příprava organických vláken s přidavkem extraktů z řas [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-28]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131497>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som použila správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa rada poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce pani Ing. Andrei Němcovej, Ph.D., za odborné vedenie práce, a tiež za jej čas, ochotu a trpezlivosť. Ďalej by som sa chcela poďakovať mojej konzultantke Ing. Renate Pavelkovej za pomoc a cenné rady pri experimentálnej časti práce, ako aj Ing. Martinovi Szotkowskému. Vďaka patrí aj Fakulte chemickej za vytvorenie pracovných podmienok a príležitosti realizovať laboratórnu prácu V neposlednom rade by som sa rada poďakovala mojej rodine a priateľom za podporu počas celého trvania štúdia a tiež jeho umožnenie.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Riasy	10
2.1.1	Vybrané mikroriasy	10
2.2	Sinice	11
2.3	Princípy kultivácie mikrorias a siníc	12
2.3.1	Podmienky úspešnej kultivácie	12
2.4	Aplikácia metabolitov rias a siníc v kozmetike	13
2.4.1	Účinky biologicky aktívnych metabolitov rias	13
2.5	Vybrané metabolity rias a siníc	14
2.5.1	Pigmenty	14
2.5.2	Karotenoidy	15
2.5.3	Lipidy	17
2.5.4	Polysacharidy	17
2.5.5	Proteíny	18
2.5.6	Fenolické zlúčeniny	18
2.5.7	Vitamíny	19
2.5.8	Vitamíny rozpustné v tukoch	19
2.5.9	Vitamíny rozpustné vo vode	20
2.6	Metódy analýzy metabolitov rias	20
2.6.1	Extrakcia	21
2.6.2	Chromatografia	21
2.6.3	UV-VIS spektrofotometria	22
2.6.4	Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity	23
2.7	Nanomateriály pre enkapsuláciu aktívnych zlúčenín	23
2.7.1	Význam nosičových systémov a enkapsulácie	23
2.7.2	Druhy enkapsulácie	24
2.7.3	Nanomateriály v kozmetickom priemysle	24
2.7.4	Nanovlákná	24
2.7.5	Aplikácie nanovláknien v kozmetike	25
2.7.6	Inkorporácia aktívnej látky do nanovlákná	25
2.7.7	Metódy prípravy nanovláknien	25

2.7.8	Elektrospinning (elektrostatické zvlákňovanie).....	26
2.8	Materiály na výrobu nanovláken	27
2.8.1	Želatína	28
2.9	Analýza cytotoxicity	29
2.9.1	MTT testy.....	29
2.10	Doterajšie výsledky v problematike	29
3	CIELE PRÁCE	30
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1	Použité chemikálie.....	31
4.1.1	Chemikálie použité na kultiváciu siníc a mikrorias.....	31
4.1.2	Chemikálie použité na prípravu extraktov a ich charakterizáciu.....	31
4.1.3	Chemikálie použité na prípravu organických vlákien	32
4.1.4	Chemikálie použité na kultiváciu keratinocytov a na MTT test	32
4.2	Použité prístroje a pomôcky	32
4.3	Použité kmene rias a siníc	33
4.4	Použité humánne bunkové kultúry	33
4.5	Kultivácia mikrorias a siníc	33
4.6	Spracovanie biomasy	35
4.7	Príprava extraktov z mikrorias a siníc	35
4.7.1	Príprava vodných a etanolových extraktov	35
4.7.2	Príprava hexánových extraktov podľa Soxhleta	35
4.8	Analýza extraktov z mikrorias a siníc	36
4.8.1	Celková výtťažnosť extraktov.....	36
4.8.2	Meranie absorpčného spektra extraktov pomocou UV-VIS spektrofotometrie	36
4.8.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity spektrofotometricky metódou TEAC ...	37
4.8.4	Stanovenie polyfenolov spektrofotometricky	37
4.8.5	Stanovenie proteínov podľa metódy Hartree-Lowryho	37
4.8.6	Stanovenie karotenoidov a chlorofylov pomocou HPLC	38
4.9	Príprava a charakterizácia vlákien	38
4.9.1	Príprava pracovných roztokov želatíny na zvlákňovanie	39
4.9.2	Zvlákňovanie roztokov metódou elektrospinningu	39
4.9.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity vlákien metódou TEAC.....	40

4.9.4	Stanovenie efektivity zvlákňovania	40
4.9.5	Testovanie rýchlosti rozpúšťania vlákien	40
4.10	Testovanie cytotoxicity vlákien	40
4.10.1	Kultivácia keratinocytov línie HaCaT	40
4.10.2	Príprava vlákien pre testovanie toxicity	40
4.10.3	MTT test vlákien na keratinocytoch	40
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	42
5.1	Charakteristika extraktov rias a siníc.....	42
5.1.1	Celková výťažnosť extraktov.....	42
5.1.2	Meranie absorpčného spektra extraktov pomocou UV-VIS spektrofotometrie	44
5.1.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou TEAC.....	49
5.1.4	Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky.....	49
5.1.5	Stanovenie celkového obsahu proteínov	51
5.1.6	Stanovenie karotenoidov a chlorofylov pomocou HPLC	51
5.2	Príprava a charakterizácia vlákien	53
5.2.1	Príprava roztokov želatíny na zvláknenie	54
5.2.2	Zloženie vlákien.....	54
5.2.3	Efektivita zvlákňovania	56
5.2.4	Antioxidačná aktivita vlákien	57
5.2.5	Rýchlosť rozpúšťania vlákien	58
5.3	Testy cytotoxicity vlákien	58
6	ZÁVER	61
7	POUŽITÁ LITERATÚRA	63
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	71
9	PRÍLOHY.....	72
9.1	Stanovenie obsahu karotenoidov a chlorofylov z absorpčných spektier	72
9.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou TEAC	74
9.3	Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky	75

1 ÚVOD

Riasy predstavujú jedny z vývojovo najstarších organizmov na Zemi. Počas posledných približne troch miliárd rokov sa riasy prispôbali rôznym prostrediam, často aj extrémne náročným a vysoko konkurenčným tým, že vyrábali celý rad látok a sekundárnych metabolitov pre svoju chemickú ochranu, a všetku svoju bunkovú aktivitu zameriavali na produkciu potrebných živín a zlúčenín. Preto sú riasy schopné žiť v širokej škále ekologických ník [1].

Riasy tvoria rezervoár prírodných bioaktívnych látok komerčnej hodnoty. Ich biomasa obsahuje široké spektrum živín a sekundárnych metabolitov, ako sú napríklad polysacharidy, aminokyseliny, vitamíny, terpény, fenolické zlúčeniny či rozličné lipidy. Mnohé z nich sú riasami syntetizované za účelom ochrany pred svetelným a oxidačným poškodením spôsobeným nepriaznivými podmienkami prostredia. Behom posledných desaťročí boli z rias izolované mnohé z týchto zlúčenín, za účelom ich využitia ako funkčných ingrediencií v rozmanitých odvetviach ľudskej činnosti. Vysoký obsah cenných bioaktívnych zložiek v riasach sa začal aplikovať v oblastiach, ako sú potravinárstvo, medicína, kozmetika a biotechnológie. Stále sa rozširujúci trh s výrobkami starostlivosti o pleť a neustále požiadavky na hľadanie inovatívnych prísad šetrných k životnému prostrediu viedli v posledných rokoch k vývoju množstva kozmetických výrobkov založených na extraktoch získaných z rias.

U niektorých riasových metabolitov boli zistené schopnosti optimalizovať vlastnosti a stabilitu zloženia kozmetických produktov. Pre iné látky boli zas pozorované priaznivé účinky na stav pokožky, ako napríklad účinky zmierňujúce starnutie pokožky a antioxidačné, protizápalové či antibakteriálne vlastnosti [2].

Aby bol efekt týchto bioaktívnych látok na ľudský organizmus čo najúčinnnejší, je dôležité zachovať ich stabilitu. Riešenie tohto problému ponúkajú enkapsulačné nanomateriály, ktorých malé rozmery umožňujú lepšiu penetráciu kožou a zlepšujú tak biologickú dostupnosť aktívnych látok v požadovanom mieste účinku. Preto nosičové systémy či mikrokapsuly a nanokapsuly dnes hrajú dôležitú úlohu v kozmetickom priemysle. Nanovláknové systémy enkapsulácie pre účinné látky umožňujú kontrolované a cielené uvoľňovanie inkorporovanej bioaktívnej komponenty, ochranu účinných látok, zlepšenie ich stability a tiež ich bezpečné dodávanie na požadované miesto účinku. Nanočasticové technológie s riadeným uvoľňovaním zložky sa používajú na postupné dodávanie zlúčenín do pokožky v predpísaných množstvách. Okrem toho zlepšujú účinnosť a bezpečnosť kozmetických produktov [3]. Kontakt rôznych nanočastíc či nanovláknien s ľudským organizmom vyžaduje, aby ich pôsobenie bolo netoxické a tiež, aby tieto materiály boli biologicky odbúrateľné. Biodegradabilné nanočastice a vláknové transportné systémy sa využívajú aj na rôzne potravinárske účely, najmä na enkapsuláciu s cieľom zlepšenia senzorických vlastností potravín či zvýšenia biologickej dostupnosti nutričov [4].

Cieľom tejto bakalárskej práce je príprava a využitie extraktov z vybraných rias obsahujúcich cenné metabolity a ich následná aplikácia do vyvíjaných organických vlákien.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Riasy

Riasy (*Algae*) patria k najjednoduchším a vývojovo najstarším organizmom na Zemi. Jedná sa o komplexnú, morfológicky rozličnú skupinu eukaryotických organizmov, pričom niektoré z nich sú mikroskopické (jedno či mnohobunkové), iné makroskopické s komplexnou stavbou tela. Ide predovšetkým o vodné organizmy, vo väčšine o autotrofov schopných fotosyntézy, majú teda význam primárnych producentov organickej hmoty. Riasy sa systematicky zaraďujú medzi nižšie rastliny, vzhľadom na to, že ich telo je tvorené len jednoduchou stielkou neobsahujúcou pravé pletivá. Je pre nich charakteristická široká rozmanitosť veľkostí organizmov, od pikoplanktónu, až k makroskopickým morským riasam, ktoré môžu dosahovať dĺžky niekoľkých desiatok metrov [1].

Mikroriasy sa nachádzajú vo všetkých ekosystémoch. V morských vodách tvoria súčasť fytoplanktónu. Riasy a sinice okrem vodných prostredí (moria, rieky, jazerá) osídľujú aj suchozemské prostredia, sú rozšírené v rozmanitých biotopoch, napríklad v pôde a na skalách. Existujú aj v symbiotických vzťahoch s inými rastlinami, hubami a živočíchmi (exo a endosymbióza). Rôzne druhy sú schopné produkovať toxíny, iné užitočné bioaktívne zlúčeniny, ďalšie sú zas parazitické. Sinice a riasy sú aj dôležitými ukazovateľmi kvality vody [5], [6].

2.1.1 Vybrané mikroriasy

V taxonomickom systéme patria riasy medzi eukaryotické organizmy, bunky rias obsahujú pravé bunkové jadro a ďalšie biomembránové štruktúry. Systematické delenie rias je pomerne komplexné a nie je uzavreté. Moderné molekulárne metódy ukazujú, že riasy netvoria spojitú skupinu organizmov, ale viacero oddelených samostatných vývojových línií. Riasy sú často klasifikované do niekoľkých hlavných skupín na základe toho, aké fotosyntetické pigmenty obsahujú. Zelené riasy (oddelenie *Chlorophyta*), do ktorého patrí napríklad trieda rias *Chlorophyceae*, obsahujú chlorofyl *a* a *b*, okrem nich aj β -karotén a rôzne xantofyly. Hnedé riasy (*Phaeophyceae*) obsahujú chlorofyl *a*, chlorofyl *c* a farbivo fukoxantín, ktoré je zodpovedné za ich výraznú zelenohnedú farbu. Červené riasy (*Rhodophyta*, *Rhodophyceae*) obsahujú chlorofyly *a* a *d*, spolu s pigmentmi fykoerytrín a fykocyanín [6].

Mnohé výskumy preukazujú, že mnohé riasy sú bohatým zdrojom vitamínov, minerálov, aminokyselín a proteínov, jódu a ďalších prospešných látok pre človeka. Z týchto dôvodov sú v súčasnosti využívané v mnohých odvetviach, ako napríklad na pomoc pri hodnotení environmentálnych podmienok, v poľnohospodárstve či potravinárstve, v rôznych biotechnológiách, vo farmaceutickom priemysle a v neposlednom rade v kozmeticknej produkcii [7].

2.1.1.1 *Chlorella*

Rod *Chlorella* patrí do oddelenia *Chlorophyta* (zelené riasy), ktoré predstavuje zložito diferencovanú vývojovú vetvu. Pre zelené riasy je charakteristická rozmanitosť v stavbe stielok, ich hlavnou zásobnou látkou je škrob uložený v chloroplastoch. V rámci tohto oddelenia sa *Chlorella* systematicky zaraďuje do triedy *Chlorophyceae* (zelenivky). *Chlorella* je známa ako biotechnologicky významná riasa už niekoľko desaťročí, často sa pestuje vo veľkoobjemových kultúrach. Získaná biomasa sa upravuje na použitie pre rôzne účely, napríklad ako doplnok stravy, ako prísada do kozmetických výrobkov, alebo ako prírodné liečivo [1].

Chlorella je jednobunková sladkovodná riasa s kokálnymi bunkami o veľkosti okolo 2 až 10 μm , ktoré majú pevnú polysacharidovú bunkovú stenu. Je charakteristická výnimočne širokým spektrom a vysokým obsahom makroživín aj minerálnych látok, ktorých výška zastúpenia závisí najmä na podmienkach kultivácie [6].

Chlorella predstavuje bohatý zdroj niektorých esenciálnych aminokyselín. Konkrétne ide o lyzín, fenylalanín, treonín, izoleucín, metionín, valín, tryptofán a hlavne leucín, ktorý má z nich najvyššie zastúpenie [8]. Aminokyseliny hydratujú pokožku, preto sa výťažky z *Chlorelly* aplikujú do rôznych hydratačných pleťových krémov. V kozmetickom odvetví je najčastejšie používaná *Chlorella*

vulgaris, ktorá obsahuje v priemere približne 12–17 % sacharidov, 14–22 % lipidov a 51–58 % proteínov (hmotnostné percentá v sušine) [7]. Oproti iným rastlinám a riasam obsahuje veľké množstvo chlorofylu obsahujúceho horčík, vďaka čomu je *Chlorella* jeho bohatým zdrojom.

Z vitamínov je potrebné spomenúť hlavne vysoký obsah vitamínov skupiny B, a to najmä B₂, B₃ a B₁₂ [9]. Ďalším významným metabolitom *Chlorelly* je luteín a β -karotén, ktoré patria medzi karotenoidy s antioxidačnými účinkami, v rias *Chlorella vulgaris* bol zistený v minulosti obsah približne 950 μ g luteínu a 66 μ g β -karoténu na 1 g sušiny [10]. Medzi látky s antioxidačným efektom, ktoré syntetizuje *Chlorella*, vo významných množstvách patrí okrem iných aj vitamín C a E [11].

V biomase tejto riasy sa hojne vyskytujú polysacharidy beta-1,3-glukány, ktoré sú obsiahnuté najmä v bunkovej stene rias [12]. *Chlorella* obsahuje špecifický rastový faktor CGF („*Chlorella* Growth Factor“), ktorý je komplexom látok z bunkového jadra. V určitých pomeroch sú v ňom zmiešané peptidy, proteíny, polysacharidy, β -glukány, nukleové kyseliny a prvky ako síra či mangán. Tento faktor zaisťuje správny rast nových buniek a regeneráciu poškodených buniek. Vďaka výnimočne vysokému zastúpeniu rôznych metabolitov v biomase *Chlorelly* sa využíva extrakt z druhu *Chlorella vulgaris*, ktorý údajne stimuluje syntézu kolagénu a tým podporuje mechanizmus regenerácie tkaniva kože a redukciu vrások (*Dermochlorella*, Codif, St. Malo, France) [7], [13].

2.1.1.2 *Chlamydomonas*

Rod *Chlamydomonas* je bežný bičíkovec stojatých a pomaly tečúcich vôd. Systematicky sa zaraďuje tiež do oddelenia zelených rias (*Chlorophyta*), konkrétne do triedy *Chlamydomophyceae*. Ide o veľmi rozšírený rod, je známych viac ako 400 druhov. *Chlamydomonas* je charakteristický kvapkovým tvarom buniek s dvoma bičíkmi a bunkovou stenou pokrytou glykoproteínovou chlamys [1].

Chlamydomonády je možné efektívne kultivovať na umelých živných pôdach. Vo výskume v oblasti bunkovej a molekulárnej biológie sa využívajú často ako modelové organizmy, napríklad v genetických štúdiách, štúdiách chloroplastov, alebo pri štúdiu reakcií buniek na rôzne podnety z prostredia. Ich sušina môže obsahovať až 50 % proteínov, vďaka čomu tento rod predstavuje aj zaujímavý objekt pre biotechnológie [6]. Pri druhu *Chlamydomonas reinhardtii* sacharidy tvoria približne 17 % sušiny a lipidy asi 20 % [12]. Významný je obsah karotenoidov (luteín a β -karotén), ktorý je v druhu *Ch. reinhardtii* ešte vyšší než v biomase rias *Chlorella vulgaris* [10].

Chlamydomonas sa radí k skupinám mikrorias produkujúcich antimikrobiálne látky [14]. Medzi tieto identifikované antimikrobiálne zlúčeniny patria mastné kyseliny, glykolipidy, kyselina akrylová, fenoly, cyklické peptidy, N-glykozidy či sulfátové polysacharidy [2].

2.2 Sinice

Medzi riasy niekedy bývajú zaraďované aj sinice (cyanobaktérie), ktoré tiež môžu fotosyntetizovať, avšak ich bunky sú prokaryotické. Tieto autotrofné organizmy sa vyznačujú jednobunkovou alebo vláknitou stielkou. Fotosyntetické pigmenty (chlorofyl *a*, β -karotén, xantofyly a fykobilíny) sú uložené v tylakoidoch voľne uložených v plazme. Sinice majú fotosyntézu rastlinného typu, teda spojenú s produkciou kyslíku, ide o najstaršie organizmy s fotosyntézou tohto typu. Niektoré druhy majú v kombinácii s oxygénovou fotosyntézou aj schopnosť fixovať molekulárny dusík a redukovať ho na amónne soli. Hlavnou zásobnou látkou je sinicový škrob (α -1,4-glukán). Bunková stena siníc je tvorená z peptidoglykánu mureínu a kyseliny daminopimelovej. Radia sa medzi gramnegatívne baktérie [1], [15].

Sinice sú v prírode takmer všade prítomné, a vďaka výborným adaptačným mechanizmom osídľujú aj prostredia s extrémnymi podmienkami. Tieto mikroorganizmy stále častejšie nachádzajú využitie v biotechnologických produkciách, najmä z dôvodu vysokého obsahu proteínov v ich sušine (dosahuje priemerne 60–70 %) [6].

2.2.1.1 *Arthrospira (Spirulina)*

Arthrospira (tzv. *Spirulina*) je vláknitá sinica, ktorá sa systematicky zaraďuje do triedy *Cyanophyceae*, v rámci tejto triedy do rádu *Oscillatoriales* [1]. Ide o jednobunkový organizmus, ktorý vytvára rozsiahle kolónie špirálovitého tvaru. Okrem chlorofylu obsahuje aj veľké množstvo modrého pigmentu fykocyanínu, vďaka čomu sa často *Arthrospira* označuje aj ako modrozelená riasa. Tento pigment sa využíva ako netoxické farbivo. Jej prirodzeným prostredím sú sladké vody s vyššou salinitou a pomerne vysokým pH (v rozmedzí 8–11). Optimálna teplota vody je pre rod *Arthrospira* medzi 32 až 45 °C, no dokáže prežiť aj vyššie teploty [11].

Spirulina je známa ako zdroj bohatý na široké spektrum živín. Približne 65 až 71 % jej hmotnosti (v závislosti na podmienkach prostredia) je tvorená komplexnými proteínmi, ktoré sú produkované veľkým množstvom ribozómov. Profil zloženia proteínov je vyvážený, táto sinica produkuje všetky esenciálne aminokyseliny vo vzájomne priaznivých pomeroch. Okrem toho je v biomase týchto siníc zastúpených ďalších 10 neesenciálnych aminokyselín. *Arthrospira* sa vďaka týmto vlastnostiam využíva aj v kozmetickom priemysle vo forme extraktu s vysokým obsahom proteínov, ktorý zmierňuje príznaky skorého starnutia pokožky, má sťahujúci účinok a zabraňuje tvorbe strií (firma Protulines, Exsymol S.A.M., Monaco) [13]. *Arthrospira* produkuje celý rad ďalších nutrične, farmaceuticky či kozmeticky významných zlúčenín, medzi najdôležitejšie z nich patria polynenasýtené mastné kyseliny [7], [11].

Arthrospira dokáže vytvárať z minerálnych prvkov a aminokyselín cheláty, ktoré je telo schopné vstrebávať. Dôležitá je najmä vysoká koncentrácia zinku, ktorý podporuje zdravý tonus a regeneračné schopnosti pokožky, a v neposlednom rade aj vysoký obsah železa. Okrem toho táto sinica produkuje niekoľko druhov vitamínov skupiny B, z ktorých vitamín B₁₂ je najhojnejší. Vysušená biomasa *Spiruliny* sa preto využíva ako doplnok stravy vo forme tabliet. Tak ako iné typy mikrorias, aj *Arthrospira* je dobre zásobená látkami so silnými antioxidačnými vlastnosťami, akými je napríklad vitamín E či rôzne karotenoidy (hlavne luteín a β-karotén spolu s kryptoxantínom, čo sú dva prekurzory vitamínu A) [11], [12].

2.3 Princípy kultivácie mikrorias a siníc

Striktne autotrofné riasy pre svoj rast potrebujú svetlo, CO₂, vodu, živiny (predovšetkým dusík a fosfor) a stopové prvky. Pomocou fotosyntézy je potom riasa schopná syntetizovať všetky ostatné zlúčeniny potrebné pre rast. Avšak veľká časť rias nie je schopná syntetizovať určité esenciálne zlúčeniny (napr. niektoré vitamíny), preto je nutné dodať ich do živného média. Najdôležitejšie parametre ovplyvňujúce rast rias sú množstvo a kvalita živín, svetlo, pH, salinita a teplota. Optimálne parametre a tolerované rozsahy sú kmeňovo špecifické; rôzne parametre môžu byť vzájomne závislé a parameter, ktorý je optimálny pre jednu skupinu podmienok, nemusí byť nevyhnutne optimálny pre druhú. Aby bola kultivácia úspešná, je nutné vybrať vhodné živné médium. Riasy sa pestujú v médiách s kontrolovaným obsahom živín [15].

2.3.1 Podmienky úspešnej kultivácie

Najvýznamnejším faktorom pri kultivácii rias je svetlo, pretože fotosyntetická produktivita riasových kultúr je ovplyvnená najmä svetelným režimom. Množstvo svetla absorbované bunkou riasy závisí na kombinácii niekoľkých parametrov. Ide o intenzitu svetla, hustotu buniek, hrúbku vrstvy kultúry a v neposlednom rade o intenzitu miešania. Dostatočná cirkulácia kultúry je nevyhnutná, hlavne ak ide o husté submerzné algakultúry. Dôkladným miešaním sa zaistí dostatočné vystavenie jednotlivých buniek svetlu a zároveň nedochádza k usádzaniu biomasy. Pri intenzívnom miešaní je zabezpečený aj vyvážený prísun živín, regulácia teploty a výmena plynov (O₂/CO₂). Kľúčovou podmienkou je dostatočné dodávanie CO₂ ako zdroja uhlíku. Takéto husté, intenzívne miešané kultúry mikrorias predstavujú umelý systém, ktorý sa v laboratórnych podmienkach a v biotechnologických výrobných používa na produkciu biomasy [15], [16].

2.4 Aplikácia metabolitov rias a siníc v kozmetike

Ukazuje sa, že mnohé z biologicky aktívnych zložiek v riasach sú účinnými prírodnými alternatívami k zlúčeninám na báze syntetických chemikálií, ktoré sa v súčasnosti nachádzajú v mnohých kozmetických výrobkoch. Aj keď hlavný výskum bioaktívnych zložiek a ich aplikácií vyšiel zo štúdia makrorias, v poslednej dobe sa tento výskum rozšíril aj na mikroskopické riasy, ktoré sa dajú ľahšie kultivovať [2], [13].

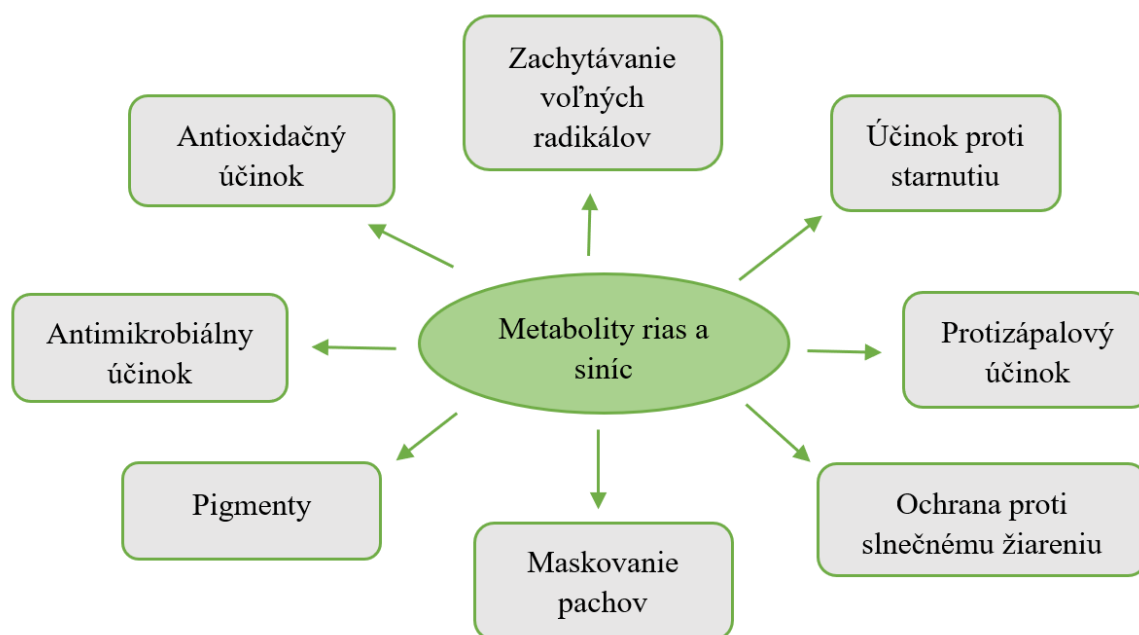
Výťažky z rias sa môžu použiť v kozmetike rôznymi spôsobmi, a to ako pomocné látky pri formulácii produktov (napr. ako stabilizátor alebo emulgátor) alebo ako samotné funkčné látky, ktoré dodávajú výrobkom špecifické vlastnosti a účinky.

2.4.1 Účinky biologicky aktívnych metabolitov rias

Riasy sú rovnako ako všetky fotosyntetické rastliny vystavované kombinácii svetla a vysokej koncentrácii kyslíka, čo vedie k tvorbe voľných radikálov a rôznych silných oxidačných činidiel (tzv. ROS, teda reactive oxygen species). Tieto zlúčeniny majú potenciál poškodiť štruktúru a funkciu buniek. Avšak neprítomnosť takého poškodenia v riasach naznačuje, že musia mať silné ochranné antioxidantné systémy schopné zachytávať voľné radikály, ktoré tak pôsobia proti nepriaznivým účinkom týchto vplyvov. Darovaním elektrónu antioxidanty neutralizujú voľné radikály, ktoré by inak oxidovali biomolekuly, čo by viedlo k bunkovej smrti a poškodeniu tkaniva. Mnohé štúdie dospeli k záveru, že niekoľko rodov rias obsahuje silné antioxidanty, lipofilnej aj hydrofilnej povahy [17], [18].

Environmentálne faktory ako UV žiarenie, vietor a smog v kombinácii s oxidatívnym stresom, chronologickým starnutím a degeneráciou bariéry pokožky prispievajú k vzniku jemných vrások, pigmentácie, slnečných škvrn a zvýšenej hrubosti pokožky. Všetky tieto prejavy sú charakteristické pre starnúcu pokožku. Koža je vybavená komplexným antioxidantným systémom, ktorý ju chráni pred oxidačným poškodením v dôsledku vnútorných a vonkajších faktorov. Avšak ten môže byť oslabený či poškodený. Bolo dokázané, že lokálne aplikované antioxidanty chránia pokožku pred oxidačným stresom a pred poškodením voľnými radikálmi, ktoré sa tvoria vnútorne normálnym bunkovým metabolizmom alebo pôsobením UV žiarenia. Rôzne metabolity rias sa preto používajú v omladzujúcej pľeťovej kozmetike, keďže vďaka svojmu antioxidantnému účinku sú schopné bojovať proti príznakom starnutia kože [13], [19]. Antioxidanty z rias navyše môžu pomôcť udržiavať organoleptické vlastnosti kozmetických alebo potravinových výrobkov inhibíciou oxidácie lipidov, čím sa zabráni zmenám vzhľadu a vône či chuti [20], [21].

Okrem antioxidantných vlastností majú mnohé zlúčeniny produkované riasami výživné, zjemňujúce a revitalizačné účinky na pokožku. Extrakty z mikrorias môžu obsahovať rôzne bioaktívne látky, ktoré urýchľujú proces regenerácie poškodenej pokožky a udržiavajú jej vlhkosť [22]. To možno využiť v starostlivosti o pľeť, predovšetkým pri vyhladzovaní vrások, či pri hydratácii pokožky. Takéto výťažky z mikrorias sa nachádzajú hlavne v krémoch proti starnutiu, v rôznych osviežujúcich či regeneračných prípravkoch, alebo majú v produktoch funkciu emolientu. V poslednom desaťročí sa čoraz väčšia pozornosť venuje aj skríningu mikrorias na obsah antibiotík a farmakologicky aktívnych zlúčenín [7]. Bolo zistené, že rozličné sekundárne metabolity izolované z rias môžu taktiež pôsobiť antimikrobiálne, protizápalovo, alebo môžu vykazovať protirakovinové účinky. Niektoré tieto účinky riasových metabolitov sú efektívne aj pri prevencii vzniku či liečbe akné [22], [23]. Prehľad možných účinkov a funkcií rozličných metabolitov uvádza schéma, vid' Obrázok 1.



Obrázok 1: Potenciálne výhody aktívnych zložiek odvodených z rias a siníc v starostlivosti o pokožku, prevzaté a upravené z [13]

2.5 Vybrané metabolity rias a siníc

Riasy a sinice syntetizujú mnohé aktívne zlúčeniny rôznych chemických štruktúr a vlastností. Rozličné primárne metabolity rias, ako napríklad lipidy, polysacharidy či proteíny a ich jednotlivé aminokyseliny, ale aj mnohé sekundárne metabolity rias vykazujú celý rad potenciálne využiteľných účinkov. U riasových pigmentov a fenolických zlúčenín ide najmä o ich antioxidačné vlastnosti a ochranné pôsobenie voči účinkom UV žiarenia, pri vybraných polysacharidoch produkovaných riasami sú zas atraktívne ich dispergačné a gélotvorné účinky. Niektoré polysacharidy sa navyše vyznačujú imunomodulačnými a protinádorovými schopnosťami. Ďalšie zlúčeniny, ako chlorofyly či rôzne vitamíny, poskytujú protizápalové a antibakteriálne vlastnosti a môžu urýchľovať procesy hojenia. Hydratáciu pokožky môžu ovplyvňovať dôležité aminokyseliny. Medzi metabolity rias, ktoré majú vplyv na hladiny kolagénu v ľudskej koži a tým výrazne prispievajú k jej celkovému vzhľadu a stavu, patrí napríklad vitamín C alebo polysacharidy β -glukány či laminaríny [21], [22], [23].

2.5.1 Pigmenty

Medzi riasami sa vyskytujú tri hlavné triedy fotosyntetických pigmentov: chlorofyly, karotenoidy (karotény a xantofyly) a fykobilíny. Chlorofyly a karotény sú všeobecne molekuly rozpustné v tukoch a je možné ich extrahovať z tylakoidných membrán organickými rozpúšťadlami, ako je acetón, metanol alebo DMSO. Fykobilíny sú naopak lepšie rozpustné vo vode [5]. V siniciach je prítomný z chlorofylov len chlorofyl *a*. Okrem neho produkujú sinice aj β -karotén a niekoľko xantofylov, medzi nimi napríklad zeaxantín. Pomer červeného pigmentu fykoerytrínu s modrými pigmentmi allofykocyanínu a *c*-fykocianínu určuje výslednú farbu sinicovej bunky. Tieto fykobiliproteíny tvoria prídavnú svetlozbernú anténu na povrchu tylakoidov. Niektoré druhy siníc syntetizujú pigment scytonemín na ochranu pred intenzívnym UV žiarením [1], [5].

2.5.1.1 Chlorofyly

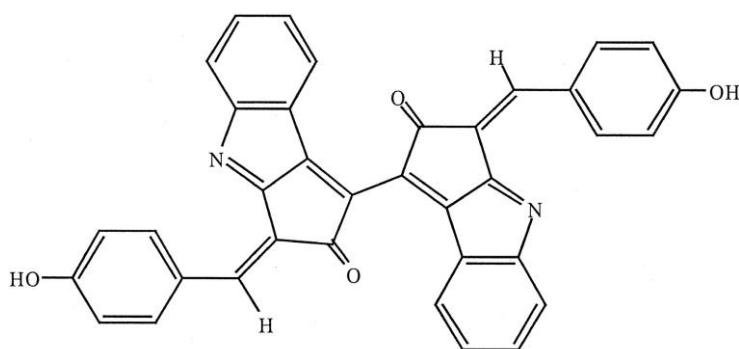
Existujú štyri typy chlorofylu: chlorofyl *a*, ktorý sa nachádza vo všetkých fotosyntetizujúcich vyšších rastlinách, riasach aj siniciach; chlorofyl *b*, ktorý sa nachádza vo vyšších rastlinách a zelených riasach; chlorofyl *c*, ktorý sa nachádza v rozsievkach, dinoflagelátoch a hnedých riasach; a chlorofyl *d*, ktorý sa nachádza iba v červených riasach [6]. Chlorofyly sú komplexné žlté až tmavozelené tetrapyrrolové cyklické pigmenty. Chlorofyl *a* je nevyhnutnou súčasťou fotosyntézy a hrá v tomto procese ústrednú úlohu. Jedná sa o zelené farbivo uložené v membráne tylakoidov s tetrapyrrolovou cyklickou

komplexnou štruktúrou. Tento tzv. porfyrinový kruh centrálne viaže horčík vo forme Mg^{2+} [24]. Chlorofyl má schopnosť potlačovať a maskovať telesné pachy. Z tohto dôvodu sa chlorofylové extrakty z *Chlorelly* využívajú v dezodorantoch a iných hygienických produktoch, ako sú zubné pasty či ústne vody [13]. Riasový chlorofyl vykazuje aj protizápalové, antibakteriálne a hojivé vlastnosti [11].

2.5.1.2 Scytonemín

Scytonemín je žltohnedý pigment rozpustný v tukoch, ktorý vykazuje vysokú stabilitu. Vylučuje a ukladá sa v extracelulárnych polysacharidových obaloch niektorých siníc. Štruktúrne ide o aromatický indolový alkaloid zložený z dvoch identických kondenzačných produktov podjednotiek odvodených od tyrozínu a tryptofanu, spojených väzbou uhlík-uhlík. Sinice produkujú scytonemín na ochranu pred poškodením UV žiarením. Samotná syntéza je indukovaná UV-A žiarením. Tento pigment účinne chráni bunky pred dopadajúcim žiarením z oblasti blízkeho UV a modrým žiarením, ale nie pred zeleným alebo červeným svetlom, ktoré sú potrebné na fotosyntézu. Absorbuje väčšinu UV žiarenia skôr, ako sa dostane do fotosystému a zabráni tak jeho poškodeniu v dôsledku intenzívneho UV žiarenia. Pri nadmernom oxidatívnom strese (zvýšená intenzita žiarenia) sa môže produkcia scytonemínu sinicami zvýšiť [25].

Scytonemín extrahovaný zo siníc sa používa ako kozmetická prísada v kombinácii s kyselinou askorbovou v ochranných krémoch proti UV žiareniu, pretože preukázal antioxidačnú aktivitu v rôznych testoch. Má tiež možné medicínske aplikácie vďaka protizápalovej a antiproliferatívnej aktivite [26].



Obrázok 2: Štruktúra scytonemínu, prevzaté z [25]

2.5.2 Karotenoidy

Karotenoidy, štruktúrne patriace medzi tetraterpény (druh terpenoidov), sa radia medzi dôležité zlúčeniny v kozmetickom priemysle. Majú charakter lipofilných farbív. Karotenoidy sú nenasýtené alifatické a alicyklické uhľovodíky a ich oxidačné produkty. Môžu byť klasifikované podľa prítomnosti alebo neprítomnosti atómov kyslíka v molekulárnej štruktúre na xantofyly a karotény (bezokyslíkaté). V molekule obsahujú dlhý systém (3 až 11) konjugovaných dvojitéch väzieb. Táto polyénová štruktúra karotenoidov im dodáva farebnosť (žlté, oranžové až červené sfarbenie). Väčšinou sú v konfigurácii all-trans, teda všetky dvojité väzby majú konfiguráciu trans. Táto priestorová konfigurácia je termodynamicky najvýhodnejšia [27].

Karotenoidy sú schopné absorbovať nadmerné UV žiarenie, viazať voľné radikály, čím pôsobia ako dôležité antioxidačné systémy mikrorias. Navyše ako prírodné farbivá môžu poskytovať pokožke estetické zafarbenie. Tieto zlúčeniny taktiež zrýchľujú hojenie poškodenia pokožky a bránia rozvoju neoplastických zmien. V súčasnosti kozmetický priemysel používa karotenoidy v mnohých druhoch výrobkov. Používajú sa ako filtre na ochranu pred UV žiarením, v rôznych prípravkoch proti starnutiu kože, vo forme krémov zlepšujúcich tón pleti alebo ako bronzery [13], [28].

2.5.2.1 β -karotén

β -karotén je izoprenoidný oranžovo-žltý pigment so 40 atómami uhlíku, a predstavuje jeden z prekursorov vitamínu A. Má výrazné antioxidačné účinky. Okrem neutralizačného účinku na singletový kyslík má schopnosť minimalizovať negatívny vplyv aj iných reaktívnych druhov oxidačných činidiel [11], [28]. Jedno z najvyšších zastúpení tohto karotenoidu z rias má halofilná jednobunková zelená riasa z triedy zeleniviek (*Chlorophyceae*) *Dunaliella salina*, ktorá akumuluje až 12 % β -karoténu v suchej hmote. *Spirulina* tiež produkuje vysoké množstvá tohto antioxidantu. β -karotén mikrorias sa skladá prevažne z all-trans a 9-cis izomérov [12].

β -karotén je nevyhnutný pre optimálnu tvorbu buniek pokožky. Okrem toho prispieva aj k rýchlej regenerácii epidermy. Zlepšuje tiež vzhľad suchej alebo poškodennej pokožky minimalizovaním odlupovania a obnovením pružnosti. Kozmetické prípravky s obsahom β -karoténu sú schopné upokojiť podráždenie od slnka, znižovať škodlivé účinky žiarenia a zmenšovať prejavy procesu starnutia pokožky vplyvom slnečného žiarenia. V kozmetickom priemysle sa β -karotén používa na prípravu pleťových vôd po holení, kúpeľových výrobkov, čistiacich prostriedkov, make-upu, kondicionérov na vlasy, šampónov, rozmanitých výrobkov na starostlivosť o pleť a v opaľovacích prípravkoch. Tento pigment taktiež dodáva kozmetickým výrobkom oranžové zafarbenie [28], [29].

2.5.2.2 Astaxantín

Astaxantín je hlavným karotenoidom z podskupiny xantofylov, vyskytuje sa napríklad u riasy *Haematococcus pluvialis*. Významnými producentmi sú aj *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella salina*, *Chlorococcum* sp. a celá rada ďalších zelených rias. Ide o červený pigment s výnimočnými antioxidačnými vlastnosťami, silnejšími ako pri vitamíne C a E alebo u iných karotenoidov.

Astaxantín je považovaný za najsilnejší prírodný antioxidant, jeho schopnosť zachytávať voľné radikály je vysoko účinná. Pomocou jeho konjugovaných dvojitéch väzieb je neutralizovaný singletový kyslík. V ľudskom metabolizme je astaxantín tiež dôležitý pre ochranu pokožky pred fotooxidáciou indukovanou UV žiarením, takže ho možno použiť v prírodnej opľovacej kozmetike na ochranu pred slnečným žiarením. Bolo dokázané, že astaxantín funguje ako ochranný nástroj voči zmenám indukovaným UV-A žiarením vo fibroblastoch ľudskej kože, ktoré sú dôležité pre produkciu kolagénu. Uvádza sa, že astaxantín môže potlačovať hyperpigmentáciu kože, inhibovať syntézu melanínu a zlepšovať stav všetkých kožných vrstiev – lokálnou aj orálnou aplikáciou [12], [13], [30].

2.5.2.3 Luteín

Luteín sa radí medzi xantofyly, ide o metabolit napríklad rias rodov *Scenedesmus* a *Chlorella*. Jeho molekula obsahuje voľné hydroxyly zapríčiňujúce vyššiu polaritu molekuly a tiež skutočnosť, že sa v riasach často vyskytuje vo forme esteru jednej alebo dvoch mastných kyselín. Má výborné antioxidačné vlastnosti a potenciál chrániť epidermálne a dermálne vrstvy pred poškodením spôsobeným UV žiarením, najmä v kombinácii s inými antioxidantmi. Luteín a zeaxantín (izomér luteínu) nachádzajúci sa v riasach, ako napríklad *Rhodophyta* spp. a *Spirulina* spp., sa často používajú pri farbení potravín, v liekoch a kozmetike [12], [21], [29].

2.5.2.4 Fukoxantín

Fukoxantín je hlavný karotenoid prítomný v chloroplastoch hnedých rias, ako napríklad *Ascophyllum nodosum* a *Laminaria* spp, kde slúži ako pomocný pigment fotosyntézy. Odhaduje sa, že fukoxantín vytvára viac než 10 % celkovej produkcie karotenoidov v prírode, najmä v morskom prostredí. Jeho priaznivé bioaktívne vlastnosti sú založené na jeho jedinečnej štruktúre, ktorá obsahuje ako epoxidovú väzbu, tak hydroxylové a karbonylové skupiny spolu s allenovou väzbou (kumulovaná dvojité väzby uhlík-uhlík) v polyénovom reťazci. Táto štruktúra poskytuje fukoxantínu silné antioxidačné účinky. Preto má schopnosť pôsobiť proti oxidatívne stresu spôsobenému UV žiarením, a tak je vhodný napríklad na použitie v kozmetických prípravkoch na potlačenie vzniku vrások [21], [29], [31].

2.5.3 Lipidy

Lipidy mikrorias predstavujú komplexnú zmes látok rozličných štruktúr, počínajúc masnými kyselinami (MK), neutrálnymi lipidmi – triacylglycerolmi (TAG), až po komplexné polárne lipidy (fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy a iné) a steroly. Lipidy sú dôležitou súčasťou bunkových membrán a majú význam pri rôznych dôležitých bunkových procesoch. Z nutričného hľadiska sú najvýznamnejšie tzv. polynenasýtené masné kyseliny s dlhým reťazcom (PUFA – polyunsaturated fatty acids), z nich najdôležitejšie najmä ω -3 masné kyseliny, ako kyselina α -linolenová, eikosapentaenová a ω -6 masné kyseliny, napríklad kyselina linolenová, γ -linolenová a arachidónová. Mikroriasy sú schopné produkovať a akumulovať veľké množstvo lipidov, vrátane PUFA kyselín, vďaka čomu sa ich biomasa využíva aj na výrobu bionafty transesterifikáciou [12].

Vysoký obsah PUFA v biomase rias môže nájsť aplikáciu aj v kozmetike. Niektoré PUFA, ako je kyselina linolová a kyselina arachidónová, ktoré sú zoskupené pod pojmom vitamín F, sú potrebné pre správny rast a ochranu pokožky. Rada masných kyselín má špecifickú funkciu pri obnove bariéry priepustnosti pokožky. Nedostatok nenasýtených masných kyselín v pokožke môže spôsobiť seboroickú dermatitídu a výraznú dehydratáciu pokožky. Topické použitie masných kyselín na pokožku preto môže mať priaznivé regeneračné účinky [19], [22].

2.5.4 Polysacharidy

Polysacharidy sú vysokomolekulové látky zložené z desiatok až tisícok cukrových jednotiek, najčastejšie hexapyranózových. Vznikajú kondenzáciou za tvorby α - alebo β -glykozidových väzieb, najčastejšie v smere 1 $\rightarrow$ 4 alebo 1 $\rightarrow$ 6. Niektoré vytvárajú vo vode koloidné roztoky, iné sú zas nerozpustné [27].

Polysacharidy pre riasy predstavujú najmä štruktúrne a zásobné látky. U červených rias sa ako stavebné polysacharidy vyskytujú sulfátované galaktány, ktoré sú známe ako karagénany a agary. Medzi najznámejšie štruktúrne polysacharidy hnedých rias patria alginové kyseliny. Polysacharidy pochádzajúce z morských rias vykazujú niekoľko dôležitých vlastností, ako sú antikoagulačné, antitrombotické, imunomodulačné schopnosti, ďalej protinádorové a rakovinovo preventívne účinky, a tiež protizápalové a antioxidačné pôsobenie. V stenách mikrorias sú obsiahnuté sulfátované polysacharidy, ktoré vykazujú antioxidačnú aktivitu. Ide teda o bioaktívne zlúčeniny so širokým spektrom aplikácií [22], [23].

Primárnou funkciou polysacharidov získaných z rias v kozmetických výrobkoch je ale úprava viskozity a podpora stability emulzií. Dôležitými polysacharidmi získavanými z rias sú hlavne agary, algináty, karagénany, fukoidany a β -glukány. Dispergačné účinky a vysoké hydratačné potenciály týchto látok poskytujú široké využitie v kozmetickom priemysle, aplikujú sa do rôznych mydiel, krémov, šampónov, pien a gélov [22], [32].

2.5.4.1 β -glukány

Beta-glukány, polymérne zlúčeniny zložené z glukózových jednotiek spojených β -glykosidickými väzbami, majú výhodné fyzikálne vlastnosti uplatniteľné pre aplikáciu v kozmetických produktoch. Ide o zahusťovacie, stabilizačné, emulgačné a gelačné účinky. Vďaka tomu sa β -glukány využívajú hlavne v ochranných krémoch, mastiach a sérach. Štúdie preukázali, že β -glukán napomáha zvlhčovaniu pokožky a môže vytvárať film podporujúci hojenie rán [33], [34].

Beta-1,3-glukány sú významnou zlúčeninou produkovanou riasou *Chlorella*. Ide o aktívne imunostimulanty, ktoré sú schopné podnecovať rast a delenie buniek, a tým aj regeneráciu tkanív. Bolo zistené, že β -glukán je schopný penetrácie buniek v modeloch ľudskej kože do epidermy a dermy. Beta-1,3 glukánom sú pripisované aj schopnosti zachytávať voľné radikály [7], [34].

β -glukánom je taktiež prisudzovaná schopnosť zvýšenia produkcie kolagénu. Tieto účinky je možné využiť na spomalenie procesu starnutia a pri zjemňovaní línií a vrások. Z týchto vlastností plynie aplikácia β -glukánov v produktoch pletovej omladzujúcej kozmetiky [35].

2.5.5 Proteíny

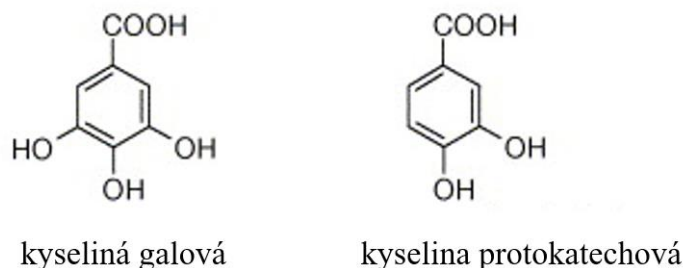
Bielkovinové zloženie bunkovej steny mnohých rias zatiaľ nie je dostatočne podrobne preskúmané. Riasy obsahujú značné množstvo esenciálnych aminokyselín [8]. Aminokyseliny sú súčasťou prirodzeného zvlhčujúceho faktora pokožky, a teda významne hydratujú pokožku, preto sa výťažky z *Chlorelly*, ktorá je ich bohatým zdrojom, aplikujú do rôznych hydratačných pleťových krémov. Obsah proteínov v riasach sa mení v závislosti na druhu, podmienkach prostredia a ročnom období. Riasy z rodu *Porphyra*, *Spirulina sp.* a *Chlorella sp.* obsahujú určité proteíny a produkty ich hydrolýzy, ktoré majú silnú afinitu k pokožke a vlasom, čím zabezpečujú zadržiavanie vlhkosti a vhodnú viskozitu. Niektoré riasové proteíny vykazujú zvlhčujúci a kondičiačný efekt na vlasy a môžu pomôcť ochrániť chemicky upravené vlasy. Peptidy izolované z rias sa vyskytujú v pleťových a telových mliekach, krémoch, šampónoch, mydlách a v maskách na regeneráciu vlasov [36]. Kozmetické prípravky obsahujúce proteíny morských rias navyše môžu stimulovať kolagénovú neosyntézu [37]. Zelená morská riasa *Enteromorpha compressa* poskytuje peptidové reťazce, ktoré majú upokojujúce a protizápalové vlastnosti [38].

Fykoerytrín je farbivo patriace do skupiny fykobilínov, ktoré tvoria komplexy s proteínmi (tzv. fykobiliproteíny). Ide o zlúčeninu pôsobiace ako pomocný fotosyntetický pigment v červených riasach. Tento proteín má biotechnologické využitie v chémii potravín, imunodiagnostickej terapii, kozmetike, označovaní proteínov či buniek a v analytických procesoch ako prírodné farbivo [7], [22]. Pigmenty izolované z červených rias a modrozelených rias (sinice) sú vhodné na vytváranie farieb v kozmetických produktoch, najmä na rôzne ružové a fialové pigmenty. Príkladom je fykocyanín, ktorý je pH stabilný a termostabilný modrý pigment získavaný napríklad zo sinice *Arthrospira*. Používa sa na výrobu očných tieňov, rúžov a lakov na nechty [7], [22], [36].

2.5.6 Fenolické zlúčeniny

Fenolické zlúčeniny tvoria rozmanitú skupinu sekundárnych metabolitov. Štruktúrne obsahujú aromatický kruh nesúci jeden alebo viac hydroxylových substituentov a funkčný bočný reťazec. Sú v rozsahu od jednoduchých fenolových molekúl po vysoko polymerizované zlúčeniny. Určité fenolové zlúčeniny produkované riasami vykazujú široké spektrum fyziologických vlastností, ako sú protialergénne, protizápalové a antimikrobiálne účinky. Antiseptické a dezinfekčné účinky vykazujú najmä fenolické zlúčeniny s jodidovými a bromidovými substituentmi [39]. Fenolické zlúčeniny, ktoré majú vo svojej štruktúre viac ako jeden fenolový kruh, sa nazývajú polyfenoly a sú syntetizované v prírode ako reakcia na škodlivé podnety z prostredia, ako je UV žiarenie alebo útoky patogénov [39], [40].

Polyfenoly predstavujú dôležité prírodné antioxidanty rastlín, pričom sa jedná o skupinu látok so širokou rozmanitosťou štruktúr a ďalších vlastností, zahŕňajúcu niekoľko tisíc zlúčenín. V riasach sa vyskytujú predovšetkým florotaníny, brómfenoly, a fenolické pigmenty [41], [42]. Najdôležitejšou skupinou pre kozmetický priemysel sú florotaníny vyskytujúce sa napríklad v riasach *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, a *Ecklonia cava*. Zelené a červené riasy majú nižší obsah fenolov v porovnaní s druhmi hnedých rias, ktoré majú vysoké koncentrácie najmä florotanínov. Florotaníny sú oligoméry floroglucínu (1,3,5-trihydroxybenzén) [39]. Rôzne mikroriasy a sinice, napríklad *Euglena cantabrica* a *Spirogyra sp.*, vykazujú významný obsah jednoduchých fenolických zlúčenín, ako je kyselina gallová, kyselina protokatechová, (+)katechín, kyselina chlorogénová a (-)epikatechín, s pomerne vysokými antioxidačnými kapacitami [39], [43].



Obrázok 3: Štruktúra hydroxybenzoových fenolických kyselín, prevzaté a upravené z [41]

2.5.6.1 Ochranný účinok polyfenolov

Polyfenoly pôsobia ako prírodné antioxidanty, ktoré pohlcujú voľné radikály dvomi rôznymi mechanizmami, a to buď prenosom elektrónu alebo prenosom atómu vodíka [18]. Antioxidačná aktivita fenolických zlúčenín závisí od ich štruktúry, najmä na počte a pozícií hydroxylových skupín a na povahe substituentov na aromatických kruhoch [41].

Problémom využitia riasových polyfenolov v kozmetických produktoch je ich nízka stabilita a zároveň vysoká senzitivita na podmienky okolitého vonkajšieho prostredia. Inkorporácia týchto látok do nanovláken alebo iných enkapsulačných častíc je možným riešením zvýšenia ich štruktúrnej stability a zlepšenia ich vlastností či vstrebateľnosti do pokožky [40].

2.5.7 Vitamíny

Vitamíny sú organické nutrienty rozličných štruktúr s významným katalytickým účinkom na rôzne metabolické procesy prebiehajúce v organizme človeka. Pre organizmus sú nenahraditeľné, väčšinou sú potrebné len v nízkych koncentráciách. Bolo dokázané, že vitamínové extrakty z rias majú silné antioxidačné vlastnosti a môžu byť nápomocné pri starostlivosti o pleť, aj pri jej ochrane. Obsah konkrétnych vitamínov vyskytujúcich sa v riasach je odlišný v závislosti na druhu riasy a taktiež na podmienkach prostredia, v ktorých riasa prežíva [27], [32].

2.5.8 Vitamíny rozpustné v tukoch

Medzi vitamíny rozpustné v tukoch patria vitamíny A (retinol), D (kalciferoly), E (tokoferoly a tokotrienoly) a K (fylochinón a menachinóny). Niektoré látky môžu slúžiť ako prekursor vitamínov, ako tzv. provitamíny, z ktorých organizmus dokáže syntetizovať potrebné vitamíny. Napríklad provitamín vitamínu A₁ (retinolu) je beta-karotén. Lipofilné vitamíny majú rôzne funkcie, retinol sa napríklad uplatňuje v biochemických reakciách zrakového vnemu, vitamín D je potrebný pre metabolizmus vápnika a fosforu, vitamín E sa uplatňuje ako významný antioxidant chrániaci nenasýtené lipidy pred poškodením voľnými radikálmi, vitamín K zas zohráva dôležitú úlohu pri aktivácii a správnej funkcii zrážania krvi [44].

2.5.8.1 Vitamín E

Vitamín E je účinný antioxidant bežne používaný v kozmetických prípravkoch určených na ochranu pred slnečným žiarením. Jeho hlavnou funkciou v bunke je ochrana membrán pred UV žiarením alebo oxidačným poškodením [22], [32].

Vitamín E predstavuje skupinu ôsmich zlúčenín rozpustných v tukoch, ktorá zahŕňa štyri formy tokoferolov (α , β , γ , δ) a štyri formy tokotrienolov [44]. Alfa-tokoferoly sú najdôležitejšími tokoferolmi, ktoré sa vyskytujú u rias. Tokoferoly sú obsiahnuté vo veľkom množstve v sladkovodnej mikroriase *Euglena gracilis* a v morskej riaske *Dunaliella tertiolecta*. Tieto zlúčeniny pozostávajú z polárneho chromanolového kruhu, ktorý je miestom antioxidačných aktivít, a hydrofóbneho alifatického postranného reťazca obsahujúceho dve metylové skupiny v strede a dve ďalšie v koncovej polohe. Pre tokoferoly je bočný reťazec nasýtený, zatiaľ čo pre tokotrienoly bočný reťazec obsahuje tri dvojité väzby, z ktorých všetky susedia s metylovou skupinou. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly sa líšia polohou a počtom metylových skupín v chromanovom cykle a biologickou aktivitou [44].

Tokoferoly sú v kozmetike často používané z dôvodu ich schopnosti dobrej absorpcie do pokožky a schopnosti redukovať transepidermálnu stratu vody, čím zlepšujú vzhľad suchej poškodenej pleti [32].

2.5.8.2 Vitamín A

Vitamín A (retinol) ovplyvňuje rôzne procesy v organizme, je dôležitý pre syntézu očného pigmentu rodopsínu, tvorbu a normálny vývoj buniek pokožky a slizníc aj stabilitu membrán buniek [27]. Vitamín A sa bežne vyskytuje v pokožke predovšetkým vo forme jeho esteru, teda retinyl-palmitátu. Vitamín A a jeho provitamíny sa radia medzi terpenoidy. Morské riasy sú bohatým zdrojom beta-karoténu, hlavného prekursoru vitamínu A. β -karotén ako prekursor vitamínu A môže byť enzymaticky prevedený na retinol a aplikovaný do rôznych kozmetických výrobkov, ako sú séra či krémy. Vitamín A zlepšuje bariérovú funkciu pokožky, čím jej môže pomáhať ostať hebkou. Taktiež pomáha aktivovať produkciu viacerých epidermálnych proteínov, čo vedie k tvorbe silnejších vrstiev pokožky, ktorá je tak pokrytá odolnejšou vrstvou keratinocytov. V potravinárskom aj kozmetickom priemysle sa využívajú aj rozličné prirodzené či syntetické deriváty vitamínu A (retinoidy) [44], [45].

2.5.9 Vitamíny rozpustné vo vode

Vitamíny rozpustné vo vode zahŕňujú tzv. vitamíny skupiny B alebo taktiež vitamíny B-komplexu a vitamín C. Vitamíny skupiny B sú tiamín (B_1), riboflavín (B_2), niacín (kyselina nikotínová a nikotínamid, teda B_3), pyridoxín (B_6), kyselina pantotenová (B_5), biotín (B_7), folacín (B_9) a korinoidy (vitamíny B_{12}). Triviálny názov vitamínu C je kyselina askorbová. Funkcia hydrofilných vitamínov spočíva najmä v katalytickom účinku, tieto zlúčeniny sa takmer vo všetkých organizmoch uplatňujú ako kofaktory rôznych enzýmov v metabolizme primárnych aj sekundárnych metabolitov [44].

2.5.9.1 Vitamín C

Niektoré druhy mikro aj makrorias, medzi nimi aj *Chlorella*, sú bohaté na vysoký obsah vitamínu C a predstavujú alternatívny zdroj tohto vitamínu v kozmetike. Pojmom vitamín C sa označuje redukčno-oxidačný systém kyseliny askorbovej a dehydroaskorbovej [24]. Silná antioxidačná aktivita vitamínu C súvisí nielen s jeho reakciou s voľnými radikálmi – podieľa sa aj na ochrane vitamínu E, čím zvyšuje jeho antioxidačný potenciál [27]. Môže sa topicky používať v dermatológii a kozmetických prípravkoch na liečenie a prevenciu zmien spojených so starnutím kože. Kyselina askorbová je tiež efektívna v zmierňovaní hyperpigmentácie a je schopná tlmiť poškodenie pokožky spôsobené vplyvom UV žiarenia [46].

Vitamín C je nevyhnutný pre biosyntézu kolagénu. Ovplyvňuje kvantitu syntézy a tiež stimuluje kvalitatívne zmeny v molekule kolagénu. Tento vitamín slúži ako kofaktor pre enzým lyzylhydroxyláza, ktorý je zodpovedný za stabilizáciu a zosieťovanie molekúl kolagénu. Okrem toho má vitamín C aj potenciálnu protizápalovú aktivitu a môže sa používať pri liečbe acne vulgaris a rosacei. Podporuje hojenie rán, napomáha rozjasniť a opraviť poškodenú kožu a zmierňuje pozápalovú hyperpigmentáciu. Hladiny vitamínu C sú nižšie v starnúcej alebo svetlom poškodenej pokožke, preto by topická aplikácia rôznych foriem vitamínu C mohla pomôcť zlepšiť jej stav. Avšak vitamín C, ako vo vode rozpustná molekula s nábojom, je odpudzovaná fyzickou bariérou diferencovaných epidermálnych buniek. Z tohto dôvodu je potrebné nájsť druh nosiča či enkapsulačného systému, ktorý by svojou povahou umožnil vitamínu C efektívnejší prechod cez epidermálnu bariéru a absorpciu do buniek, a zároveň by zvyšoval stabilitu tejto zlúčeniny [47].

2.6 Metódy analýzy metabolitov rias

Na stanovenie zloženia biomasy a zloženia extraktov získaných z rias za účelom rozboru riasových metabolitov sa bežne využívajú moderné separačné techniky, najmä plynová chromatografia (GC) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Kvapalné vzorky je možné kvantitatívne aj kvalitatívne analyzovať prostredníctvom UV-VIS spektrofotometrie. Izolácia a separácia požadovaných syntetizovaných metabolitov z biomasy rias sa často vykonáva prostredníctvom extrakcie. Najprv budú popísané metódy extrakcií a následne analytické metódy.

2.6.1 Extrakcia

Extrakcia je separačná metóda založená na prechode látky fázovým rozhraním medzi dve vzájomne nemiešateľné fázy, pričom tieto fázy môžu byť rôzneho skupenstva. Jeden z najviac používaných spôsobov získavania bioaktívnych látok zo vzoriek je extrakcia pomocou rozpúšťadla [48].

2.6.1.1 Extrakcia podľa Soxhleta

Ide o extrakciu z pevnej fázy do kvapaliny, kde sa zo vzorky pevného materiálu vo vhodnom extrakčnom činidle rozpúšťajú skupiny požadovaných zložiek podľa povahy rozpúšťadla, ale ostatné zložky vzorky nie. Je to metóda kontinuálnej extrakcie, fázy sú pri protiprúdovom pohybe v neustálom styku. Umožňuje nekontrolovanú a neriadenú prevádzku extrakcie pri efektívnej recyklácii malého množstva rozpúšťadla na rozpustenie väčšieho množstva materiálu. Medzi výhody Soxhletovej extrakcie patrí kontinuálny kontakt čerstvého rozpúšťadla s pevnou matricou a absencia filtračného kroku po extrakcii, resp. vylúhovaní. Extrakcia podľa Soxhleta sa využíva pri delení organických zlúčenín na extrakciu nepolárnych látok. Nevýhodou tejto metódy je riziko tepelného rozkladu termolabilných zlúčenín vo vzorke, pretože k extrakcii obvykle dochádza pri teplote varu rozpúšťadla po dlhšiu dobu. Automatizácia Soxhletovej extrakcie poskytuje značné úspory času a extrakčného rozpúšťadla [49].

2.6.2 Chromatografia

Chromatografia je separačná technika, ktorá využíva delenie medzi dve fázy. Ide o fázu pohyblivú, označovanú aj ako mobilná fáza (MF), ktorá môže mať plynné alebo kvapalné skupenstvo. Druhá fáza je nepohyblivá, teda stacionárna fáza (SF), môže mať rozličné formy v závislosti od typu chromatografickej separácie. Princípom separácie je rozličná interakcia jednotlivých zložiek analyzovanej vzorky so SF a MF. Chromatografickou kolónou, ktorá je naplnená stacionárnou fázou, postupne prechádza istou rýchlosťou mobilná fáza. Na začiatok kolóny sa vnesie vzorka (zmes látok) obsahujúca rôzne zložky. Vzorka je unášaná MF ku koncu kolóny, pričom jedna zložka je mobilnou fázou unášaná rýchlejšie ako druhá. Behom prechodu kolónou každá molekula vzorky prejde mnohokrát z prúdu MF na SF a späť. Najviac sú v kolóne zadržiavané zložky, ktoré sú najsilnejšie pútané k SF. Čím je väčšia miera afinity zložky k SF, tým dlhšie je zložka zadržiavaná, z kolóny vychádza tým neskôr, teda má vyšší retenčný čas. Na výstupe z kolóny vychádzajú zložky už oddelené v určitom poradí v závislosti na ich retenčných časoch. Dôležitou súčasťou je detektor na výstupe z kolóny, ktorý deteguje separované zložky. Signál detektoru je zaznamenávaný v závislosti na čase. Odozva detektoru závisí na koncentrácii eluovanej zložky [48], [50].

2.6.2.1 Kvapalinová chromatografia

Mobilná fáza je kvapalina. O separácii zložiek vzorky rozhoduje nielen ich interakcia so SF, ale do veľkej miery aj charakter použitej MF a afinita zložiek analyzovanej zmesi k MF. Uplatňujú sa rôzne mechanizmy separácie. Vplyv teploty na separáciu je v kvapalinovej chromatografii (LC) malý a kolóny väčšinou pracujú pri laboratórnej teplote. Metóda LC je preto vhodná aj na separáciu tepelne nestálych zlúčenín. Pre kvapalinovú adsorpčnú chromatografiu sa ako SF najčastejšie využívajú silne polárne a plno porézne adsorbenty guľovitého tvaru. Najrozšírenejším adsorbentom je silikagél [48].

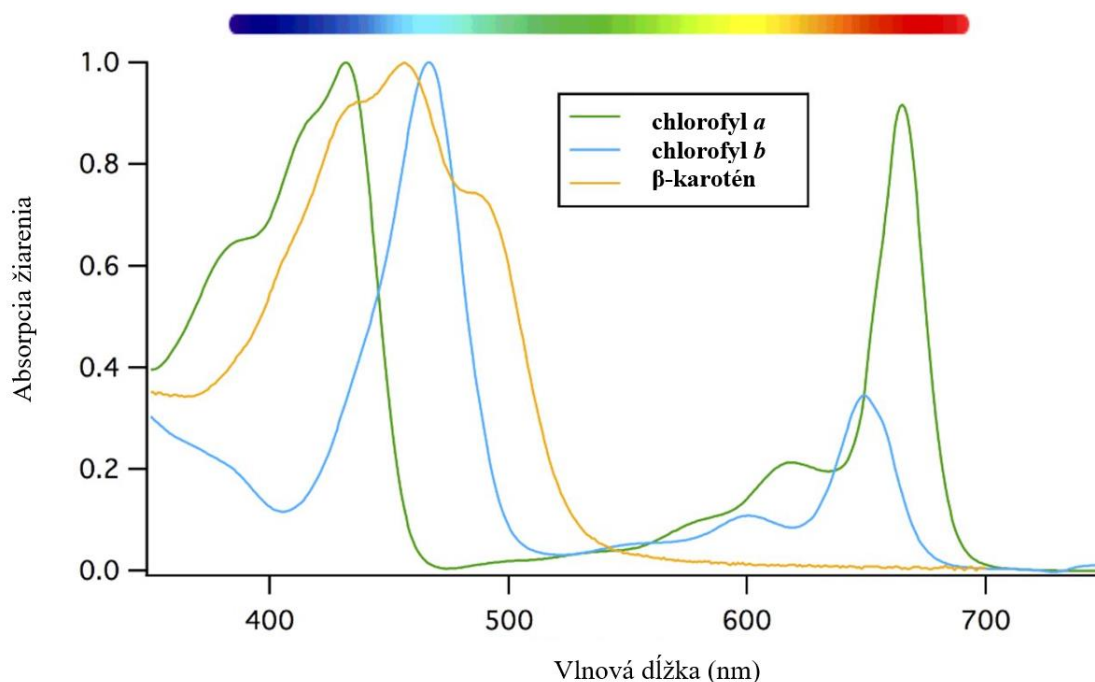
Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) využíva na separáciu zložiek kolóny s náplňou tvorenou malými guľovitými časticami sorbentu o priemere najčastejšie 3, 5 alebo 10 µm. Sorbent je uložený na frite. Častice SF kladú vysoký odpor prietoku MF, preto je nutné využívať vysokotlakové čerpadlá na prekonanie tohto odporu a vytvorenie konštantného prietoku MF. Eluát vychádzajúci po separácii z kolóny preteká mernou celou detektoru, kde je meraná určitá jeho vlastnosť, ktorá je transformovaná na elektrický signál ďalej spracovaný počítačom. Detektory v HPLC by mali byť selektívne pre analyty a málo citlivé na mobilnú fázu. Výstupom z merania je počítačom vytvorený chromatogram, ktorý predstavuje časovú závislosť odozvy detektoru. Kvalitatívnu informáciu na identifikáciu látok poskytujú na chromatograme píky charakterizované retenčným časom. Plocha alebo výška píky slúži na kvantifikáciu zlúčeniny [50].

2.6.3 UV-VIS spektrofotometria

Optická metóda absorpčnej spektrofotometrie pracuje na princípe interakcie analyzovanej vzorky s elektromagnetickým žiarením. Pre UV-VIS spektrofotometriu sa využíva žiarenie v oblasti vlnových dĺžok 200–800 nm. Metódu je možné aplikovať na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Kvantitatívna analýza vychádza z predpokladu platnosti Lambert-Beerovho zákona, ktorý popisuje vzťah medzi mierou absorbancie a koncentráciou stanovovanej zlúčeniny. Pre roztoky o nízkych koncentráciách a pri použití monochromatického žiarenia platí, že hodnota absorbancie A pri danej charakteristickej vlnovej dĺžke je priamo úmerná látkovej koncentrácii c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], a je závislá na molárnom absorpčnom koeficiente ε_λ [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] a na hrúbke absorbujúcej vrstvy l [cm], čo je vlastne hrúbka kyvety [48].

$$A = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot l \quad (1)$$

Absorpčné UV-VIS spektrá zobrazujú zmenu miery absorpcie žiarenia vzorkou ako funkciu vlnovej dĺžky dopadajúceho svetla a merajú sa pomocou spektrofotometra. Absorpčné spektrá sa získavajú postupnou zmenou vlnovej dĺžky dopadajúceho žiarenia pomocou monochromátora a zaznamenaním intenzity prepúšťaného žiarenia na detektor [50]. Na základe absorpčných spektier analyzovaných vzoriek je možné určiť koncentrácie zlúčenín rozličných druhov a štruktúr pri výbere správnej charakteristickej vlnovej dĺžky pre danú zlúčeninu. Absorpčné maximá chlorofylov sa nachádzajú v červenej a modrej oblasti viditeľného spektra, tak ako to zobrazuje Obrázok 4. Karotenoidy vykazujú typické absorpčné spektrum, ktoré sa vyznačuje tromi absorpčnými maximami (napríklad pre violaxantín, neoxantín) alebo dvoma maximami s jedným ramenom (luteín a β -karotén) v modrej spektrálnej oblasti. Poloha absorpčného maxima pre bezkyslíkaté karotenoidy, ako je β -karotén, je v oblasti vyšších vlnových dĺžok, ako pre xantofyly nesúce v molekule kyslík. So zvyšujúcim sa množstvom hydrofilných skupín v tetraterpenoidnom uhlíkovom skelete karotenoidov sa absorpčné maximá (a rameno) posúvajú do nižších vlnových dĺžok. Presná poloha absorpčného maxima extrahovaných pigmentov závisí aj na typu rozpúšťadla a do istej miery aj na type použitého spektrofotometra. Rôzne rastlinné pigmenty absorbujú svetlo v prekrývajúcich sa spektrálnych oblastiach, v závislosti od zvoleného systému extrahovadla a spektrofotometra [51].



Obrázok 4: Absorpčné spektrá chlorofylov A, B a β -karoténu, prebrané a upravené z [52]

2.6.4 Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity

Metóda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) testuje schopnosť vzorky zhasiť syntetický farebný radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Výsledná antiradikálová aktivita vzorky je porovnávaná s antiradikálovou aktivitou štandardnej látky Trolox, čo je rozpustný syntetický analóg vitamínu E. Radikály sú generované v reakčnej zmesi oxidáciou ABTS, napríklad prostredníctvom peroxodisíranu draselného alebo oxidu manganičitého [53].

Antioxidant prítomný v testovanej vzorke redukuje kationové radikály ABTS^{•+} na ABTS a odfarbuje ich na svetlejšiu zelenú alebo bezfarebnú z pôvodne modro-zelenej farby. Intenzita výsledného sfarbenia roztoku je priamo úmerná celkovej antioxidačnej aktivite vzorky. Zhasenie radikálu ABTS^{•+} antioxidantmi, ktoré majú funkciu donorov vodíka, sa sleduje spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra ABTS^{•+} meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 734 nm. Trolox sa použije na vytvorenie kalibračnej rady na zostavenie kalibračnej krivky, na základe ktorej sa vypočíta výsledná antioxidačná aktivita analyzovanej vzorky. Parameter TEAC určuje antioxidačnú kapacitu vzorky vyjadrenú ako ekvivalent antioxidačnej aktivity definovaného množstva Troloxu [54].

2.7 Nanomateriály pre enkapsuláciu aktívnych zlúčenín

Produkcia výrobkov obsahujúcich nanočastice či nanovlákná sa v posledných dekádach stále zvyšuje. Nanotechnológie spočívajú v generovaní a využívaní materiálov, mechanizmov alebo systémov v nanometrovom meradle. Nanomateriály možno definovať ako materiály, ktoré majú najmenej jeden rozmer v rozmedzí veľkosti obvykle od 1 do 100 nm. Nanomateriály sú produkované najmä preto, že veľkosti v nano úrovniach sú blízke veľkostiam jednotlivých molekúl či atómov. Nanotechnológie sú tak schopné cielene ovplyvniť štrukturálne, mechanické či tepelné alebo termodynamické vlastnosti a chovanie materiálov. Hlavným dôvodom širokého využívania nanomateriálov ako nosných materiálov pre aktívne zlúčeniny v kozmetike či medicínskych aplikáciách je práve ich veľkosť, ktorá umožňuje lepšiu penetráciu kožou a zároveň poskytuje zvýšenie biologickej dostupnosti aktívnej látky v mieste požadovaného účinku a jej postupné, cielečné uvoľňovanie z nosičového systému [40], [55].

2.7.1 Význam nosičových systémov a enkapsulácie

Bioaktívne metabolity získané z rias poskytujú mnohé účinky efektívne pre využitie v kozmetickom a potravinárskom priemysle, no ich častým problémom je nedostatočná stabilita. Preto je tieto látky vhodné inkorporovať do nosičového systému (NS), aby tak bola zachovaná ich chemická štruktúra a aby boli uchránené pred fyzikálnym a chemickým znehodnotením pôsobením rôznych faktorov okolitého prostredia. To sprostredkujú rôznorodé metódy enkapsulácie a techniky inkorporácie aktívnych zlúčenín do NS. Princípom je uzavretie bioaktívnej zložky do inej látky či materiálu, za účelom jej stabilizácie a ochrany. Tieto metódy zároveň umožňujú aj postupné a kontrolované uvoľňovanie aktívnych látok obsiahnutých v kozmetických prípravkoch pri aplikácii na pokožku za definovaných podmienok. Ďalším dôvodom využitia nosných materiálov v podobe nanočastíc je potreba zamedzenia nežiaducich reakcií s inými zložkami zmesi, ako napríklad s prítomnými kovmi, kyselinami či ďalšími aktívnymi látkami, s čím súvisí aj udržanie optimálneho pH daného prípravku [4], [55], [56].

Látka, ktorá enkapsuluje aktívnu zlúčeninu či tvorí základ nosičového systému, sa môže nazývať kapsula, povlak, vonkajšia fáza alebo nosný materiál. Látka, ktorá je enkapsulovaná, sa označuje ako aktívna, jadro alebo aj vnútorná fáza. Aktívne látky vkladané do NS môžu byť tuhého, kvapalného aj plyného skupenstva. Častice, do ktorých sa aktívne látky inkorporujú, môžu byť rozličného druhu a štruktúry, a sú pripravované širokým spektrom techník [55], [56].

Látky používané ako nosné materiály prichádzajúce do kontaktu s ľudským organizmom musia byť toxicky nezávadné a ideálne aj biodegradabilné, teda biologicky rozložiteľné. Inkorporáciu látok do NS možno použiť na zachovanie integrity metabolitov extrahovaných z rias pri ich spracovaní, skladovaní či pri ich následnej aplikácii v kozmetickom produkte na dosiahnutie lepšieho vstrebávania a riadeného uvoľňovania, ale napríklad aj na ich lepší rozptyl v koloidných systémoch [3].

2.7.2 Druhy enkapsulácie

Na obalenie aktívnej zlúčeniny vonkajšou fázou existuje niekoľko metód, výber tej najvhodnejšej záleží na rozličných faktoroch, ako napríklad na plánovanej aplikácii preparátu, požadovaných rozmeroch častíc, taktiež na fyzikálnych a chemických parametroch aktívnej látky aj obalového materiálu, ďalej na zamýšľanom mechanizme uvoľňovania látky. Dôležité sú aj náklady na výrobný proces [40]. V kozmetickom priemysle patrí medzi najbežnejšie techniky enkapsulácie sprejové sušenie, sprejové chladenie, extrúzia, emulzifikácia, koacervácia, lyofilizácia, polymerácia a enkapsulácia do lipozómov. Na prípravu nanovláken ako nosného materiálu pre aktívne zlúčeniny tiež existuje celá rada rozličných techník, ktoré budú spomenuté ďalej [3], [57].

2.7.3 Nanomateriály v kozmetickom priemysle

Molekulárna štruktúra nanomateriálov a ich interakcie s prostredím sú dva dôležité faktory, ktoré ovplyvňujú ich čoraz častejšiu aplikáciu v kozmetike. Nanomateriály používané v kozmetike možno klasifikovať do rôznych skupín, ako napríklad nanoemulzie, nanolipozómy, nanopigmenty a nanovláken. Je možné aplikovať ich napríklad v krémoch na opaľovanie, krémoch na pokožku, výrobkoch na vlasy a výrobkoch ústnej hygieny. Stále však nie je konkrétne definované, koľko rôznych druhov nanomateriálov sa v kozmetike využíva, pretože presné vymedzenie nanomateriálu v kozmetike nie je pevne dané a stále sa upravuje [58].

Na pokožku je možné zamerať dodávanie výživných, bioaktívnych látok ich povrchovou aplikáciou. Avšak *stratum corneum*, čo je vonkajšia vrstva keratínocytov epidermy, funguje ako účinná protektívna bariéra a bráni priechodu mnohých látok (najmä vysokomolekulárnych) z vonkajšieho prostredia do pokožky. Preto je dôležitý dodávací NS aktívnych látok, ktorým je možné dosiahnuť lepšiu penetráciu tejto prirodzenej bariéry a doceliť tak vyššiu absorpciu aktívnych látok obsiahnutých v kozmetickom prípravku na požadovanom mieste [47]. Pre tento účel je možné využiť nanolipozómy na enkapsuláciu aktívnej zložky alebo (nano)vlákna ako nosičové systémy (tzv. delivery systems), ktoré poskytnú vyššiu biologickú dostupnosť inkorporovanej aktívnej zlúčeniny a jej riadené uvoľňovanie v požadovaných koncentráciách [59].

2.7.4 Nanovláken

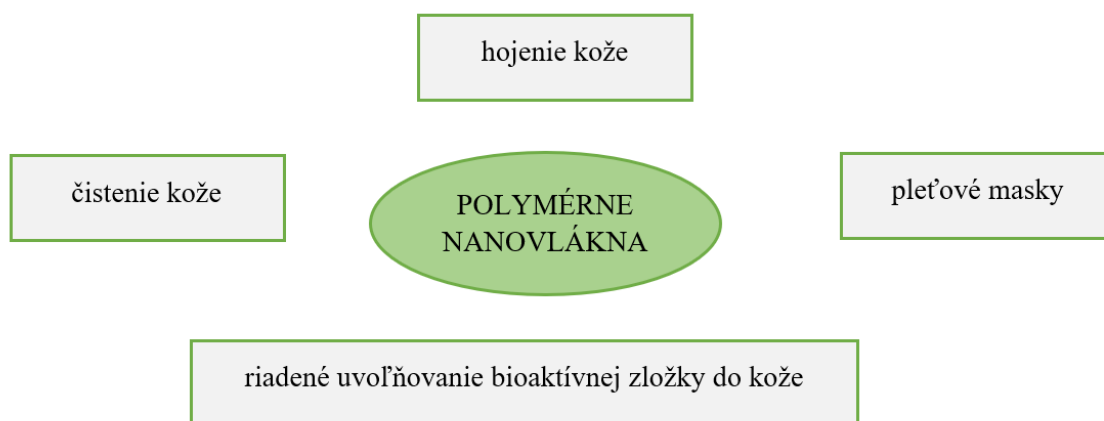
Nanovláken sú vlákna s priermi v rozsahu nanometrov, vo všeobecnosti je akceptované, že ich priemery dosahujú maximálne 1 000 nm. Pre nanovláknité štruktúry je charakteristická veľká plocha povrchu na jednotku objemu. Môžu byť generované z rôznych polymérnych zlúčenín, vďaka čomu disponujú rozličnými fyzikálnymi vlastnosťami a aplikačnými potenciálmi [59], [60].

Nanovláken (NV) tvoria vďaka svojim jedinečným vlastnostiam atraktívnu a čoraz viac využívanú skupinu nanomateriálov. Vysoký pomer povrchovej plochy k objemu, malé priemery jednotlivých vlákien, biologická odbúrateľnosť, vysoká pórovitosť a malé veľkosti pórov z nich robia dobrých kandidátov pre mnoho aplikácií. Významnou aplikáciou je uplatnenie NV v medicínskych oblastiach vo forme nosičových systémov liečiv, alebo ako krytov rán či v tkanivovom inžinierstve [4], [60]. Kozmetický priemysel je ďalšou z dôležitých oblastí použitia. Relatívne veľký merný povrch nanovláken zabezpečuje vysokú mieru styku s okolitým prostredím, a tým aj následne zvýšenú reaktivitu inkorporovaných látok vo vláknach. Samozrejme musí dochádzať k uvoľňovaniu aktívnej látky z vlákien, prípadne k porušeniu štruktúry naviazania aktívnej látky na povrchu vlákien. Vysoký kontaktný povrch medzi nanovláknami a pokožkou tak zaisťuje efektívnejšie dodávania aktívnej zlúčeniny do požadovaných častí pokožky pri ich topickej aplikácii. Vynikajúcou vlastnosťou NV vytvorených elektrostatickým zvlákňovaním je veľká plocha ich povrchu, ktorú je možné ešte výrazne zvýšiť vytvorením tzv. povrchovej pórovitosti. Pórovitosť je možné cielene upravovať pri procese zvlákňovania. Vďaka vysokej pórovitosti a nízkemu priemeru pórov pozorovaných v nanovláknach je možné vyrobiť rôzne predušné kozmetické produkty [4], [58], [60].

2.7.5 Aplikácie nanovláknien v kozmetike

Nanovlákná je možné použiť na prípravu farmaceutických alebo kozmetických produktov zameraných na dosiahnutie optimálneho stavu a regeneráciu kože. Ide hlavne o pleťové masky na čistenie, hojenie či terapiu pokožky, do ktorých je možné zakomponovať rôzne zlúčeniny schopné revitalizovať pokožku [58], [61].

Len nedávno bola napríklad vyrobená antioxidačná nanovláknová pleťová maska proti vráskam s inkorporovanou kyselinou askorbovou, kyselinou retinovou, kolagénom a nanočasticami zlata. Tieto látky boli pridané priamo do roztoku polyméru určeného na zvlákňovanie a následne boli vyprodukované metódou elektrostatičného zvlákňovania vlákna s obsahom aktívnych zlúčenín [62]. Výskum v oblasti dermokozmetiky sa zameriava aj na štúdium dodávania liečivých aktívnych zlúčenín cez pokožku pomocou nanovláknien ako nosičových systémov. Prehľad vybraných aplikácií polymérnych nanovláknien v kozmetike zázorňuje Obrázok 5.



Obrázok 5: Vybrané aplikácie polymérnych nanovláknien v kozmetickom priemysle, prevzaté a upravené z [4], [40].

2.7.6 Inkorporácia aktívnej látky do nanovlákná

Optimálny postup na inkorporáciu aktívnej zlúčeniny do nanovlákná sa vyberá s ohľadom na charakter zlúčeniny, ktorá má byť do vlákna zabudovaná. Bioaktívne zlúčeniny je možné jednoducho zmiešať s polymérnym roztokom, pričom je nutné zvoliť rozpúšťadlo, v ktorom je rozpustný polymér aj bioaktívna zlúčenina. Takýto roztok je možné následne podrobiť co-elektrospinningu. Ďalšou možnosťou je fyzikálne alebo chemické imobilizovanie látok na povrchu sformovaných vlákien či ich nepriame nanášanie na nanovlákná. Podľa spôsobu zakomponovania aktívnej látky priamo do vlákien alebo na ich povrchu potom dochádza aj k odlišným procesom uvoľňovania inkorporovanej látky z týchto štruktúr. Pre vlákna vytvorené elektrostatičným zvlákňovaním zo spoločného roztoku polyméru a extraktu aktívnych zlúčenín sa uplatňuje pri uvoľňovaní aktívnej zlúčeniny z vlákna jednoduchá difúzia [61], [63].

2.7.7 Metódy prípravy nanovláknien

Na produkciu nanovláknien existuje niekoľko rôznych techník. V súčasnosti sa najbežnejšie využíva elektrostatičké zvlákňovanie (elektrospinning) a rotačné (forcespinning) zvlákňovanie, ktoré využíva vonkajšiu odstredivú silu. Inou možnosťou prípravy nanovláknien je napríklad tzv. samozoskupovanie menších molekúl a častíc do vlákien, vyťahovanie vlákien z kvapky, rozfúkavanie nanovláknien z taveniny (meltblowing), fázová separácia, medzifázová separácia, rýchlo iniciovaná polymerizácia, metóda rastu vlákien podľa predlohy (matricová syntéza) a mnohé ďalšie. Elektrostatičké zvlákňovanie je preferované najmä vďaka pomernej jednoduchosti a nízkym nákladom [58], [64].

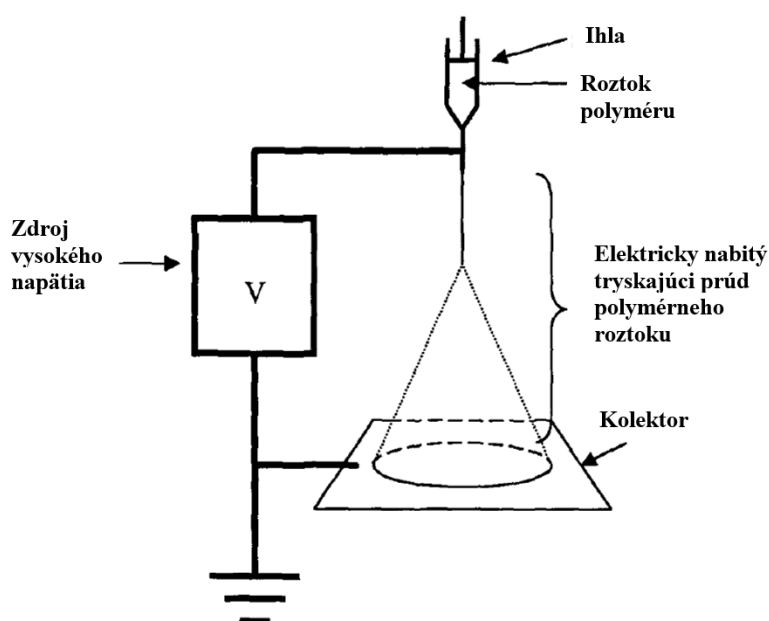
2.7.8 Elektrospinning (elektrostatické zvlákňovanie)

Technika využíva elektrostatické sily na výrobu jemných polymérnych vlákien v rozmedzí od desiatok nanometrov po niekoľko mikrometrov. Vlákná vyrobené elektrospinningom majú mnoho vynikajúcich charakteristík, ako rozmanitá pórovitosť, vysoký pomer povrchu k objemu, výborné mechanické vlastnosti, možnosť sfunkčnenia povrchu a napodobňovanie prírodnej fibrilárnej extracelulárnej matrix [65]. Nastavením parametrov elektrospinnngu je možné kontrolovať a meniť veľkosť povrchu, priemer či pórovitosť vlákien alebo hmotnosť vlákna na jednotku plochy. Technika elektrostatické zvlákňovania je zvlášť vhodná na výrobu vlákien pomocou veľkých komplexných molekúl. Elektrospinning umožňuje efektívnu výrobu kontinuálnych polymérnych nanovlákien. Vlákná pripravené elektrospinningom majú veľký potenciál na účinné zachytávanie bioaktívnych zlúčenín a dosiahnutie ich požadovaného riadeného uvoľňovania [4], [61].

2.7.8.1 Princíp elektrostatického zvlákňovania

Tvorba vlákien je realizovaná prostredníctvom elektricky nabitého prúdu roztoku alebo taveniny polyméru. Prístroje na realizáciu tohto procesu sa skladajú z troch základných častí: zdroj vysokého napätia, ihla (resp. tryska či kapilára) a kolektor (zberač) [66].

Pri elektrostatickom zvlákňovaní je najviac využívané jednosmerné elektrostatické pole s vysokou intenzitou. Úzka ihla, ktorá slúži ako zvlákňovacia kapilára a uzemnený kovový kolektor umiestnený oproti vrcholu kapiláry predstavujú dve elektródy, ktorých rozdiel elektrických potenciálov vytvára napätie poľa. Do lineárneho dávkovača je umiestnená striekačka so zvlákňovacím roztokom polyméru. Roztok je následne vytláčaný nevodivou trubicou do zvlákňovacej elektródy v podobe ihly. V ihle dochádza pri vytláčaní roztoku polyméru k prenosu náboja na tento roztok. Najprv sa vplyvom povrchového napätia vytvára kvapka roztoku polyméru na špičke kapiláry [67]. Pri zvyšovaní intenzity elektrického poľa dochádza k natiahnutiu kvapky pri ústí kapiláry a vytvára sa kužeľovitý tvar, tzv. Taylorov kužeľ. Kužeľ sa zvyšovaním napätia ďalej deformuje. Prekročením kritickej hodnoty, pri ktorej odpudivá elektrostatická sila prekoná povrchové napätie, sa z kužeľa začne vyťahovať prúd tekutiny v podobe tenkého vlákna. Toto vylietavajúce vlákno smeruje do oblasti s nižším potenciálom ku zbernej uzemnenej elektróde. Tryskajúci polymérny roztok sa na dráhe ku kolektoru postupne predlžuje a koncentruje odparovaním rozpúšťadla, až dopadá na kolektor v pevnom stave. Pri odparovaní rozpúšťadla nastáva veľký nárast povrchu vlákien. Pri správnom usporiadaní ihly a kolektoru a vhodnom výbere rozpúšťadla na kolektor dopadnú už suché nanovlákná. Náboj vlákna je vybitý po dopade na uzemnený kolektor [66], [68], [69].



Obrázok 6: Schematický diagram procesu elektrostatického zvlákňovania, prevzaté a upravené z [66]

2.7.8.2 Zásady elektrospinningu

Kľúčovými parametrami procesu elektrospinningu je najmä výber rozpúšťadla použitého na prípravu roztoku polyméru, sila elektrického poľa pôsobiaca na roztok a tiež letová vzdialenosť prúdu polyméru, teda veľkosť medzery medzi hrotom striekačky a uzemneným kolektorom. Pre každý systém polymérneho roztoku existuje optimálna kombinácia týchto parametrov zvlákňovania [68].

Všeobecne platí, že na vytvorenie roztoku zvoleného polyméru je potrebné vybrať vhodné rozpúšťadlo, ktoré s polymérom vytvára stabilný roztok. Zároveň sa musí zvolené rozpúšťadlo pri zvlákňovaní odparovať optimálnou rýchlosťou tak, aby vznikali vlákna s požadovanou mechanickou celistvosťou, tvrdnúce až po dopade na kolektor a dosiahnutí požadovaných rozmerov. Viskozita a povrchové napätie použitého rozpúšťadla polyméru by nemali mať príliš vysoké hodnoty. Napájanie sústavy zdrojom napätia musí byť dostatočné na udržanie prúdu polymérnych vlákien tryskajúcich zo striekačky. Systém na elektrostatické zvlákňovanie je citlivý na parametre ako teplota či relatívna vlhkosť [64], [66], [69].

2.7.8.3 Parametre ovplyvňujúce vlastnosti vlákien

Vlastnosti vlákien, najmä ich morfológiu a hrúbku, je možné regulovať nastavením rôznych parametrov procesu elektrostatického zvlákňovania. Tieto parametre možno rozdeliť do niekoľkých hlavných skupín. Ide o vlastnosti samotného polyméru, vlastnosti roztoku, procesné podmienky a podmienky okolitého prostredia. Prehľad parametrov ovplyvňujúcich stavbu a vlastnosti vytvorených vlákien uvádza Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Parametre ovplyvňujúce morfológiu vlákien pripravených elektrostatickým zvlákňovaním, prevzaté a upravené z [67], [70].

Vlastnosti polyméru	Vlastnosti roztoku	Procesné podmienky	Okolité prostredie
Rozpustnosť	Koncentrácia	Vzdialenosť elektród	Teplota
Molekulová hmotnosť	Povrchové napätie	Aplikované napätie	Vdzušná vlhkosť
Distribúcia molekulových hmotností	Viskozita	Rýchlosť prietoku roztoku polyméru ihlou	Tlak
	Viskoelasticita		
	Elektrická vodivosť		
	Prchavosť		

Medzi najdôležitejšie faktory regulácie priemeru vlákien patrí viskozita a povrchové napätie roztoku, vodivosť roztoku, použité napätie a vzdialenosť kolektora od zvlákňovacej trysky. Z podmienok okolitého prostredia je významná hlavne vlhkosť a tlak [66], [69].

2.8 Materiály na výrobu nanovlákien

Vláknité materiály využívané ako NS pre bioaktívne látky môžu byť pripravované zo zlúčenín rozličných druhov a vlastností. Na výrobu vlákien aplikovaných v medicíne, kozmetike aj v potravinárstve sa používajú predovšetkým polyméry schopné biologického rozkladu [4].

Ak ide o prípravu vlákien obohatených o aktívne zlúčeniny či liečivá, polyméry nesmú s aktívnou zlúčeninou nepriaznivo interagovať, aby neporušili jej chemickú štruktúru a zloženie. Enkapsulácia bioaktívnej zlúčeniny do polymérnych vlákien musí zaistiť čo najlepšíu stabilitu takto inkorporovanej zlúčeniny. Látky používané na zhotovenie NV musia spĺňať aj ďalšie podmienky, ako napríklad schopnosť poskytnúť inkorporovanej zlúčenine čo najvyššiu ochranu pred nepriaznivými faktormi vonkajšieho prostredia. Preto je pri výbere vhodnej zlúčeniny na syntézu vlákien dôležité zohľadniť

prostredie, v ktorom má byť materiál aplikovaný a zvážiť jeho aktivitu. Je nutné zvážiť aj vonkajšie vplyvy pôsobiace na prostredie, v ktorom sa inkorporovaná aktívna zlúčenina vyskytuje, teda faktory ako zmena teploty, vlhkosti vzduchu, osmotického tlaku alebo pH [4], [60].

Najvýznamnejším nárokom pre vlákna slúžiace na topickú aplikáciu je ich nulové toxické pôsobenie na organizmus, teda biokompatibilita. Materiály môžu byť vybrané zo širokej škály prírodných či syntetických polymérov, prípadne ich kombinácie. Medzi najčastejšie používané polyméry na zhotovenie vlákien patria v potravinárstve a kozmetike polysacharidy (škroby, celulózy, algináty, agarózy, cyklodextríny, chitosan), proteíny (kolagén, želatína, kazeín či sójové proteíny) a lipidy (vosky, parafín a oleje). Využívané sú aj syntetické polyméry (akrylové polyméry, polyvinylalkohol a polyvinylpyrolidín). Ako druhotné polyméry sa môžu tiež použiť anorganické materiály, ako sú silikáty, íly a polyfosforečnany [4], [59], [60].

Mnohé prírodné polyméry sa vyznačujú výhodnými mechanickými vlastnosťami, niektoré aj špecifickou biologickou aktivitou. Navyše sú vysoko biokompatibilné, pri kontakte s organizmom človeka vyvolávajú minimálnu zápalovú reakciu, čo z nich robí vhodné substráty pre produkciu vlákien v kozmetike. Okrem iného sa na výrobu NV používajú aj polyester (kyselina polymliečna, kyselina polyglykolová a ich kopolymér). K polyesterom patria aj polyhydroxyalkanoáty (PHA), ktoré sú produkované intracelulárne metabolizmom mikroorganizmov. Je to skupina polymérov, ktoré sú charakteristické dobrou biodegradabilitou a biokompatibilitou. Príkladom takejto zlúčeniny používanej na výrobu nanovlákien je PHB, teda polyhydroxybutyrát [4], [67]. Doteraz bolo metódou elektrospinningu úspešne zvlákných viac ako päťdesiat rôznych polymérov do jemných vlákien. Väčšinu polymérov je potrebné pred elektrostatickým zvláknovaním rozpustiť vo vhodnom netoxickom rozpúšťadle [68].

2.8.1 Želatína

Želatína je proteínový biopolymér získavaný čiastočnou hydrolýzou kolagénu. Želatína je biodegradabilná, biokompatibilná, netoxická a má relatívne nízku cenu, vďaka čomu sa vo farmaceutickej a medicínskej oblasti využíva najmä vo forme filmov. Okrem filmových vrstiev je možné zo želatíny vytvoriť nanovlákná metódou elektrospinningu, avšak zvláknovanie želatíny má niekoľko úskalí [71].

2.8.1.1 Želatínové vlákna

Želatína je ľahko rozpustná vo vode, avšak bolo preskúmané, že z roztoku želatíny vo vode nie je možné efektívne vytvoriť elektrospinningom vlákna s dostatočne kvalitnými vlastnosťami. Takto vytvorené vlákna sú ľahko rozpustné a mechanicky slabé. Ako rozpúšťadlo je potrebné využiť inú zlúčeninu, ako napríklad organický 2,2,2-trifluóretanol alebo kyselinu octovú [71], [72].

Čisté želatínové nanovlákná bez ďalšej úpravy nemusia mať vždy vhodné mechanické vlastnosti a požadovanú hydrolytickú stabilitu pre použitie v biomedicínskych či kozmetických aplikáciách. Preto je ich zosieťovanie (tzv. crosslinking) prostriedkom na zvýšenie ich hydrolytickej stability, optimalizáciu termomechanických vlastností a na zlepšenie mechanickej pevnosti pre ich potenciálne využitie [71].

Proces zosieťovania môže byť vykonaný chemickými alebo fyzikálnymi metódami. Chemické zosieťovanie želatínových vlákien sa môže dosiahnuť rôznymi zlúčeninami, ako sú aldehydy (formaldehyd, glutaraldehyd a glycerinaldehyd) [73], alebo polyepoxidy [74], ale aj mnohými ďalšími. Fyzikálne metódy zosieťovania zahŕňajú dehydrotermálne ošetrovanie (DHT) a ožarovanie UV alebo gama žiarením, vo všeobecnosti sú však menej efektívne [71].

Želatínové vlákna, jednoduché alebo stabilizované a optimalizované procesmi zosieťovania, majú niekoľko potenciálnych aplikácií. Ide napríklad o hojenie rán [75], či ich použitie ako nosičové systémy a enkapsulačné materiály pre kontrolované uvoľňovanie liečiv a rôznych inkorporovaných bioaktívnych látok [76].

2.9 Analýza cytotoxicity

Cytotoxicita je schopnosť chemických zlúčenín alebo buniek spôsobiť poškodenie inej bunky. Vývoj nových kozmetických prípravkov či materiálov na aplikáciu v medicíne, kozmetike alebo potravinárstve je spojený s testovaním bezpečnosti nosyntetizovaných materiálov pre ľudské zdravie. Na takúto analýzu sú výhodné *in vitro* testy cytotoxicity, ktoré sa vykonávajú na tkanivových kultúrach alebo bunkových líniiach v skúmavkách, na sklíčkach či na Petriho miske.

In vitro testy predstavujú rýchlejšiu a lacnejšiu alternatívu k *in vivo* testovaniu na zvieratách, a zároveň sú aj humánnejším spôsobom analýzy cytotoxicity. *In vitro* testy sledujú viabilitu buniek vystavených testovanej zlúčenine či materiálu. Viabilita je schopnosť buniek prežiť, a je determinovaná rôznymi bunkovými prejavmi, ako napríklad proliferácia buniek alebo sledovanie mitochondriálnej aktivity. Vďaka tomu existuje niekoľko metód *in vitro* testovania cytotoxicity [77], [78].

2.9.1 MTT testy

Na vizualizáciu bunkovej proliferácie sa často využívajú tetrazoliové soli. MTT test cytotoxicity je založený na schopnosti NAD(P)H-dependentných dehydrogenáz živých buniek redukovať MTT tetrazoliové farbivo žltej farby na nerozpustný formazán fialovej farby. MTT, štruktúrne 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, je pridaný k bunkám vystaveným testovanej látke, pričom vzniká nerozpustný formazán rozštiepením tetrazolového jadra v molekule MTT. Formazanový produkt sa následným rozpustením organickým rozpúšťadlom uvoľní z vnútra buniek. Takto vzniknutý roztok formazánu je kvantifikovaný spektrofotometricky, zlúčenina má maximum absorpcie žiarenia pri vlnovej dĺžke 540 nm. Intenzita farby vzniknutého formazánu je funkciou počtu živých, viabilných buniek z testovacej kultúry. Vysoká intenzita fialovej farby poukazuje na vysokú životaschopnosť buniek, zatiaľ čo nízka intenzita fialovej farby formazánu znamená znížený počet živých buniek, a tým aj cytotoxicitu analyzovanej látky. MTT testy je možné vykonávať na ľudských keratinocytoch alebo melanocytoch [77], [79].

2.10 Doterajšie výsledky v problematike

Vitamín A a vitamín E boli úspešne zabudované do biologicky odbúrateľných želatínových nanovláknien pomocou elektrostatického zvlákňovania. Vitamín E chráni vitamín A pred oxidáciou, čo má za následok menšiu degradáciu počas procesu uvoľňovania zlúčenín z vláknien. Želatínové vlákna pripravené elektrospinningom vykazovali trvalé uvoľňovanie zakomponovaných zlúčenín po dobu viac ako 60 hodín a dominantným mechanizmom ich uvoľňovania bola difúzia [80].

Hani a kolektív enkapsulovali bioaktívny extrakt z rastliny moringy olejodarnej do želatínových nanovláknien zvláknených z 30 % roztoku kyseliny octovej na zlepšenie stability a udržanie antioxidačnej aktivity tohto bioaktívneho roztoku [72]. Do želatínových vláknien pripravených elektrostatickým zvlákňovaním tiež z roztoku kyseliny octovej bol enkapsulovaný aj pomarančový esenciálny olej. Na optimalizáciu vlastností nanovláknien bolo použité chemické zosieťovanie vláknien pomocou kyseliny tanínovej. Takto pripravené vlákna poskytli vhodné riadené uvoľňovanie pomarančového esenciálneho oleja a boli úspešné pri zlepšovaní jeho stability pri skladovaní [81].

V roku 2017 boli tímom vedcov skúmané rôzne parametre elektrostatického zvlákňovania želatíny z roztokov s netoxickými rozpúšťadlami. Hlavným cieľom bolo objasnenie, ako je morfológia a priemer vláknien vyrobených z roztoku želatíny v kyseline octovej ovplyvnená koncentráciou rozpúšťadla a parametrami procesu (rýchlosť prietoku, použité napätie, vzdialenosť medzi hrotom ihly a kolektorom) [82].

3 CIELE PRÁCE

V rámci tejto bakalárskej práce budú riešené nasledujúce úlohy:

- 1) Spracovanie rešerše na danú tému
- 2) Kultivácia vybraných rias a príprava ich extraktov
- 3) Prídavok vybraných riasových extraktov do organických vlákien
- 4) Vyhodnotenie výsledkov a diskusia

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité na kultiváciu siníc a mikrorias

- Chlorid mangánatý tetrahydrát p.a., Lachema (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Penta (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)
- Hydrogenuhličitan sodný, Lachema (ČR)
- Hydroxid draselný, Lach-ner, S.r.o. (CZE)
- Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)
- Dusičnan kobaltnatýhexahydrát p.a., Penta (ČR)
- Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina bóritá p.a., Lachema (ČR)
- Kyselina sírová 96 %, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
- Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta (ČR)
- Síran draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Síran meďnatý pentahydrát, Penta (ČR)
- Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Síran zinočnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Uhličitan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Vitamín B₁₂, Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.2 Chemikálie použité na prípravu extraktov a ich charakterizáciu

- Folin-Ciocalteu činidlo, Sigma-Aldrich (Švajčiarsko)
- Ethanol, 96 % p.a., Penta (ČR)
- Ethanol 96 % pro UV–VIS, Penta (ČR)
- ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Uhličitan sodný (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Uhličitan vápenatý (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Hydroxid sodný (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Tetrahydrát vínanu sodno-draselného (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Pentahydrát síranu meďnatého (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Chlorid hlinitý (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Dusitan sodný (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Hexahydrát chloridu hlinitého (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Sigma-Aldrich, (Nemecko)
- Hexán (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Chloroform (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Metanol (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)

- Hexahydrát chloridu železitého (p.a.), Lach-ner, s.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie použité na prípravu organických vlákien

- Želatína, Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina octová, Lach-ner, s.r.o. (ČR)

4.1.4 Chemikálie použité na kultiváciu keratinocytov a na MTT test

- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Dodecylsírán sodný – Serva, (Nemecko)
- MTT – Duchefa Biochemie (Holandsko)
- Trypsin – Versene EDTA, P-Lab (ČR)
- FBS fetálne bovinné sérum – HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.) – Vitrum, LachNer (ČR)
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera) – Biotech (Nemecko)

4.2 Použité prístroje a pomôcky

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Multi Speed vortex MSV-3500, Biosan (Litva)
- Centrifuga, Sartorius Sigma (Nemecko)
- Centrifuga Minispin®, Eppendorf (Nemecko)
- Spektrofotometr Helios γ , Unicam (VB)
- NanoPhotometer TM, Implen (D)
- Predvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Nemecko)
- Soxhletov extraktor – Soxtherm, Gerhardt (D)
- Vakuová rotačná odparka Werke RV06-ML: IKA (Nemecko)
- Temperovaná trepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
- Chromatografická zostava Dionex UltiMate 3000
 - DAD detektor rady Vanquish (Thermo Fischer, USA)
 - kolóna Kinetex C18 EVO (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)
 - Vyhodnocovací software Chromeleon (Thermo Fischer, USA)
- ELISA reader BioTek ELx808 (USA)
- Biohazard box, model Airstream, trieda II, ESCO, Biotech (Nemecko)
- Miešadlo Werke RW11 basic: IKA (Nemecko)
- Vodný kúpeľ Laboplay, Unimed (ČR)
- NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)
- Zostava na elektrospining
 - Pumpa New Era Pump Systems model NE-300, SyringePump (USA)
 - Regulovateľný zdroj napätia
- Bežné laboratórne sklo a pomôcky

4.3 Použité kmene rias a siníc

- *Arthrospira maxima* CCALA 027, kultivovaná na FCH VUT
- *Chlorella sorokiniana* CCala 260, kultivovaná na FCH VUT
- *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 974, kultivovaný na FCH VUT
- *Scenedesmus acutus* CCALA 437, kultivovaný na FCH VUT
- Komerčné dostupná biomasa vo forme prášku:
 - *Spirulina alga* (EkoKoža)
 - *Chlorella vulgaris* (EkoKoža)
 - *Chlorella česká* (Neobotanics)

4.4 Použité humánne bunkové kultúry

- HaCaT – imortalizované kožné bunky – keratinocyty (CLS Cell Lines Service)

4.5 Kultivácia mikrorias a siníc

Pre účely tejto práce boli v rámci experimentálnej časti kultivované mikroriasy *Scenedesmus acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii* a sinica *Arthrospira maxima*. Ostatné použité nekomerčné riasy boli kultivované na FCH VUT už vopred. Mikroriasy aj sinica *Arthrospira maxima* boli ako čisté kultúry získané zo zbierky autotrofných organizmov (CCALA) z botanického ústavu AV ČR v Třeboni. Pri laboratórnej práci súvisiacej s kultiváciou rias a siníc boli dodržiavané základy aseptickkej práce, aby sa predišlo kontaminácii kultivovaných mikroorganizmov. Laboratórne vybavenie, s ktorým kultivované mikroorganizmy prišli do styku bolo vopred vysterilované za mokra alebo ohňom, vysvietené UV žiarením, alebo pretrené 70 % etanolom. Pre kultiváciu rias a siníc boli použité médiá, ktoré slúžia ako inokulačné aj produkčné. Pre kultiváciu sinice *Arthrospira maxima* bolo zvolené *Spirulina* médium, na kultiváciu rias *Scenedesmus acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii* bolo použité BBM médium. Mediá boli sterilizované po dobu 45 minút pri 120 °C v autokláve. Zloženie aj príprava médiá bola vykonaná podľa zbierky CCALA. Do sterilnej Erlenmeyerovej banky s médiom bola asepticky zaočkovaná kultúra vybranej riasy alebo sinice zo zásobnej Petriho misky s tuhým médiom. Vzorka inokula bola sterilne odobraná, následne bola premeraná absorbancia a kultúra mikroorganizmu bola zaočkovaná do produkčného média tak, aby sa absorbancia vzniknutého roztoku blížila hodnote $A = 0,1$. Kultivácia rias aj siníc prebiehala pod dobu 21 dní v tekutom médiu vo fotobioreaktoroch, u ktorých boli zapojené paralelne fľaše o objeme 2 000 ml. Kultivácia mikroorganizmov prebiehala za nepretržitého osvetlenia a prevzdušňovania pri laboratórnej teplote.

Sinica *Arthrospira maxima* vyžaduje na kultiváciu tzv. *Spirulina* médium, ktoré musí byť pripravené z dvoch zásobných roztokov. Zloženie roztokov 1 a 2 zobrazuje Tabuľka 2 a Tabuľka 3.

Tabuľka 2: Zloženie kultivačného média *Spirulina* 1 pre sinice

<i>Spirulina</i> 1	
Chemikálie	[g/500 ml dH₂O]
NaHCO ₃	13,61
Na ₂ CO ₃	4,03
K ₂ HPO ₄	0,5

Tabuľka 3: Zloženie kultivačného média *Spirulina 2* pre sinice

<i>Spirulina 2</i>	
Chemikálie	[g/500 ml dH₂O]
NaNO ₃	2,5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,08
Roztok stopových prvkov	5 ml
Vitamín B12	1 ml

Kultivácia rias *Scenedesmus acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii* vyžaduje médium BBM. Pri príprave tohto média bolo najprv do 900 ml destilovanej vody pridaných po 10 ml prvých šiestich roztokov zlúčenín, ktoré uvádza Tabuľka 4. Zvyšné roztoky boli pridané v objeme 1 ml. Po sterilácii média v autokláve prebehla kontrola jeho pH, ktoré má mať hodnotu 6,6.

Tabuľka 4: Zloženie kultivačného média BBM pre riasy

Chemikálie	[g/l dH₂O]
NaNO ₃	25,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50
K ₂ HPO ₄	7,50
KH ₂ PO ₄	17,50
EDTA	50,00
NaCl	2,50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49
KOH	31,00
H ₂ SO ₄ 96 %	1 ml



Obrázok 7: *Spirulina alga* a *Chlamydomonas reinhardtii* po zaočkovaní

4.6 Spracovanie biomasy

Po ukončení kultivácie bola vypestovaná kultúra centrifugovaná pri otáčkach 6 000–11 000 RPM počas 5 minút. Supernatant bol následne zliaty a biomasa bola cez noc zamrazená pri teplote -80°C a následne bola lyofilizovaná. Po lyofilizácii boli vzorky biomasy uchovávané pri teplote -20°C .

4.7 Príprava extraktov z mikrorias a siníc

Z biomasy mikrorias *Scenedesmus acutus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Arthrospira maxima* (kultivovaných na FCH VUT v rozličných obdobiach) a z komerčnej vysušenej biomasy riasy Česká chlorella, sinice *Spirulina alga* a rastliny *Centella asiatica* boli pripravené vodné extrakty a extrakty do roztokov etanolu o rôznych koncentráciách. Hexánové extrakty boli pripravené len z komerčne dostupných rias a siníc, vo vysušenej práškovej forme, konkrétne druhy *Chlorella vulgaris*, *Spirulina alga* a taktiež rastliny *Centella asiatica*. Rastlina *Centella asiatica*, ktorej extrakty sú v súčasnosti v kozmetických produktoch častou zložkou, bola zaradená do experimentu ako rastlina na porovnanie s riasami a sinicami.

4.7.1 Príprava vodných a etanolových extraktov

Do plastových centrifugačných skúmaviek bolo navážených po 0,1 g biomasy rias, respektíve siníc, na 10 ml extrakčného činidla. Boli pripravené extrakty do vody a do etanolu. Etanolové extrakty boli pripravené v etanole o koncentráciách 20 %, 60 % a 96 hm. %. Extrakcie boli vykonávané následne, najskôr do vody, následne do 20 % etanolu, 60 % etanolu a nakoniec do 96 % etanolu. Pripravené suspenzie biomasy a extrahovadla boli zakaždým ponechané extrahovať sa na trepačke temperovanej na 37°C po dobu 24 hodín. Po uplynutí tejto doby boli skúmavky následne zcentrifugované (6 000 RPM po dobu 5 minút pri teplote 20°C). Po centrifugácii bol z každej skúmavky odpipetovaný maximálny možný objem supernatantu (extraktu) do čistej označenej skúmavky. Takto pripravené extrakty boli uchovávané v tme pri teplote 5°C .

4.7.2 Príprava hexánových extraktov podľa Soxhleta

Na analytických váhach bolo do papierových extrakčných patrón navážených po 1 g komerčnej riasy. Následne bola extrakčná patróna utesnená vatou, uložená do sklenených nádob určených na extrakciu. Patróny boli zaliate 100 ml rozpúšťadla (hexán) a vložené do extraktoru Soxtherm. Následne bol pomocou počítača spustený program na extrakciu hexánom s teplotou extrakcie 170°C po dobu 3 hodín, pričom samotná extrakcia horúcim rozpúšťadlom prebiehala 1,5 hodiny. Pripravené extrakty boli prevedené do slzičkových baniek a z extraktov bol na vákuovej rotačnej odparke odparený hexán. Vytvorený film extraktov na stenách slzičkových baniek bol kvantitatívne prevedený do sklenených vialiek pomocou známeho objemu 96 % etanolu, v ktorom extrakt zostal rozpustený. Veko vialiek bolo uzavreté parafrínovým filmom a vialky s extraktmi boli uchovávané v tme a chlade.

4.8 Analýza extraktov z mikrorias a siníc

Pre všetky typy pripravených extraktov (vodné, etanolové aj hexánové) bola analyzovaná celková výťažnosť extrakcie, boli merané absorpčné spektrá všetkých pripravených extraktov pomocou UV-VIS spektrofotometrie, na základe ktorých bol následne pre extrakty stanovený obsah karotenoidov a chlorofylov. Pre všetky extrakty bola tiež spektrofotometricky stanovená antioxidačná aktivita a celkový obsah fenolických látok. Pre vodné extrakty bolo navyše vykonané stanovenie obsahu celkových proteínov spektrofotometricky. Analýza karotenoidov a chlorofylov pomocou HPLC/DAD prebehla pre extrakty do 96 % etanolu.

4.8.1 Celková výťažnosť extraktov

Z každého etanolového extraktu rias a siníc bol odpipetovaný presný objem (1 ml) do dopredu zvážených a označených eppendorf skúmaviek. Tieto otvorené skúmavky boli následne umiestnené v stojane do digestora a boli ponechané na odparenie rozpúšťadla. Po odparení všetkého rozpúšťadla boli skúmavky znovu zvážené na analytických váhach. Vďaka takto zistenému pevnému podielu v extraktoch bola zistená celková hmotnostná koncentrácia všetkých vyextrahovaných látok z biomasy rias a siníc. Z vodných extraktov bolo odobraných po 1 ml vzorky do predom zvážených skúmaviek eppendorf. Otvor skúmaviek bol prelepený prederaveným parafinovým filmom. Skúmavky boli následne cez noc zarazené pri teplote -80°C . Takto pripravené vzorky v skúmavkách boli následne umiestnené do lyofilizačného zariadenia na dobu 24 hodín, kde došlo k vysušeniu vzoriek mrazom. Po odstránení vody lyofilizáciou boli skúmavky s pevným podielom extraktu opäť zvážené a bola určená celková hmotnostná koncentrácia všetkých vyextrahovaných látok. Rozpúšťadlo z hexánových extraktov komerčných rias bolo odparené na vákuovej rotačnej odparke, čo bolo následne použité na určenie ich celkovej hmotnostnej koncentrácie. Slzičkové banky boli pred použitím dôkladne vysušené v sušiarňi a následne umiestnené do exsikátoru až do vychladnutia. Potom boli odvážené na analytických váhach a použité na odparenie extraktov. Po odparení rozpúšťadla boli banky s filmom extraktov na svojich stenách znovu zvážené, následne bolo extrakty kvantitatívne prevedené do sklenených vialiek rozpustením v definovanom objeme rozpúšťadla.

4.8.2 Meranie absorpčného spektra extraktov pomocou UV-VIS spektrofotometrie

Vzorky etanolových extraktov a odparených hexánových extraktov rozpustených v etanole boli podľa potreby nariadené etanolom pre UV-VIS, vzorky vodných extraktov boli vhodne nariadené destilovanou vodou tak, aby absorbancia pri vlnových dĺžkach nad 280 nm neprekročila hodnotu 2,0. Pomocou nanofotometra bolo premerané absorpčné spektrum vzoriek v intervale 200–800 nm proti etanolu pre UV-VIS ako blanku, respektíve proti destilovanej vode ako blanku pre vodné extrakty.

4.8.2.1 Stanovenie karotenoidov a chlorofylov v extraktoch

Na určenie koncentrácie chlorofylu *a* v extraktoch bol použitý vzťah uvedený v Rovnici (2), obsah chlorofylu *b* bol stanovený výpočtom zo vzťahu v Rovnici (3) a obsah celkových karotenoidov bol určený na základe vzorca z Rovnice (4). Tieto vzťahy boli prevzaté od Hartmuta K. Lichtenthalera et al [51]. Na výpočet koncentrácií jednotlivých pigmentov v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ boli použité hodnoty absorbancií pri vlnových dĺžkach 470, 649 a 664 nm, pričom bolo zohľadnené aj riedenie vzoriek extraktov. Takto stanovené koncentrácie boli následne prepočítané na koncentrácie vyextrahovaných látok v mg na g navážky riasy/sinice.

$$c_a = (13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}) [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (2)$$

$$c_b = (27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664}) [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (3)$$

$$c_{\text{karotenoidy}} = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot c_a - 97,64 \cdot c_b)/209 [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (4)$$

4.8.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity spektrofotometricky metódou TEAC

Na vytvorenie radikál katiónu $\text{ABTS}^{+\cdot}$ bolo ABTS rozpustené v destilovanej vode na koncentráciu $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, a peroxodisíran sodný bol rozpustený na koncentráciu $2,45 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následne bola zmes ABTS a $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ premiešaná a ponechaná reagovať najmenej 12 hodín v tme. Takto pripravený zásobný roztok radikálu bol pred použitím zriedený etanolom pre UV-VIS na absorbanciu o hodnote $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm oproti etanolu pre UV-VIS ako blanku. Z takto nariadeného zásobného roztoku bol pipetovaný 1 ml do skúmavky eppendorf, k nemu bolo následne pridaných 10 μl vody a po premiešaní bola ihneď zmeraná absorbancia pri 734 nm oproti etanolu pre UV-VIS. Táto hodnota poskytla absorbanciu A_0 . Do označených eppendorf skúmaviek bolo napipetovaných po 1 ml zriedeného roztoku $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a 10 μl vzorky vodných a alebo etanolových extraktov rias. Zmes bola dôkladne premiešaná a ponechaná 10 minút reagovať v tme. Po uplynutí 10 minút bola zmes opäť premiešaná a preliata do zúženej kyvety. Pre každú vzorku bola takto zmeraná jej absorbancia A_{10} pri 734 nm. Pokles absorbancie každého extraktu bol vypočítaný z rozdielu hodnôt A_0 a A_{10} . Celková antioxidačná aktivita extraktov bola stanovená dosadením poklesu absorbancie do vzťahu kalibračnej závislosti antioxidačnej krivky Troloxu v rozmedzí koncentrácií $0,025\text{--}0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, vid' Rovnice (5) a (6). Na zostrojenie kalibračnej závislosti bol Trolox ako modelový antioxidant rozpustený v 60 % etanole pre UV-VIS na dopredu definované koncentrácie a premeraný rovnakým postupom ako vzorky. Pri výpočte antioxidačnej aktivity extraktov na základe kalibračnej závislosti bolo zohľadnené prípadné nutné zriedenie niektorých extraktov. Takto vypočítané koncentrácie boli následne prepočítané na koncentrácie vyextrahovaných látok v miligramoch na gram navážky riasy.

$$A = 1,310\ 3 \cdot c [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (5)$$

$$R^2 = 0,991\ 8 \quad (6)$$

4.8.4 Stanovenie polyfenolov spektrofotometricky

Na stanovenie obsahu celkových polyfenolov v extraktoch bola použitá metóda s Folin–Ciocalteuovým činidlom, ktoré je zriedené v pomere 1:9. Do skúmavky bolo napipetovaných po 1 ml činidla, 1 ml destilovanej vody a 50 μl extraktu z rias. Po premiešaní na vortexe a uplynutí 5 minút bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu vápenatého. Po opätovnom premiešaní na vortexe a uplynutí 15 minút bola na spektrofotometri zmeraná absorbancia vzoriek pri vlnovej dĺžke 750 nm. Ako blank bol použitý roztok pripravený rovnakým postupom, avšak namiesto vzorky extraktu bolo pridaných 50 μl vody. Koncentrácia celkových polyfenolov bola stanovená pomocou kalibračnej závislosti kyseliny gallovej v koncentračnom rozmedzí $0,087\ 5\text{--}0,700\ 0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vo vode, vid' Rovnice (7) a (8).

$$A = 1,324\ 6 \cdot c [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (7)$$

$$R^2 = 0,981\ 3 \quad (8)$$

4.8.5 Stanovenie proteínov podľa metódy Hartree-Lowryho

Na stanovenie celkových proteínov prítomných vo vodných extraktoch rias boli najprv pripravené činidlá A, B a C potrebné na Hartree-Lowryho metódu. Do skúmaviek bolo napipetovaných po 1 ml vzorky vodných extraktov (u slepej vzorky 1 ml destilovanej vody) a 0,9 ml činidla A. Roztok v skúmavke bol po premiešaní následne inkubovaný vo vodnom kúpeli pri teplote $50\ ^\circ\text{C}$ po dobu 10 minút. Po pridaní 0,1 ml činidla B bol obsah skúmaviek opäť premiešaný a pri laboratórnej teplote inkubovaný po dobu 10 minút. Nakoniec boli do každej skúmavky pridané 3 ml činidla C. Pripravené roztoky boli opäť premiešané na vortexe a inkubované vo vodnom kúpeli na teplotu $50\ ^\circ\text{C}$ na 10 minút. Po uplynutí inkubačnej doby boli roztoky v skúmavkách ochladené na laboratórnu teplotu. Následne bola stanovená absorbancia jednotlivých roztokov pri vlnovej dĺžke 650 nm oproti slepej vzorky. Niektoré roztoky boli vhodne nariadené destilovanou vodou tak, aby absorbancia vzorky neprekročila hodnotu 1,0. Výsledná koncentrácia proteínov v extraktoch bola vypočítaná z kalibračnej rovnice, vid' Rovnice (9) a (10), ktorá bola zostrojená pre bielkovinový štandard albumínu v rozmedzí

koncentrácií 0,03–0,21 mg·ml⁻¹. Pri výpočte koncentrácií bolo zohľadnené riedenie pripravených roztokov. Takto stanovené koncentrácie proteínov boli následne vynásobené objemom celého extraktu a vzťahnuté na pôvodnú navážku riasy na získanie hmotnostného podielu proteínov v celkovej biomase riasy.

$$A = 0,1228 \cdot c [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] \quad (9)$$

$$R^2 = 0,9941 \quad (10)$$

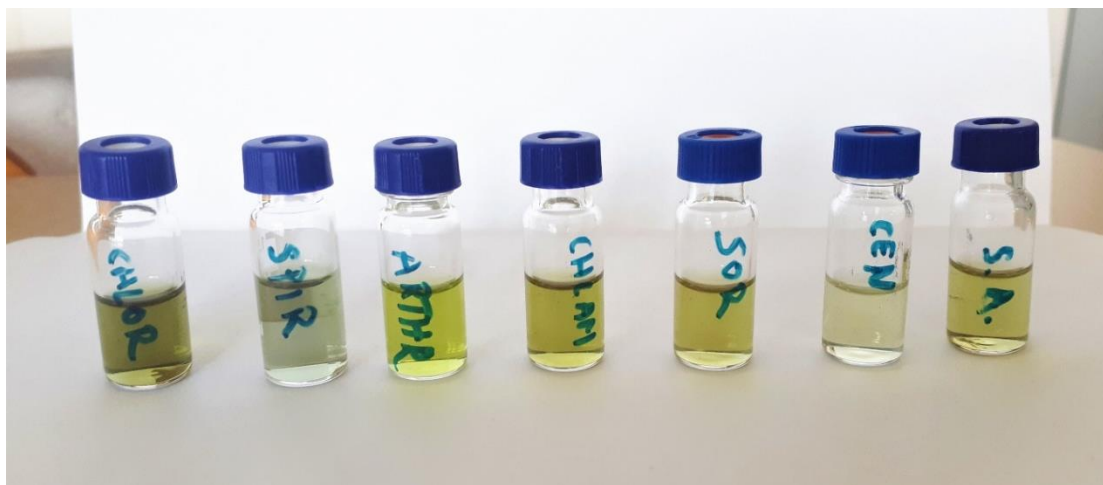
Činidlo A: 50 ml NaOH o koncentrácii 1 mol·l⁻¹, 10 g Na₂CO₃, 0,2 g tetrahydrátu vínanu sodno-draselného, destilovaná voda do objemu 100 ml.

Činidlo B: 10 ml NaOH o koncentrácii 1 mol·l⁻¹, 1 g pentahydrátu síranu meďnatého, 2 g tetrahydrátu vínanu sodno-draselného, destilovaná voda do objemu 100 ml.

Činidlo C: zriedený roztok Folin-Ciocalteuov v pomere 1:15 destilovanou vodou.

4.8.6 Stanovenie karotenoidov a chlorofylov pomocou HPLC

Z 96 % etanolových extraktov rias bolo napipetovaných po 1,2 ml do eppendorf skúmaviek, tieto boli centrifugované po dobu 5 minút pri 13 400 RPM. Následne bol supernatant odobraný a prefiltrovaný cez PTFE filter do čistých vialiek. Vzorky boli analyzované na chromatografickej zostave Dionex UltiMate 3 000 s DAD detektorom rady Vanquish (Thermo Fischer, USA) na kolóne Kinetex C18 EVO (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) pri prietoku 1,2 ml·min⁻¹, pri teplote separácie 25 °C v gradientovej elúcii s mobilnými fázami A a B. Mobilná fáza A bola zložená z acetonitrilu, tris(hydroxymetyl)aminometanhydrochloridu o pH 8 a metanolu zmiešaných v pomere 84:14:2, mobilná fáza B bola zmesou metanolu a etylacetátu v pomere 60:40.



Obrázok 8: Extrakty do 96 % etanolu pripravené na analýzu HPLC

4.9 Príprava a charakterizácia vlákien

V experimente boli pripravené technikou elektrostatického zvlákňovania organické nanovlákná na báze želatíny. Proces elektrostatického zvlákňovania na použitej elektrospinnngovej zostave bol zhodnotený z hľadiska efektivity na základe porovnania teoretickej a reálnej hmotnosti pripraveného zvlákneného materiálu vo vzťahu k celkovému objemu zvlákneného roztoku. Čisté želatínové vlákna aj želatínové vlákna s prísadou extraktov z rias a siníc boli následne podrobené ďalšej analýze. Pre vzorky pripravených vlákien s prísadou extraktov bola stanovená ich antioxidačná aktivita pomocou metódy TEAC. Na analýzu cytotoxicity vlákien bol vykonaný MTT test, vlákna s najvyššími koncentraciami pridaných extraktov boli testované na ľudských keratinocytoch línie HaCaT.

4.9.1 Príprava pracovných roztokov želatíny na zvlákňovanie

Pre prípravu vlákien bol vytvorený zásobný roztok želatíny tak, aby vznikol roztok o koncentrácii 30 hm. % želatíny v roztoku 50 % kyseliny octovej. Potrebná navážka želatíny bola kvantitatívne prevedená do definovaného objemu dopredu pripraveného roztoku 50 % kyseliny octovej, takto pripravená zmes bola zahriata na vodnom kúpeli a premiešaná na vortexe, aby došlo k dokonalému rozpusteniu želatíny a vytvoreniu homogénneho roztoku. Následne boli zo základného roztoku želatíny pripravené na zvláknenie ďalšie roztoky s obsahom extraktov rias a siníc. Do plastových skúmaviek bolo napipetovaných po 5 ml zo zásobného 30 % roztoku želatíny v 50% kyseline octovej. Na vytvorenie rôznych koncentrácií pracovných roztokov s prímiesou extraktov bolo z vybraných vodných a etanolových extraktov pipetovaných do 5 ml roztoku želatíny vždy po 150, 600 a 1200 µl. Pre každý použitý extrakt boli teda vytvorené 3 roztoky s rôznou koncentráciou. Takto pripravené zmesi boli následne dôkladne premiešané a uchované v plastovej skúmavke na ďalšie použitie. Použité extrakty rias na prípravu zvlákňovacích roztokov s prímiesou zobrazuje Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Príprava zvlákňovacích roztokov s prídavkom riasových extraktov

extrakt pridaný do 50 % roztoku kyseliny octovej	Napipetovaný objem extraktu [µl]		
	150	600	1 200
	Koncentrácia výsledného roztoku [obj. %]		
	2,913	10,714	19,355
	Označenie vzorky		
Vodný e. <i>Arthrospira maxima</i>	1a	1b	1c
Vodný e. <i>Spirulina alga</i>	2a	2b	2c
Vodný e. <i>Centella asiatica</i>	3a	3b	3c
Vodný e. <i>Chlorella česká</i>	4a	4b	4c
Vodný e. <i>Scenedesmus ac</i> ,	5a	5b	5c
96 % EtOH e. <i>Chlorella česká</i>	6a	6b	6c

4.9.2 Zvlákňovanie roztokov metódou elektrospinningu

Prebehlo zvlákňovanie čistého 30 % roztoku želatíny v kyseline octovej a boli pripravené želatínové vlákna s prímiesou extraktov rias o rôznych koncentráciách. Na prípravu vlákien bola použitá metóda elektrostatického zvlákňovania na laboratórnej elektrospinningovej zostave zhotovenej Vysokým učením technickým v Brne. Najskôr bola kovová doska, slúžiaca ako kolektor, na ktorý sa zachytáva vzniknutý zvláknený materiál, pokrytá hliníkovou fóliou. Takto vytvorený kolektor bol uzemnený. Injekčná striekačka bola naplnená približne 5 ml príslušného zásobného roztoku. Na striekačku bola následne nasadená tenká ihla, slúžiaca ako zvlákňovania elektróda, o priemere 1,2 mm a dĺžke 3 cm. Striekačka bola prichytená do dávkovacej pumpy tak, aby vzdialenosť hrotu ihly a kolektoru bola 10 cm. Ihla a kolektor boli následne pripojené ku kladnému a zápornému pólu zdroja vysokého napätia svorkami. Kladné napätie je napojené na ihlu injekčnej striekačky, záporné napätie bolo zavedené na kovový kolektor. Zvlákňovanie prebiehalo pri napätí 15 kV a pumpa bola nastavená na vhodný prietok roztoku. Elektrospinning prebiehal pri laboratórnej teplote v rozmedzí teplôt 19–20 °C a pri laboratórnej vlhkosti vzduchu. Celý proces bol počas priebehu zvlákňovania pozorovaný, pre možné chyby zvlákňovacej sústavy. Po ukončení zvlákňovania bol vytvorený vlákenný materiál opatrne odobraný z kolektoru a uchovaný v označených Petriho miskách pre ďalšiu prácu a analýzu.

4.9.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity vlákien metódou TEAC

Antioxidačná aktivita vlákien bola stanovená metódou uvedenou v kapitole 4.8.3. Z každého typu nanovlákien pripravených elektrospinningom bol vystrihnutý štvorec o ploche približne 1 cm². Vzorka bola následne zvážená a vložená do skúmavky, do ktorej bolo napipetovaných 2 ml roztoku radikálového kationu ABTS^{•+} zriedeného na hodnotu absorbancie $0,7 \pm 0,02$ pri 734 nm. Vláknko bolo ponorené do roztoku ABTS^{•+} a po uplynutí 10 minút bol sledovaný pokles absorbancie a vypočítaná antioxidačná aktivita podľa popisu v kapitole 4.8.3. Z každého typu vlákna boli takto testované 2 štvorcové vzorky vystrihnuté z inej časti vlákna, aby bolo zohľadnené prípadné nerovnomerné rozloženie látok s antioxidačným účinkom vo vláknach. Celý postup merania bolo zopakovaný trikrát, vždy v štvordňových rozstupoch, aby bolo možné sledovať stabilitu antioxidačnej aktivity počas doby skladovania vlákien pri laboratórnej teplote v Petriho miskách.

4.9.4 Stanovenie efektivity zvlákňovania

Efektivita procesu zvlákňovania bola posúdená na základe porovnania teoretickej hmotnosti pevného podielu zvlákneného objemu roztoku po odparení kyseliny octovej ako rozpúšťadla a reálnej hmotnosti pripravených vlákien.

4.9.5 Testovanie rýchlosti rozpúšťania vlákien

Z každého typu pripravených vlákien boli vystrihnuté 2 štvorcové vzorky o ploche 1 cm². Keďže jednotlivé vlákna nemali navzájom rovnakú hrúbku, každá vzorka vlákna bola aj zvážená a následne bola meraná rýchlosť rozpustnosti vlákien na prirodzene suchej pokožke a na vodou navlhčenej pokožke.

4.10 Testovanie cytotoxicity vlákien

Cytotoxicita vlákien bola študovaná na ľudských keratinocytoch, nakoľko pripravené materiály majú potenciálne využitie v kozmetike ako masky na tvár.

4.10.1 Kultivácia keratinocytov línie HaCaT

Jednotlivé bunkové línie ľudských keratinocytov HaCaT boli kultivované v sterilnom inkubačnom boxe pri teplote 37 °C, obsahu oxidu uhličitého 5 % a pri relatívnej vlhkosti 90 %. Na kultiváciu bolo použité kultivačné médium DMEM. Kultivačné nádoby aj kultivačné médium boli temperované na teplotu 37 °C. Média boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C, pričom aby nedošlo k teplotnému šoku buniek, bolo pred vlastnou prácou nutné najprv ohriať ich na teplotu 37 °C. Pred výmenou média bol stav buniek, a tiež prítomnosť prípadnej kontaminácie skontrolovaná pomocou inverzného optického mikroskopu.

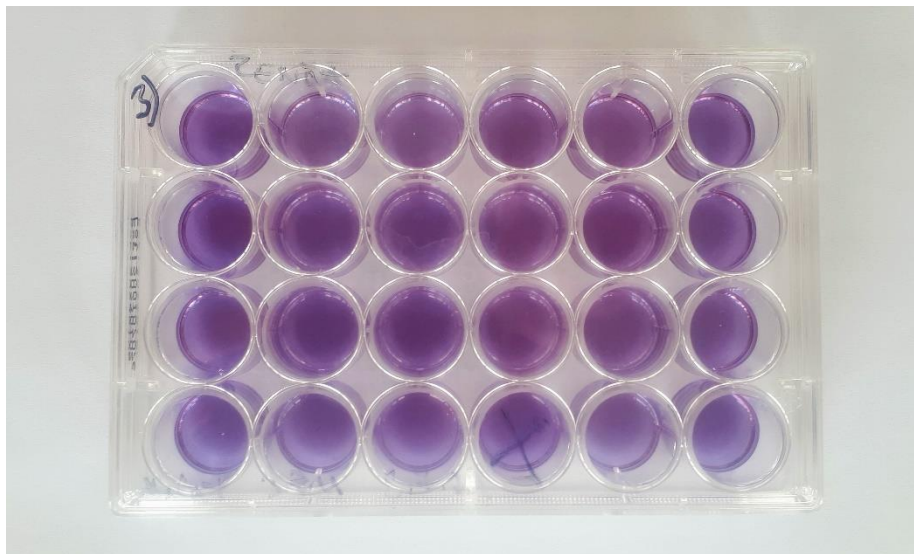
4.10.2 Príprava vlákien pre testovanie toxicity

Na test cytotoxicity vlákien boli použité vzorky čistých želatínových vlákien, ďalej 6 druhov vlákien s najvyšším objemovým zlomkom pridaných extraktov z rias a ďalšie 3 vzorky vlákien pripravených z roztokov s prídavkom vodných extraktov o objeme 600 µl (extrakty z *A. maxima*, *S. alga* a *C. asiatica*). Tieto 3 typy vlákien boli vybrané na základe ich pomerne vysokej antioxidačnej aktivity zistenej metódou stanovenia pomocou ABTS podľa postupu uvedenom v bode 4.9.3. Z vybraných vlákien bola vystrihnutá malá štvorcová časť o ploche 1 cm². Odvážené vzorky nanovláknenného materiálu boli pred inkubáciou s bunkovou kultúrou vysvietené v laminárnom boxe pomocou UV žiarenia po dobu 20 minút.

4.10.3 MTT test vlákien na keratinocytoch

MTT test bol použitý na stanovenie cytotoxického účinku pripravených nanovlákien. Najskôr bolo do každej jamky v 24-jamkovej doštičke napipetovaných po 0,5 ml dopredu nakultivovanej a vhodne zriedenej bunkovej suspenzie, tak, aby sa získala hustota buniek $2-5 \cdot 10^5$ na 1 ml. Takto napipetovaná kultúra bola ponechaná rásť v termostate po dobu 24 hodín v kultivačnom médiu. Následne bolo médium z jamiek odpipetované a nahradené čerstvým médiom o rovnakom objeme. Odvážené a vysvietené vzorky vlákien boli potom pridané do jamiek (okrem jamiek kontrolných). Po inkubácii

doštičky po dobu 24 hodín boli z jamiek odobrané supernatanty buniek. Následne do každej jamky bolo pipetou nadávkovaný roztok MTT o koncentrácii $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Formazanové kryštály, ktoré sa vytvorili po trojhodinovej inkubácii, boli rozpustené v 10 % roztoku SDS vo fosfátovom pufre. Následne bola zmeraná absorbancia jednotlivých jamiek pri vlnovej dĺžke 540 nm pomocou ELISA readeru. Namerané dáta boli prepočítané na percentá viability buniek a vynesené do grafu.



Obrázok 9: 24-jamková doštička s rozpusteným formazánom

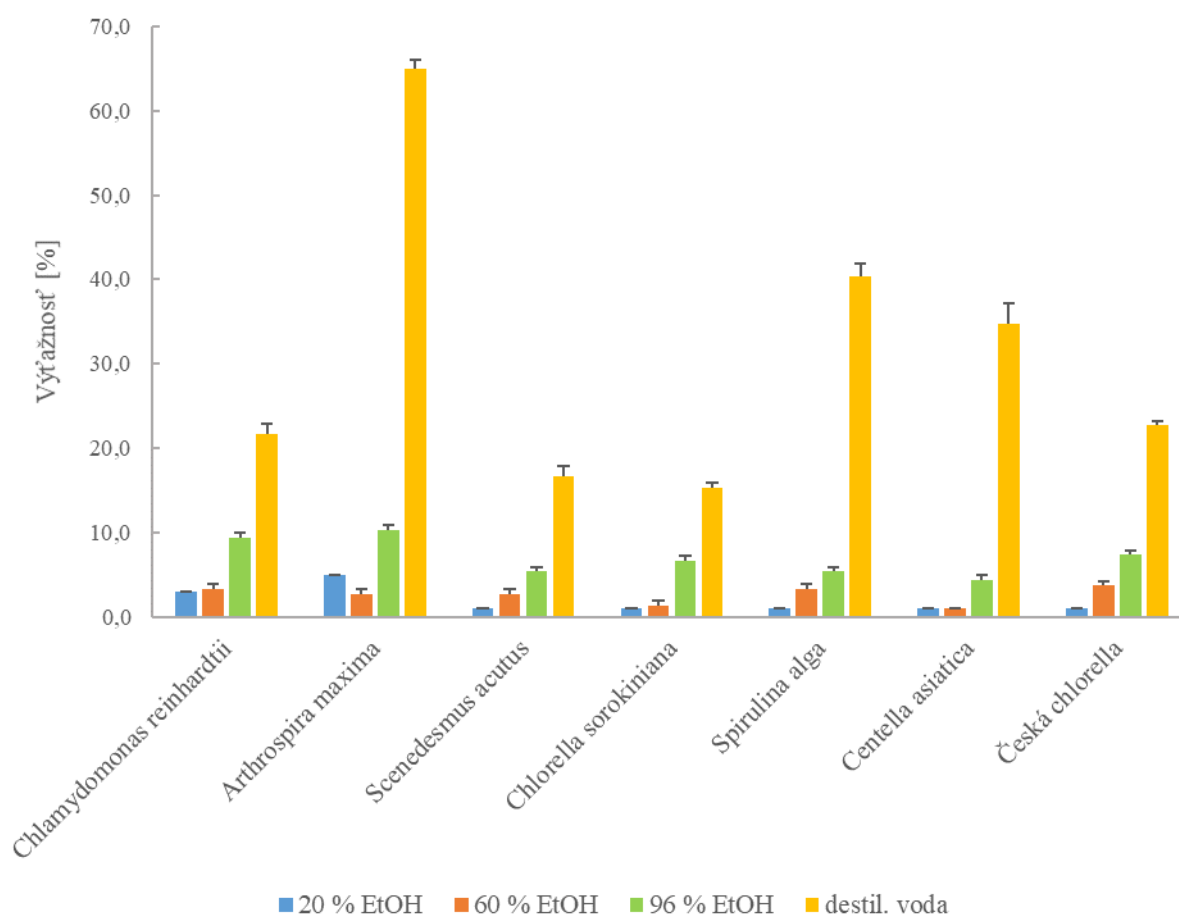
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Charakteristika extraktov rias a siníc

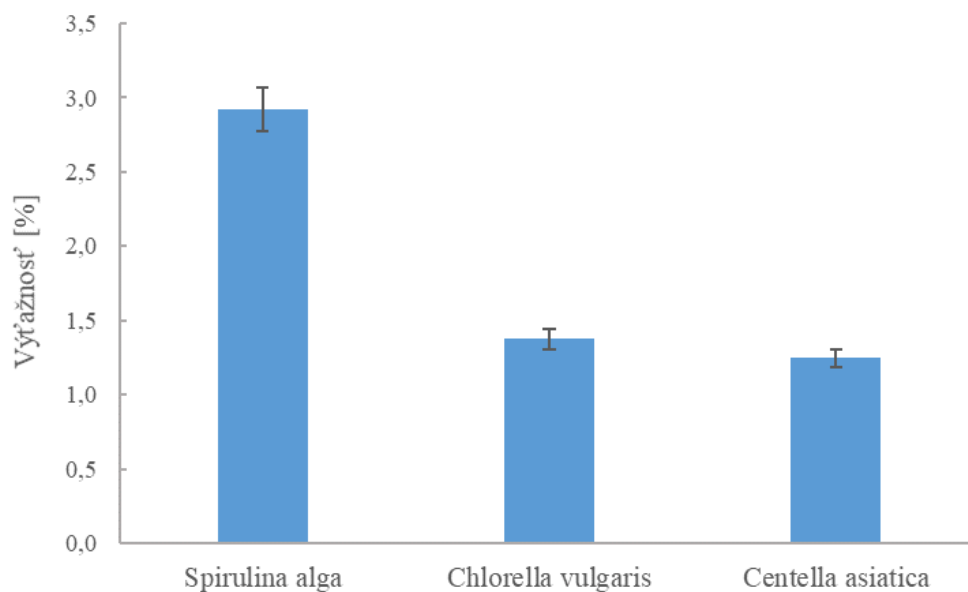
Analyzovali sme tri druhy extraktov – vodné, alkoholové a hexánové, ktoré boli pripravené podľa postupu uvedenom v kapitole 4.7.1 a 4.7.2.

5.1.1 Celková výťažnosť extraktov

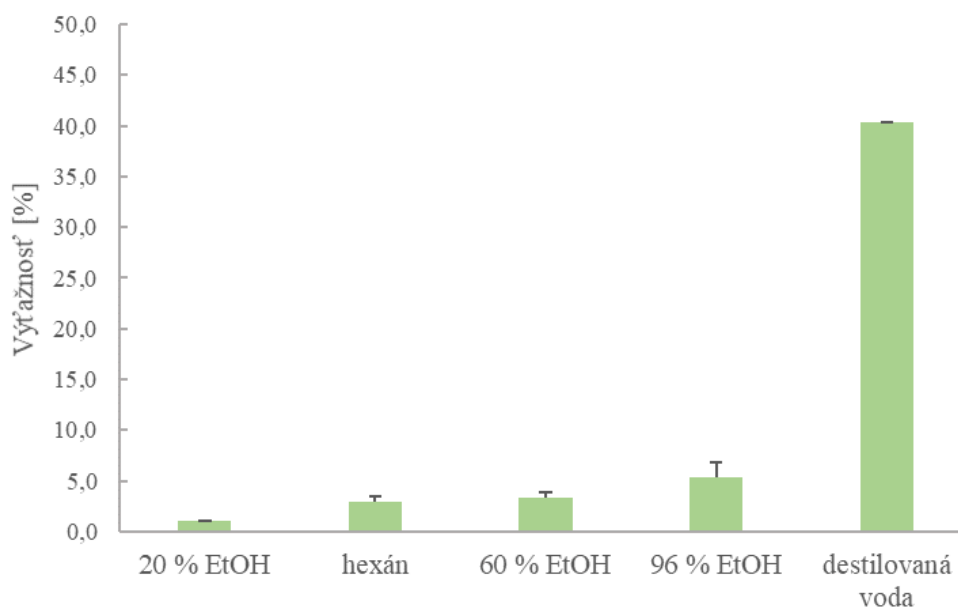
Po vykonaní postupu extrakcie uvedenom v kapitolách 4.7.1 a 4.7.2 a po odparení rozpúšťadla podľa postupu uvedenom v kapitole 4.8.1 bola zistená hmotnostná koncentrácia všetkých vyextrahovaných látok v každom extrakte. Takto získaná koncentrácia bola následne vynásobená celkovým objemom extraktu a vzťahnutá na pôvodnú navážku biomasy určenej na extrakciu. Týmto spôsobom vypočítané hodnoty výťažnosti extrakcie v percentách boli zhrnuté do stĺpcových diagramov na nasledujúcich obrázkoch (viď Obrázok 10 až Obrázok 12).



Obrázok 10: Celková výťažnosť extrakcie biomasy do vody a do 20, 60 a 96 % etanolu



Obrázok 11: Celková výťažnosť extrakcie biomasy do hexánu



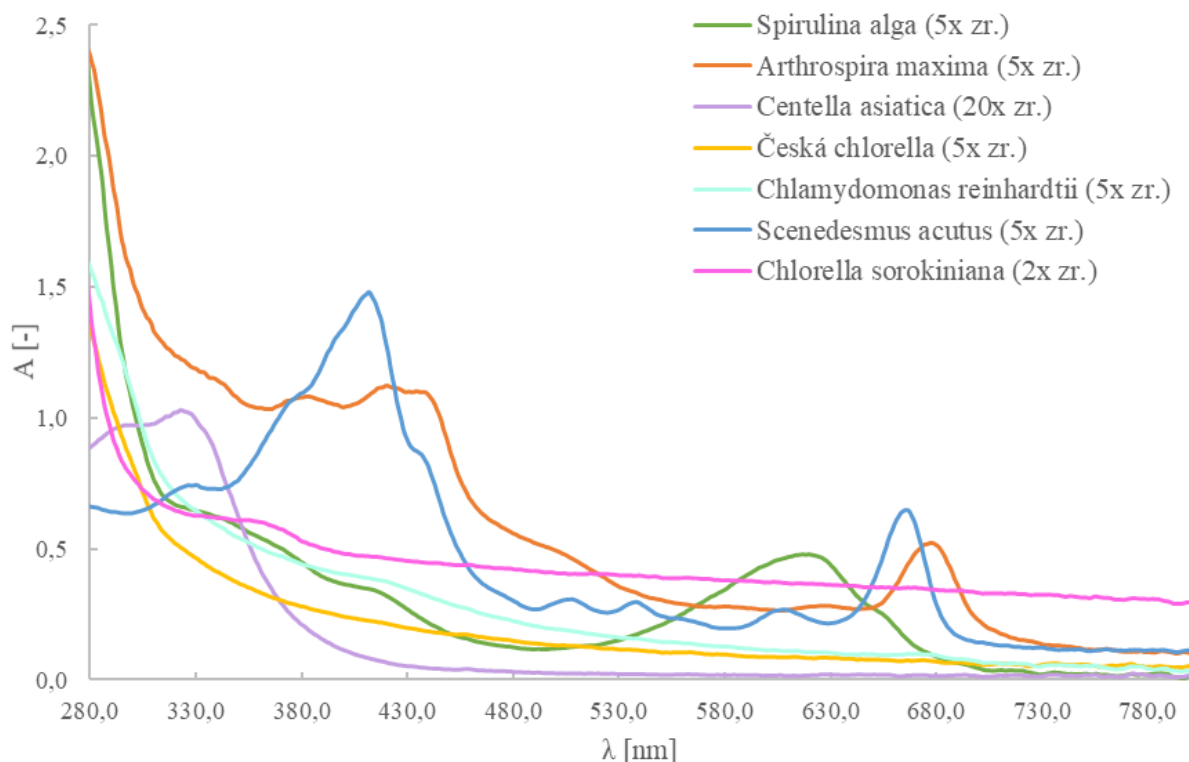
Obrázok 12: Celková výťažnosť extrakcií z komerčnej sinice *Spirulina alga*

Jednotlivé stĺpcové diagramy (Obrázok 10 a Obrázok 11) pre rozličné typy extrakčných činidiel zobrazujú percentuálnu výťažnosť extrakcie pre každý druh využitej riasy, resp. sinice. Stĺpcový diagram na Obrázku 12 znázorňuje vzájomné porovnanie výťažnosti extrakcie biomasy komerčnej sinice *Spirulina alga* do rôznych typov extrahovadiel. Pri porovnaní extrakcií do roztokov etanolu o rôznych koncentráciách možno konštatovať, že s rastúcou koncentráciou etanolu celková výťažnosť narastá. Tento trend zvyšovania výťažnosti možno pozorovať pri takmer všetkých extrahovaných riasach. Pri extrakcii zo sinice *Arthrospira maxima* do 60 % etanolu došlo k miernemu výkyvu od tohto trendu a zníženiu výťažnosti oproti výťažnosti extrakcie do 20 % etanolu. Pri extrakcii vysušenej práškovej biomasy rastliny *Centella asiatica* taktiež došlo k mienej odchýlke od tohto trendu, kedy výťažnosť extrakcie do 20 % a 60 % dosiahla rovnakú hodnotu, a to iba 1 %.

Výrazne najvyššia výťažnosť extrakcie u každej vzorky riasy či sinice sa preukázala pri extrakcii biomasy do destilovanej vody. Avšak tento trend nepreukazuje, že všetky vyextrahované látky sú zároveň aj látky bioaktívne. Koncentrácia extrahovaných látok popisuje celkový obsah sušiny v extraktoch. Pri extrakcii do destilovanej vody mala najvyššiu výťažnosť extrakcia biomasy riasy *Arthrospira maxima* (kultivovaná na FCH VUT), ktorá dosiahla až 65,0 %. Druhú najvyššiu výťažnosť pri extrakcii destilovanou vodou dosiahla komerčná *Spirulina alga*, hodnota výťažnosti dosiahla 40,3 %. Hexánové extrakcie vyextrahovali pomerne malé množstvo látok zo sušiny. Percentuálna výťažnosť extrakcie hexánom je porovnateľná s výťažnosťou do 20 % etanolu, respektíve do 60 % etanolu v závislosti na druhu riasy, a pohybovala sa v rozmedzí 1,2–2,9 %.

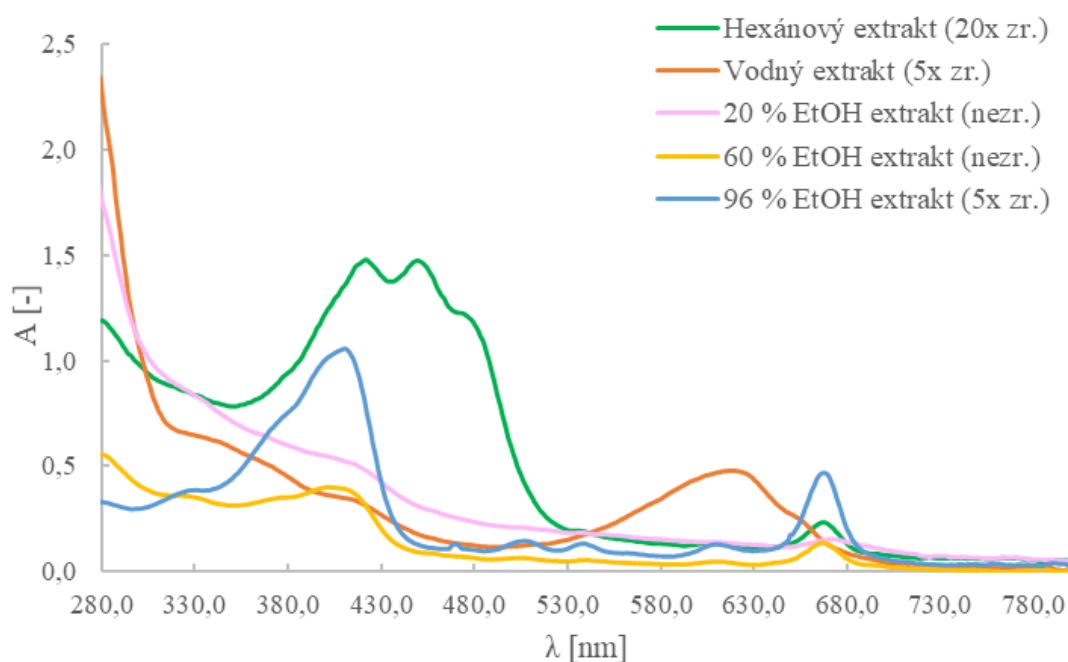
5.1.2 Meranie absorpčného spektra extraktov pomocou UV-VIS spektrofotometrie

Absorpčné spektrá extraktov v intervale vlnových dĺžok 280–800 nm (od oblasti UV-B žiarenia) boli získané meraním na nanofotometri podľa postupu uvedenom v bode 4.8.2. Absorpčné spektrá potrebné zriedených extraktov s rôznymi druhmi extrahovadiel sú znázornené v nasledujúcich grafov (viď Obrázok 13 až Obrázok 15).



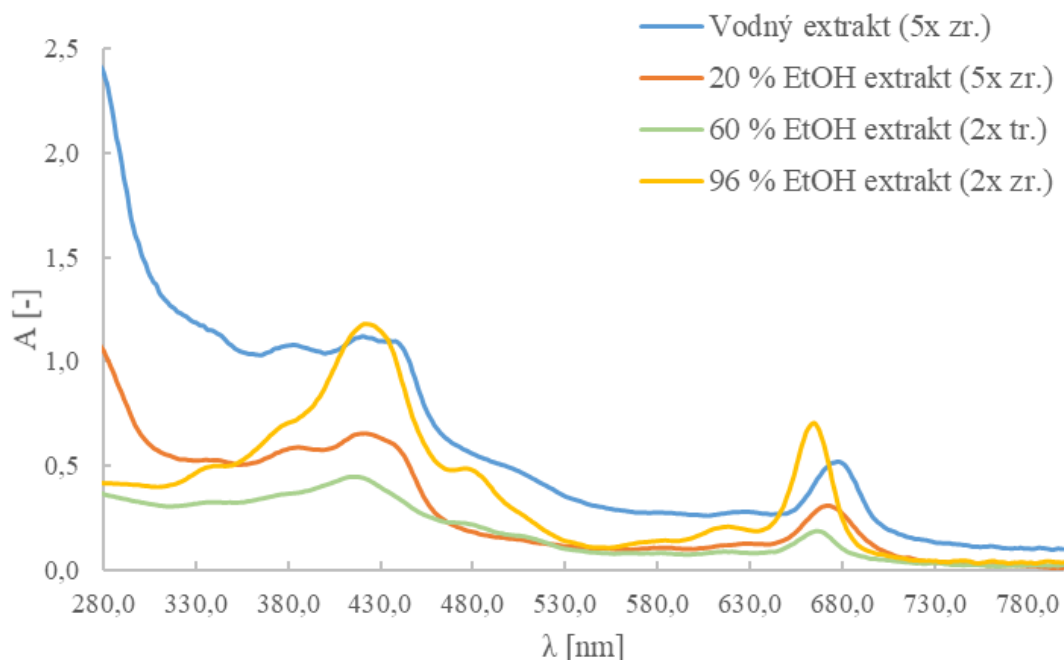
Obrázok 13: Absorpčné spektrá zriedených vodných extraktov

V grafe absorpčných spektier vodných extraktov rias (Obrázok 13) je možné pozorovať charakteristické píky sledovaných pigmentov prítomných v analyzovaných riasach a siniciach, respektíve rastlinách (chlorofyly a β -karotén, či ďalšie druhy karotenoidov). Spektrá jednotlivých rias sa odlišujú v intenzitách charakteristických píkov. Táto skutočnosť vypovedá o rozdielnom obsahu chlorofylov, respektíve celkových karotenoidov v závislosti na druhu extrahovanej riasy či sinice. Pri porovnaní výšky jednotlivých píkov extraktov možno konštatovať, že najvýraznejšie píky pre chlorofyly aj karotenoidy mali absorpčné spektrá 5x zriedených vodných extraktov riasy *Scenedesmus acutus* a sinice *Arthrospira maxima*, a teda možno povedať, že z daných dvoch rias bolo pomocou vody vyextrahovaných viac absorbujúcich látok než z ostatných analyzovaných rias či siníc.



Obrázok 14: Absorpčné spektrá extraktov sinice *Spirulina alga*

V grafe na Obrázku 14 je možné porovnať absorpčné spektrá *Spiruliny* v závislosti na druhu použitého extrakčného činidla. Na základe priebehu spektier možno tvrdiť, že celkovo najviac látok absorbujúcich vo viditeľnej časti spektra bolo zo sinice *Spirulina* bolo vyextrahovaných pomocou hexánu. Najvyššiu intenzitu absorpcie malo v oblasti UV-B absorpčné spektrum vodného extraktu *Spiruliny*. Na základe tohto pozorovania možno usúdiť, že na extrakciu látok absorbujúcich v UV-B oblasti bolo z použitých extrakčných činidiel najúčinnnejšie práve extrahovanie do destilovanej vody. Na absorpčnom spektre vodného extraktu *Spiruliny* je zároveň prítomný pík v oblasti 620 nm, pre zvyšné druhy extraktov tento pík už nie je prítomný. Zafarbenie vodného extraktu *Spiruliny* bolo tmavo modré, teda tento pík pri danej vlnovej dĺžke pravdepodobne zodpovedá skutočnosti, že by extrakt mal absorbovať v oranžovej oblasti spektra. Absorpcia žiarenia pri vlnovej dĺžke 620 nm mohla byť spôsobená fykobilínom, ktorý sa pravdepodobne vyextrahoval do destilovanej vody ako súčasť sinicového fykobiliproteínu (fykocyanínu). Pri extrakcii do rôznych koncentrácií etanolu a hexánu bola rozpustnosť fykobiliproteínov pravdepodobne výrazne nižšia než ich rozpustnosť vo vode, a preto ani na absorpčných spektrách týchto extraktov nie je prítomný žiadny výrazný pík v zodpovedajúcej oblasti. Výrazne najvyšší pík charakteristický pre karotenoidy, respektíve pre betakarotén, mal hexánový extrakt *Spiruliny*. Táto skutočnosť zodpovedá faktu, že β -karotén je lipofilné farbivo, a teda spomedzi použitých extrakčných činidiel je najviac rozpustné práve v hexáne. Absorpčné spektrum hexánu ale v porovnaní s absorpčným spektrom extraktu do 96 % etanolu obsahuje nižší pík pri vlnovej dĺžke 669 nm, ktorý je charakteristický pre chlorofyly, viď Obrázok 4. Menej výrazný pík indikuje nižšiu koncentráciu daného farbiva v extrakte.



Obrázok 15: Absorpčné spektrá extraktov sinice *Arthrospira maxima*

Graf na Obrázku 15 zobrazuje absorpčné spektrá rozličných extraktov sinice *Arthrospira maxima*. Z priebehu absorpčného spektra extraktu do 96 % etanolu možno na základe výšky a polohy píkov predpokladať, že do extraktu prešlo najmä veľké množstvo chlorofylu *a* (viď charakteristický tvar absorpčných spekier, Obrázok 4). Chlorofylu *b* a karotenoidov sa pri tejto extrakcii vyextrahovalo pravdepodobne len pomerne malé množstvo. Tento predpoklad bol následne aj potvrdený výpočtom koncentrácií jednotlivých pigmentov pre 96 % etanolvý extrakt, viď výsledky v nasledujúcej kapitole číslo 5.1.2.1. Vodný extrakt musel byť zriedený až päťkrát, aby sa hodnoty absorbancie v oblasti UV-B pohybovali pod hodnotou 2,5. To značí, že výťažnosť extrakcie látok absorbujúcich v tejto oblasti je veľmi vysoká, a aj celkový podiel všetkých vyextrahovaných látok, vrátane sledovaných pigmentov, je najvyšší práve vo vodnom extrakte *Arthrospiry maxima*.

5.1.2.1 Stanovenie obsahu karotenoidov a chlorofylov z absorpčných spektier

Koncentrácie karotenoidov a chlorofylov boli stanovené na základe hodnôt absorbancií pri vybraných vlnových dĺžkach získaných z premeraných absorpčných spektier. Výpočet koncentrácií jednotlivých druhov farbív bol vykonaný podľa Rovníc (2) až (4) uvedených v bode 4.8.2.1. Celková koncentrácia chlorofylov (suma chlorofylov) bola získaná ako súčet priemernej koncentrácie chlorofylu *a* a priemernej koncentrácie chlorofylu *b* pre daný extrakt. Takto získané koncentrácie boli vzťahnuté na gram suchej váhy riasy (na gram pôvodnej navážky riasy) a následne zhrnuté do stĺpcových diagramov, ktoré umožňujú porovnanie výšky obsahu jednotlivých typov pigmentov pre rôzne druhy extraktov, viď Obrázok 23 až Obrázok 26 v sekcii PRÍLOHY, podkapitola 9.1. Presné hodnoty koncentrácie jednotlivých farbív vzťahnutých na celkovú hmotnosť extrahovanej biomasy uvádza Tabuľka 6.

Tabuľka 6: Obsah karotenoidov a chlorofylov

		c [mg·g ⁻¹]			
Riasa/sinica/rastl.	Extrakt	Karotenoidy	Chlorofyl a	Chlorofyl b	Suma chlorofylov
<i>Arthrospira maxima</i>	vodný	0,448 ± 0,009	2,022 ± 0,017	2,115 ± 0,038	4,137 ± 0,051
	20 % EtOH	0,024 ± 0,001	0,577 ± 0,011	0,378 ± 0,009	0,955 ± 0,008
	60 % EtOH	0,042 ± 0,002	0,183 ± 0,005	0,131 ± 0,012	0,313 ± 0,017
	96 % EtOH	0,129 ± 0,008	1,529 ± 0,007	0,661 ± 0,024	2,189 ± 0,028
<i>Centella asiatica</i>	vodný	P.m.d.	0,128 ± 0,017	0,579 ± 0,021	0,707 ± 0,038
	20 % EtOH	0,014 ± 0,008	0,011 ± 0,010	P. m. d.	0,011 ± 0,010
	60 % EtOH	0,018 ± 0,002	0,044 ± 0,004	P. m. d.	0,044 ± 0,004
	96 % EtOH	P. m. d.	0,431 ± 0,002	0,158 ± 0,012	0,589 ± 0,013
	hexán	P. m. d.	0,102 ± 0,002	0,048 ± 0,002	0,150 ± 0,004
Česká chlorella	vodný	0,019 ± 0,002	0,276 ± 0,007	0,755 ± 0,007	1,030 ± 0,014
	20 % EtOH	0,015 ± 0,001	0,052 ± 0,001	0,088 ± 0,003	0,141 ± 0,008
	60 % EtOH	P. m. d.	0,547 ± 0,002	0,292 ± 0,005	0,839 ± 0,005
	96 % EtOH	0,015 ± 0,002	4,933 ± 0,061	1,620 ± 0,181	6,554 ± 0,241
<i>Chlamydomonas r.</i>	vodný	0,139 ± 0,007	0,389 ± 0,019	0,926 ± 0,015	1,315 ± 0,034
	20 % EtOH	0,046 ± 0,003	0,179 ± 0,006	0,370 ± 0,005	0,549 ± 0,010
	60 % EtOH	0,003 ± 0,000	0,344 ± 0,013	0,265 ± 0,023	0,609 ± 0,035
	96 % EtOH	P. m. d.	1,658 ± 0,018	1,049 ± 0,035	2,707 ± 0,050
<i>Scenedesmus acut.</i>	vodný	P. m. d.	3,391 ± 0,015	2,294 ± 0,004	5,685 ± 0,019
	20 % EtOH	P. m. d.	0,090 ± 0,003	0,216 ± 0,011	0,306 ± 0,011
	60 % EtOH	P. m. d.	1,368 ± 0,006	0,772 ± 0,002	2,140 ± 0,007
	96 % EtOH	P. m. d.	1,357 ± 0,006	0,918 ± 0,002	2,274 ± 0,008
<i>Chlorella sor.</i>	vodný	P. m. d.	0,574 ± 0,003	1,413 ± 0,020	1,987 ± 0,023
	20 % EtOH	0,022 ± 0,002	0,075 ± 0,000	0,124 ± 0,005	0,200 ± 0,005
	60 % EtOH	P. m. d.	0,291 ± 0,004	0,140 ± 0,010	0,431 ± 0,014
	96 % EtOH	0,175 ± 0,006	1,853 ± 0,009	0,436 ± 0,010	2,289 ± 0,003
<i>Spirulina alga</i>	vodný	P. m. d.	0,423 ± 0,010	3,137 ± 0,017	3,560 ± 0,027
	20 % EtOH	0,028 ± 0,002	0,130 ± 0,002	0,200 ± 0,007	0,330 ± 0,009
	60 % EtOH	0,014 ± 0,001	0,145 ± 0,002	0,046 ± 0,005	0,191 ± 0,004
	96 % EtOH	0,018 ± 0,001	2,588 ± 0,042	0,540 ± 0,034	3,128 ± 0,019
	hexán	0,374 ± 0,003	0,177 ± 0,005	0,140 ± 0,011	0,316 ± 0,016
<i>Chlorella vulgaris</i>	hexán	0,005 ± 0,000	0,131 ± 0,001	0,226 ± 0,001	0,357 ± 0,001

Pri porovnaní obsahu karotenoidov a chlorofylov pre vodné extrakty možno vo všeobecnosti konštatovať, že extrakcia destilovanou vodou prebehla účinnejšie pre chlorofyly než pre karotenoidy, keďže koncentrácie chlorofylu *a* aj *b* dosahovali často výrazne vyššie hodnoty než koncentrácie karotenoidov. Pre 4 zo 7 vodných extraktov (*Centella asiatica*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorella sorokiniana*, *Spirulina alga*) sa hodnoty absorpcie v nameraných spektrách pohybovali pri vlnovej dĺžke charakteristickej pre karotenoidy na príliš nízkych hodnotách, pod medzou detekcie metódy stanovenia, preto ani ich koncentrácie karotenoidov nemohli byť stanovené. Ako uvádza Tabuľka 6, označenie koncentrácie pigmentov týchto vzoriek je p.m.d., teda pod medzou detekcie. Naopak celkovo najvyšší obsah karotenoidov spomedzi všetkých druhov extraktov bol na základe zameraného absorpčného spektra stanovený pre riasu *Arthrospira maxima* pri extrakcii jej biomasy do destilovanej vody. Obsah karotenoidov bol pomerne nízky aj vo všetkých etanolových extraktoch. Jedinú relatívne vyššiu koncentráciu mal 96 % etanolový extrakt riasy *Chlorella sorokiniana*. Pre riasu *Scenedesmus acutus* neboli detegované karotenoidy ani v jednom pripravenom etanolovom extrakte. Extrakcia komerčných rias a siníc do hexánu bola pomerne efektívna z hľadiska extrakcie karotenoidov, hexánový extrakt *Spiruliny a.* dosahoval druhý najvyšší obsah karotenoidov spomedzi všetkých pripravených extraktov.

Naopak extrakcia chlorofylov rias do hexánu mala nízku výťažnosť, čo je možné pozorovať hlavne pre riasu *Chlorella vulgaris*. Na základe vypočítaných koncentrácií chlorofylov možno konštatovať, že na extrakciu chlorofylu *a* aj chlorofylu *b* bolo spomedzi troch použitých etanolových extrakčných činidiel najúčinnnejšia najvyššia koncentrácia etanolu, kde pri extrakcii komerčnej Českej chlorelly do 96 % etanolu bol dosiahnutý najvyšší výťažok chlorofylu *a* spomedzi všetkých druhov extraktov. Ďalej možno zo získaných výsledkov pozorovať, že so stúpajúcou koncentráciou etanolu ako extrahovadla rastie aj koncentrácia vyextrahovaného chlorofylu *a*, túto tendenciu vykazujú všetky extrahované riasy okrem *Arthrospiry m.* a *Scenedesma a.* Pri porovnaní obsahov chlorofylu *a* v extraktoch do destilovanej vody a do 96 % etanolu možno u 5 zo 7 extrahovaných vzoriek pozorovať, že pri extrakcii vodou je možné dosiahnuť vyšší obsah chlorofylu *b*, než pri extrakcii do 96 % etanolu. Od tohto trendu sa odlišujú len vzorky rias *Chlamydomonas reinhardtii* a Česká chlorella, kde bola výťažnosť extrakcie chlorofylu *b* vyššia pri použití 96 % etanolu. Naopak pri extrakcii do 96 % etanolu bol dosiahnutý u 5 zo 6 vzoriek vždy vyšší obsah chlorofylu *a* v porovnaní s extrakciou do destilovanej vody. Tento trend neplatil pre vzorku sinice *Arthrospira maxima* a riasy *Scenedesmus acutus*.

Tabuľka 7: Najvyššie detegované obsahy sledovaných pigmentov

	Riasa	Extrakt	c [mg·ml ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹]
Celkové karotenoidy	<i>Arthrospira m.</i>	voda	0,004 5 ± 0,000 1	0,447 6 ± 0,009 3
Chlorofyl <i>a</i>	Chlorella česká	96 % EtOH	0,049 3 ± 0,000 6	4,933 2 ± 0,060 9
Chlorofyl <i>b</i>	<i>Spirulina alga</i>	voda	0,031 4 ± 0,000 2	3,136 6 ± 0,020 5
Súčet chlorofylov <i>a</i> a <i>b</i>	Chlorella česká	96 % EtOH	0,065 5 ± 0,000 2	6,553 6 ± 0,241 4

Najvyšší obsah karotenoidov bol spomedzi všetkých typov extraktov detegovaný pre vodný extrakt sinice *Arthrospira maxima*. Najviac chlorofylu *a* obsahovala riasa Česká chlorella extrahovaná do 96 % etanolu, ktorá zároveň predstavovala aj vzorku s najvyšším obsahom celkového súčtu chlorofylov. Chlorofyl *b* mal najvyššie zastúpenie vo vodnom extrakte komerčnej sinice *Spirulina alga*. Koncentrácie týchto pigmentov v spomenutých extraktoch, ako aj obsah pigmentov prepočítaný na navážku riasy, ich presné hodnoty uvádza Tabuľka 7. Tieto 4 extrakty boli na základe vysokých

obsahov sledovaných látok vybrané na následnú prípravu želatínových vlákien s prímiesou extraktov z rias. Na prípravu vlákien bol taktiež použitý aj vodný extrakt riasy *Scenedesmus acutus*, pre jeho relatívne vysoké obsahy chlorofylu *a* aj *b*, ktoré dosiahli hodnoty $3,391 \pm 0,015 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a $2,294 \pm 0,004 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

5.1.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou TEAC

Antioxidačná aktivita extraktov bola stanovená podľa postupu uvedenom v kapitole 4.8.3. Výpočet bol vykonaný na základe lineárnej regresie kalibračnej závislosti, podľa vzťahu uvedenom v Rovnici (5). Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Výsledná koncentrácia antioxidantov v extraktov bola prepočítaná ako hmotnostný podiel antioxidantov v miligramoch na gram riasy. Obsah antioxidantov vo vzorkách je znázornený pomocou stĺpcových diagramov, viď Obrázok 27 a Obrázok 28 v sekcii PRÍLOHY, podkapitola 9.2. Presné hodnoty koncentrácií zobrazuje Tabuľka 8.

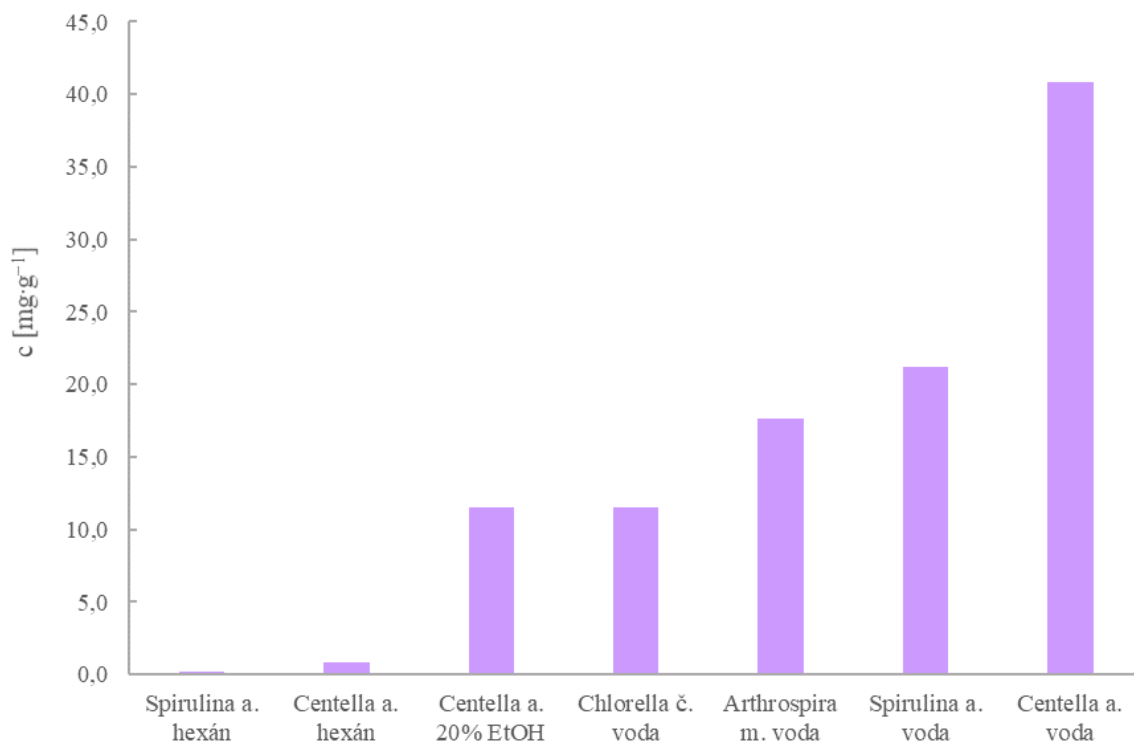
Tabuľka 8: Hodnoty koncentrácia antioxidačných látok vyjadrené vo forme antioxidačnej aktivity

Riasa a typ extraktu	c [mg·g ⁻¹]				
	vodný	20 % EtOH	60 % EtOH	96 % EtOH	hexán
<i>Arthrospira maxima</i>	61,818 ± 1,068	3,127 ± 0,012	0,303 ± 0,019	1,806 ± 0,068	-
<i>Centella asiatica</i>	26,508 ± 1,334	6,940 ± 0,054	2,310 ± 0,023	1,180 ± 0,029	0,105 ± 0,001
Česká chlorella	9,184 ± 0,447	1,165 ± 0,012	0,761 ± 0,073	1,028 ± 0,027	-
<i>Chlamydomonas r.</i>	4,971 ± 0,064	0,804 ± 0,012	0,394 ± 0,012	1,264 ± 0,029	-
<i>Scenedesmus acutus</i>	1,211 ± 0,055	0,646 ± 0,023	0,231 ± 0,016	1,178 ± 0,025	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	2,569 ± 0,249	0,733 ± 0,023	0,231 ± 0,016	1,056 ± 0,025	-
<i>Spirulina alga</i>	18,469 ± 0,550	0,204 ± 0,012	0,191 ± 0,020	0,588 ± 0,050	0,695 ± 0,011
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	0,202 ± 0,002

Na základe stanovených koncentrácií možno pozorovať trend, že vodné extrakty vo všeobecnosti dosahovali spomedzi všetkých pripravených druhov extraktov najvyššie obsahy antioxidantov. Naopak pre extrakty do 60 % etanolu boli stanovené v priemere najnižšie koncentrácie extrahovaných látok s antioxidačným účinkom. Jediná vzorka, kde tento trend nebol pozorovaný, bola rastlina *Centella asiatica*, pre ktorú bol stanovený najnižší obsah antioxidantov v extrakte do hexánu. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že celkovo najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje vodný extrakt sinice *Arthrospira maxima*. Naopak celkovo najmenší obsah antioxidantov bol nameraný pre hexánový extrakt rastliny *Centella asiatica*.

5.1.4 Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky

Celková koncentrácia polyfenolov v hexánových, vodných aj 20 %, 60 % a 96 % etanolových extraktoch bola stanovená spektrofotometricky podľa postupu uvedenom v kapitole 4.8.4 a vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti uvedenej v Rovnici (7). Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Výsledná koncentrácia v extraktoch bola prepočítaná na miligramy polyfenolov na gram biomasy. Obsah polyfenolov vo vzorkách je znázornený stĺpcovým diagramom na Obrázku 16 a presné hodnoty koncentrácií uvádza Tabuľka 14 v sekcii PRÍLOHY, podkapitola 9.3.



Obrázok 16: Obsah polyfenolov v extraktoch

Pre všetky 60 % a 96 % etanolové extrakty dosahovala absorbančia hodnoty 0,1 alebo nižšie, a teda obsah polyfenolov v týchto extraktoch bol pod medzou detekcie použitej metódy stanovenia. V extraktoch do 20 % etanolu bol jedinou detekovanou vzorkou s obsahom polyfenolov extrakt z rastliny *Centella asiatica*, ostatné extrakty boli taktiež pod hranicou detekcie. Vo všeobecnosti najvyššie hodnoty obsahu polyfenolov dosahovali vodné extrakty, u ktorých boli polyfenoly detekované v 4 zo 7 vzoriek, konkrétne v extrakte z riasy Česká chlorella, u siníc *Arthrospira maxima* a *Spirulina alga*, a taktiež v extrakte z biomasy rastliny *Centella asiatica*. Najvyšší obsah polyfenolov bol zaznamenaný pre vzorku rastliny *Centella asiatica*, ktorý dosahoval $40,817 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Z testovaných kmeňov rias mala najvyšší obsah celkových polyfenolov vzorka komerčnej sinice *Spirulina alga*, kde bola ich koncentrácia stanovená na $21,213 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Pri hexánových extraktoch z komerčných rias bol stanovený obsah polyfenolov v 2 z 3 extraktov, konkrétne pre sinicu *Spirulina alga* a rastlinu *Centella asiatica*, pre extrakt z riasy *Chlorella vulgaris* sa hodnota absorbancie pripraveného roztoku pohybovala pod hranicou detekcie metódy, preto obsah polyfenolov v tejto vzorke nebol stanovený. Pre fenolické látky prítomné v rastline *Centella asiatica* možno zo zistených výsledkov konštatovať, že ich rozpustnosť vo vode je vyššia ako rozpustnosť v etanole, keďže najvyšší podiel extrahovaných polyfenolov bol detegovaný práve vo vodnom extrakte tejto rastliny, pričom následne v extrakte do 20 % etanolu bol obsah polyfenolov už štvornásobne nižší, a v extraktoch do vyššie koncentrovaného etanolu už polyfenoly neboli detegované, absorbančia vzoriek extraktov do 60 % a 96 % etanolu dosahovala hodnoty pod hranicou detekcie použitej metódy. Na základe výsledkov stanovenia celkového obsahu polyfenolov boli na ďalšiu výrobu nanovlakien vybrané vodné extrakty rastliny *Centella asiatica* a sinice *Spirulina alga*.

5.1.5 Stanovenie celkového obsahu proteínov

Celková koncentrácia proteínov vo vzorkách vodných extraktov bola zistená na základe kolorimetrickej metódy Hartree-Lowryho podľa postupu uvedenom v kapitole 4.8.5. Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol stanovený priemer. Na výpočet koncentrácie celkových bielkovín bola použitá kalibračná závislosť uvedená v Rovnici (9). Takto stanovené koncentrácie proteínov boli následne vynásobené objemom celého extraktu a vzťahnuté na pôvodnú navážku riasy na získanie hmotnostného podielu proteínov v celkovej biomase riasy. Zastúpenie proteínov vo vzorkách v koncentrácii miligramov na gram uvádza Tabuľka 9.

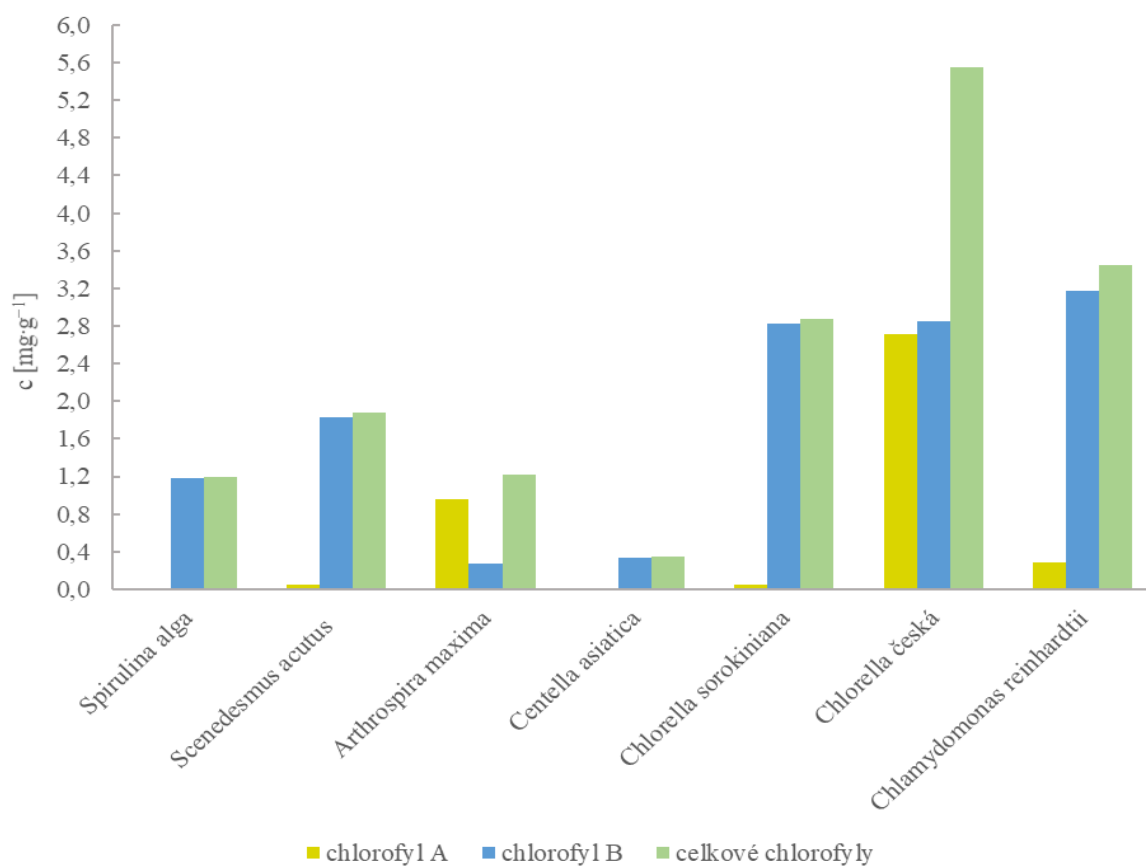
Tabuľka 9: Obsah celkových proteínov vo vodných extraktoch

Riasa/sinica/rastlina	c [mg·g ⁻¹]
<i>Centella asiatica</i>	316,504 ± 3,390
<i>Arthrospira maxima</i>	337,134 ± 4,309
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	444,083 ± 2,049
<i>Spirulina alga</i>	453,855 ± 14,042
<i>Chlorella sorokiniana</i>	479,913 ± 8,476
<i>Scenedesmus acutus</i>	572,747 ± 16,971
Česká chlorella	574,376 ± 3,083

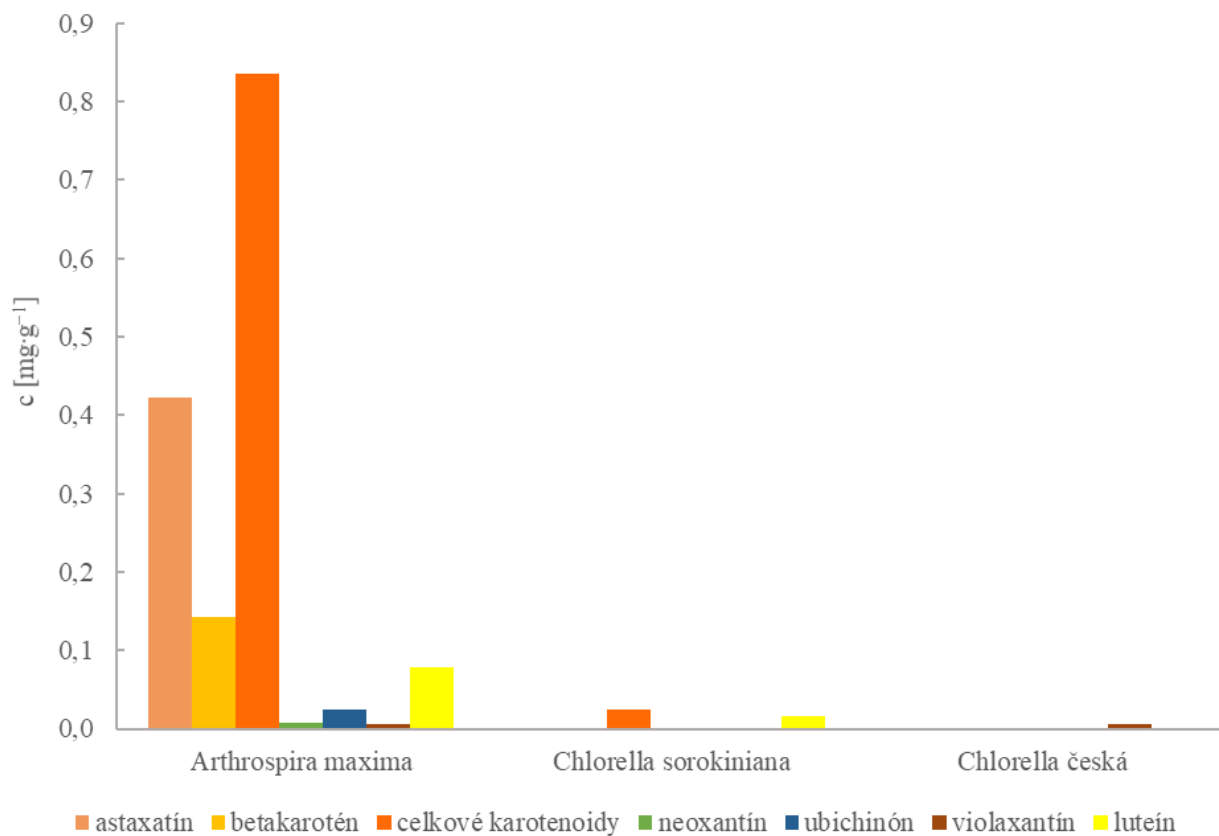
Z nameraných výsledkov vyplýva, že všetky testované vzorky obsahujú pomerne vysoký obsah proteínov v svojom pevnom podiele biomasy, pre riasy *Scenedesmus acutus* a Česká chlorella predstavoval obsah proteínov viac než 50 % celkovej hmotnosti navážky biomasy. Najnižší obsah celkových proteínov bol stanovený pre vzorku práškovej vysušenej biomasy rastliny *Centella asiatica*. Najviac bielkovín bolo detegovaných vo vzorke komerčnej riasy Českej chlorelly, kde obsah dosiahol hodnotu 574,376 mg·g⁻¹. Dosiahnuté výsledky sa zhodujú z poznatkami, že riasy rodu *Chlorella* môžu obsahovať v sušine v priemere až 51–58 hm. % bielkovín [7].

5.1.6 Stanovenie karotenoidov a chlorofylov pomocou HPLC

Obsah karotenoidov a chlorofylov bol stanovený podľa postupu uvedenom v kapitole 4.8.6 u mikrorias *Scenedesmus acutus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, Česká chlorella, u sinice *Arthrospira maxima* a komerčnej sinice *Spirulina alga*, a taktiež komerčnej biomasy rastliny *Centella asiatica*, extrahovaných do 96 % etanolu. Zastúpenie pigmentov vo vzorkách je znázornené pomocou stĺpcových diagramov vyjadrujúcich obsah jednotlivých farbív aj celkových skupín pigmentov v mg·g⁻¹. Obrázok 17 zobrazuje obsah chlorofylov vo všetkých analyzovaných vzorkách závislosti na druhu mikroriasy či sinice. Stĺpcový diagram na Obrázku 18Obrázok 18 vyjadruje zastúpenia karotenoidov len pre vzorky, v ktorých boli nejaké karotenoidné farbivá detegované.



Obrázok 17: Zastúpenie chlorofylov pre rôzne druhy rias a siníc a pre porovnávaciú rastlinu *Centella asiatica*

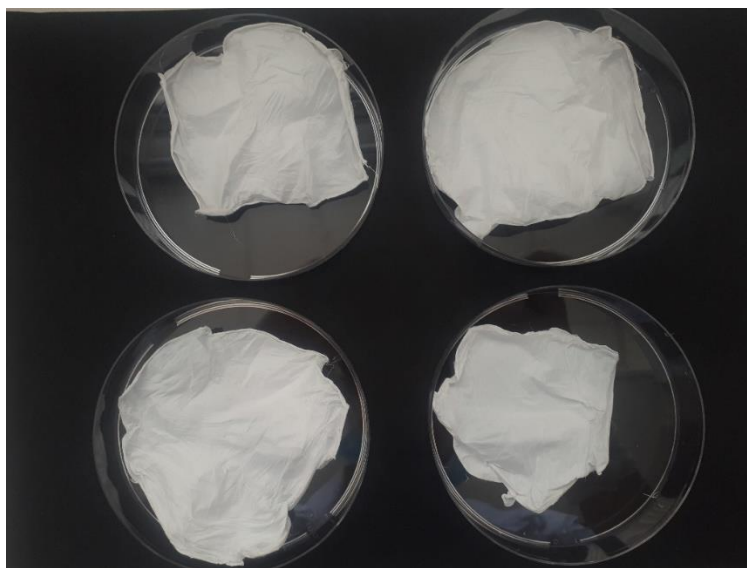


Obrázok 18: Zastúpenie detegovaných karotenoidov pre rôzne druhy rias a siníc

Z grafu na Obrázku 17 vyplýva, že komerčná *Chlorella česká* v porovnaní s ostatnými testovanými druhmi vykazuje najvyššie hodnoty zelených pigmentov chlorofylov. Hodnota obsahu celkových chlorofylov pre túto riasu bola pomocou kvantitatívnej chromatografickej analýzy stanovená na $5,556 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Toto najvyššie zastúpenie celkových chlorofylov spomedzi všetkých testovaných vzoriek extraktov bolo pre *Ch. českú* extrahovanú do 96 % etanolu stanovené aj pri výpočte koncentrácie chlorofylov z absorpčných spektier podľa postupu popísaného v bode 4.8.2.1, a ktorého výsledky sú uvedené v bode 5.1.2.1. Koncentrácia celkových chlorofylov stanovená na základe analýzy vzorky metódou HPLC dosahuje však o 15,23 % nižšiu hodnotu, než bol obsah celkových chlorofylov určený na základe zmeraného absorpčného spektra extraktu. Tento rozdiel možno pripisovať všeobecnej vyššej presnosti kvantitatívnej chromatografickej analýzy v porovnaní s UV-VIS spektrofotometrickou kvantitatívnou analýzou. Ďalším možným dôvodom je, že vzťah na výpočet koncentrácie chlorofylov z absorpčných spektier prebraný od Hartmuta K. Lichtenthalera, uvedený v bode 4.8.2.1, nemusí byť pre podmienky našej analýzy (použitý typ nanofotometra, druh rozpúšťadla), dostatočne vhodný, z čoho následne môžu vyplývať nepresné hodnoty dopočítaných koncentrácií. Analýzy na HPLC boli zároveň merané neskôr než samotné spektrá, čo mohlo mať tiež vplyv na vzorky, v ktorých pri dlhšom skladovaní teoreticky mohlo dôjsť k čiastočnej degradácii analyzovaných látok, a tým aj k zníženiu ich koncentrácie. Karotenoidy boli detekované len pre 3 zo 7 vzoriek. Najvyšší obsah celkových karotenoidov bol stanovený pre sinicu *Arthrospira maxima* extrahovanú do 96 % etanolu. Najznámejší karotenoid, ktorým je betakarotén, bol najviac zastúpený práve v biomase tejto sinice, v iných vzorkách nebol použitou metódou detegovaný. Obsah detekovaných karotenoidov bol v porovnaní s obsahom celkových chlorofylov nižší, najvýraznejší rozdiel v zastúpení týchto skupín pigmentov je možné pozorovať pri riase *Chlorella česká*.

5.2 Príprava a charakterizácia vlákien

V rámci experimentálnej časti práce boli ďalej pripravené želatínové vlákna technikou elektrospinningu pre enkapsuláciu pripravených extraktov. Postup pre prípravu roztokov želatíny v kyseline octovej na zvláknenie je uvedený v bode 4.9.1 a postup elektrostatického zvlákňovania je popísaný v kapitole 4.9.2. Boli pripravené čisté želatínové vlákna a 18 typov želatínových vlákien s prímiesou, ktoré sa líšili typom a obsahom inkorporovaných extraktov. Všetky pripravené vlákna boli skladované v Petriho miskách pri laboratórnej teplote. Pre vytvorené vlákna bol stanovený hmotnostný podiel inkorporovaných látok pochádzajúcich z rias, respektíve siníc. U vlákien bola sledovaná ich antioxidačná aktivita, rýchlosť rozpúšťania na pokožke a ich cytotoxicita.



Obrázok 19: Pripravené vlákna, naľavo čisté želatínové, napravo s prímiesou vodného extraktu

5.2.1 Príprava roztokov želatíny na zvláknenie

Na zhotovenie vlákien technikou elektrospinningu boli pripravené roztoky želatíny s prímiesami rôznych druhov extraktov rias a siníc, prípadne extraktov porovnávacej rastliny *C. asiatica*. Ako prímiesi boli vybrané extrakty s najvyššími hodnotami antioxidačnej aktivity, prípadne extrakty najbohatšie na karotenoidy a chlorofyly alebo polyfenoly a proteíny, pričom tieto koncentrácie látok boli určené na základe predošlej analýzy, ktorej výsledky sú popísané v kapitolách 5.1.2 až 5.1.5. Prehľad a vlastnosti extraktov vybraných ako prímies do 30 % roztoku želatíny za účelom vytvorenia zvlákňovacieho roztoku uvádza Tabuľka 10.

Tabuľka 10: Zoznam extraktov vybraných ako prímiesi do pripravovaných želatínových vlákien

Riasa/sinica/rastlina	Extrakt	Maximálna hodnota obsahu	c [mg·g ⁻¹]
<i>Arthrospira maxima</i>	vodný	Látky s antioxidačným účinkom	61,818 ± 1,068
<i>Arthrospira maxima</i>	vodný	Karotenoidy	0,448 ± 0,009
Chlorella česká	96 % EtOH	Chlorofyl <i>a</i>	4,933 ± 0,061
<i>Spirulina alga</i>	vodný	Chlorofyl <i>b</i>	3,137 ± 0,017
Chlorella česká	96 % EtOH	Celkové chlorofyly	6,554 ± 0,241
<i>Centella asiatica</i>	vodný	Polyfenoly	40,817 ± 0,380
Chlorella česká	vodný	Proteíny	574,376 ± 3,083

Okrem vodného extraktu sinice *A. maxima* vykazovali aj relatívne vysoký obsah látok s antioxidačnými účinkami všetky ostatné použité vodné extrakty, najvýraznejšie však extrakty z rastliny *Centella asiatica* a komerčnej sinice *Spirulina alga*, presné koncentrácie uvádza Tabuľka 8 v bode 5.1.3. Ako šiesty vybraný extrakt na inkorporáciu do organických želatínových vlákien bol zvolený vodný extrakt riasy *Scenedesmus acutus*, pretože na základe analýzy absorpčného spektra tohto extraktu bolo stanovené, že dosahoval pomerne vysoké koncentrácie chlorofylov *a* aj *b*, viď koncentrácie daných pigmentov (Tabuľka 6), a zároveň obsahoval aj vysoký obsah celkových proteínov, hodnota dosahovala 572,747 ± 16,971 mg·g⁻¹ a bola určená metódou podľa Hartree-Lowryho, ako je uvedené v kapitole 5.1.5.

5.2.2 Zloženie vlákien

Pre všetky pripravené vlákna bola vypočítaný hmotnostný podiel prímiesi inkorporovaných látok rias, resp. siníc v celkovej hmotnosti vlákna v závislosti na pôvodnej koncentrácii prídavku rozličných objemov extraktu do roztoku na zvláknenie. Najskôr bolo zo známej hodnoty celkového pevného podielu v extrakte vypočítaný pevný podiel v použitých prídavkoch extraktov do roztoku želatíny, teda v objemoch extraktov 150, 600 a 1200 µl. Extrakt každej riasy mal pevný podiel rozličnej hodnoty, preto sa koncentrácie rovnakých objemov od seba odlišovali. Následne bol určený celkový pevný podiel v pripravenom objeme roztoku želatíny s prímiesou na zvláknenie. Táto hodnota hmotnosti bola považovaná za hmotnosť vlákna, ktoré by sa vytvorilo, ak by sa zvláknil celý objem pripraveného roztoku, keďže v procese tvorby vlákna sa rozpúšťadlá (kyselina octová a extrahovadlo) odparujú, a na kolektor už dopadá len pevné vlákno. Hmotnostné percento riasy vo vlákne bolo vypočítané ako podiel dvoch hodnôt, kde hmotnosť pevnej časti v pridanom objeme extraktu rias bola podelená hodnotou celkovej pevnej hmoty v celom objeme pripraveného roztoku (rozpustená želatína spolu s vyextrahovanými látkami rias), následne bol tento podiel vynásobený kráť sto. Týmto spôsobom získané hodnoty hmotných podielov sú prehľadne uvedené pre každý druh použitého extraktu v Tabuľke 11.

Tabuľka 11: Zloženie pripravených vlákien z hľadiska hmotnostného podielu extraktu z riasy vo vlákne

Typ extraktu vo vlákne	Pôvodne pridaný objem extraktu do roztoku na zvláknenie [μl]		
	150	600	1 200
	Podiel látok riasy/sinice vo vlákne [hm. %]		
Vodný e. <i>A. maxima</i>	0,065	0,259	0,517
Vodný e. <i>Spirulina alga</i>	0,040	0,161	0,322
Vodný e. <i>Centella asiatica</i>	0,035	0,138	0,277
Vodný e. Chlorella česká	0,023	0,091	0,181
Vodný e. <i>S. acutus</i> ,	0,017	0,067	0,133
96 % EtOH e. Chlorella česká	0,007	0,029	0,059

Najvyšší obsah enkapsulovaných látok v zvláknenom materiáli bol dopočítaný pre vzorku vlákna, ktoré bolo pripravené z roztoku želatíny s prídavkom vodného extraktu sinice *Arthrospira maxima* o objeme 1 200 μl. Naopak najnižší hmotnostný podiel extrahovaných látok rias vo vlákne bol stanovený pre vlákna vyrobené z roztoku želatíny s prímiesou 96 % etanolového extraktu riasy Česká chlorella.

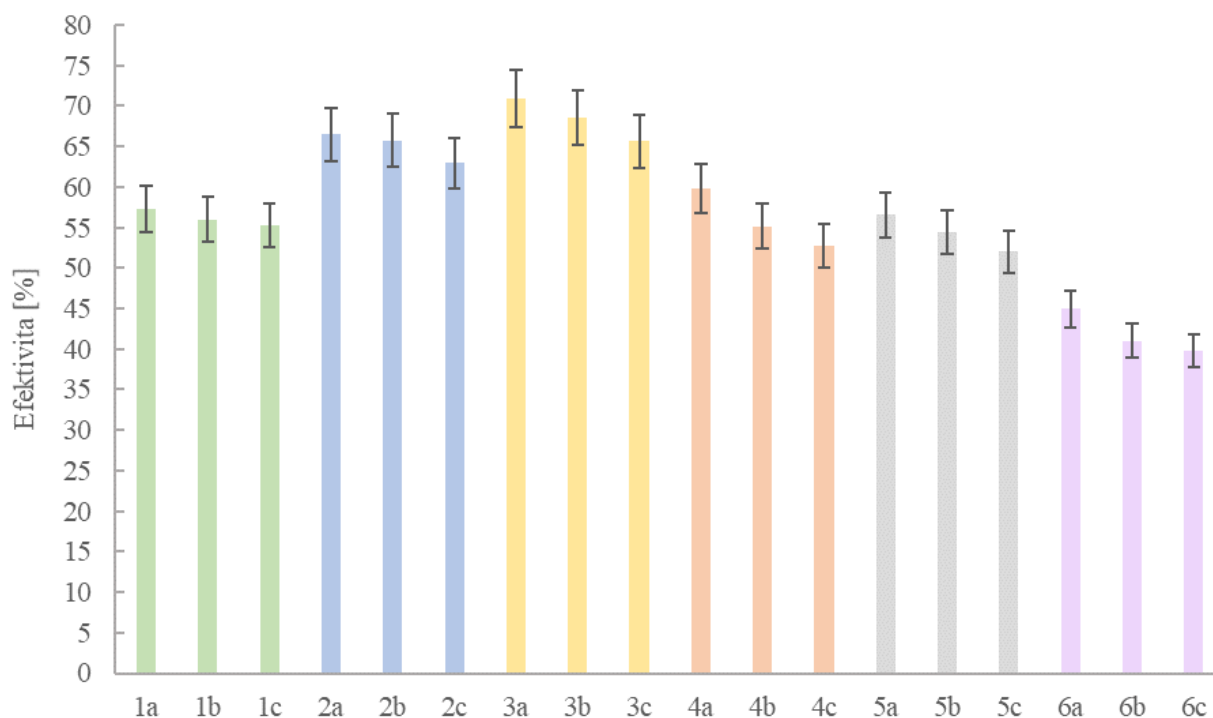


Obrázok 20: Kontrola pH rozpustených želatínových vlákien

Pre overenie úplného odparenia kyseliny octovej ako rozpúšťadla želatíny v procese zvlákňovania prebehla aj kontrola pH vytvorených vlákien. Z vlákien boli vystrihnuté štvorcové kúsky o ploche 1 cm², následne boli zvážené a rozpustené v 1 ml destilovanej vody v označených eppendorf skúmavkách. Po úplnom rozpustení vlákna a dôkladnom pretrepaní skúmavky bolo pomocou univerzálnych indikátorových papierikov testované pH každého vzorku nakvapkaním malého množstva rozpusteného vlákna vo vode na papierik. Všetky vzorky vykazovali podľa stupnice uvedenej na obale neutrálne pH. Z výsledkov tohto testu je možné preto konštatovať, že pri zvlákňovaní roztoku došlo pred dopadom pevných vlákien na kolektor k dostatočnému odpareniu kyseliny octovej a vo vláknach sa nenachádza také množstvo kyseliny, ktoré by mohlo ovplyvniť ich hodnotu pH.

5.2.3 Efektivita zvlákňovania

Na základe známeho zvlákného objemu roztoku, zaznamenaného z dávkovacej pumpy zvlákňovacej sústavy a z hodnoty hmotnostného zlomku želatíny a riasy pre danú vzorku bol následne dopočítaný celkový spoločný pevný podiel želatíny aj riasy v takomto množstve roztoku. Takto získaná teoretická hmotnosť vlákna bola následne porovnaná s reálnou hmotnosťou celej zvláknenej vzorky. Pre výpočet efektivity zvlákňovania v percentách boli tieto dve hodnoty podelené a vynásobené sto. Hodnoty pre jednotlivé druhy vlákien znázorňuje stĺpcový diagram na Obrázku 21. Označenie vzoriek 1a až 6c je totožné s poradím označenia vzoriek ako uvádza Tabuľka 5 uvedenej v kapitole 4.9.1.



Obrázok 21: Efektivita zvlákňovania

Z hodnôt v stĺpcovom diagrame (Obrázok 21) možno pozorovať, že pre vlákna vytvorené z roztokov s obsahom vodných extraktov rias (vzorky 1a až 5c) sa efektivita zvlákňovacieho procesu pohybovala nad 50 %. Pre vlákna pripravené z roztoku obsahujúceho etanolový extrakt riasy *Chlorella* česká (vzorky 6a až 6c) bola efektivita zvlákňovania mierne nižšia, približne v rozmedzí 45–39 %. Najnižšiu efektivitu zvláknenia dosiahol roztok s najvyšším obsahom etanolového extraktu, hodnota bola 39,78 %. Už počas procesu elektrostatického zvlákňovania bolo pozorovateľné, že pre roztoky želatíny s obsahom etanolových extraktov zvlákňovanie prebieha odlišne, ako pri roztokoch s obsahom vodných extraktov. Materiál dopadajúci na kolektor elektrospinningovej sústavy nebol na všetkých miestach kompletne vysušený, v niektorých oblastiach vlákno vyzeralo tak, že v ňom ostala vlhká časť neodpareného rozpúšťadla. Pri odoberaní takto pripravených vlákien z kolektoru bolo ťažšie oddeliť ich z hliníkovej fólie, než vlákna vytvorené z roztokov s vodnou prímесou. Takéto vlákna boli pri oddeľovaní od kolektoru náchyľnejšie na roztrhanie. Keďže tento odlišný priebeh zvlákňovacieho procesu a nižšiu kvalitu výsledného pripraveného vlákna materiálu vykazovali len roztoky s prímесou etanolového extraktu, môžeme predpokladať, že prídavok etanolu spôsobil zmenu v priebehu procesu zvlákňovania roztoku ovplyvnením celkovej viskozity alebo vodivosti zvlákňovaného roztoku. Pre dosiahnutie lepších výsledkov by bolo vhodné celý proces zvlákňovania takýchto vzoriek ďalej optimalizovať.

5.2.4 Antioxidačná aktivita vlákien

Antioxidačná aktivita pripravených vlákien bola testovaná metódou TEAC podľa postupu uvedenom v kapitole 4.9.3. Antioxidačné účinky jednotlivých druhov vlákien boli skúmané z hľadiska stability antioxidantov inkorporovaných do vlákien v priebehu doby skladovania. Preto boli vykonané tri opakovania merania metódou TEAC v intervale 4 dní, na základe ktorých boli stanovené hodnoty pre každé meranie, ktoré sú uvedené v Tabuľke 12 Tabuľka 12. Výsledky stanovenia priemerného antioxidačného účinku vlákien sú určené v mikrogramoch látok s antioxidačným pôsobením na miligram vlákna. Označenie vzoriek vlákien (1a až 6c) **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** v Tabuľke 12 Tabuľka 12 zodpovedá poradiu označenia druhov vlákien ako uvádza Tabuľka 5 v kapitole 4.9.1.

Tabuľka 12: Antioxidačné aktivity vlákien z troch meraní v rozostupoch 4 dni

	1. meranie (deň 0)	2. meranie (deň 4)	3. meranie (deň 8)
Vzorka	c [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]		
1a	10,914 $\pm$ 0,324	10,613 $\pm$ 0,169	10,528 $\pm$ 0,319
1b	21,635 $\pm$ 0,241	21,412 $\pm$ 0,300	21,655 $\pm$ 0,405
1c	36,243 $\pm$ 0,312	36,278 $\pm$ 1,118	35,161 $\pm$ 1,542
2a	7,026 $\pm$ 0,388	6,967 $\pm$ 0,041	6,773 $\pm$ 0,135
2b	13,195 $\pm$ 0,767	13,410 $\pm$ 0,463	13,092 $\pm$ 0,166
2c	16,302 $\pm$ 0,929	16,192 $\pm$ 0,095	16,408 $\pm$ 0,540
3a	7,945 $\pm$ 0,125	7,805 $\pm$ 0,245	7,929 $\pm$ 0,120
3b	14,373 $\pm$ 0,180	14,335 $\pm$ 0,414	14,405 $\pm$ 0,675
3c	18,698 $\pm$ 0,540	18,682 $\pm$ 0,112	18,889 $\pm$ 0,270
4a	4,997 $\pm$ 0,128	5,077 $\pm$ 0,241	4,991 $\pm$ 0,043
4b	9,667 $\pm$ 0,720	9,627 $\pm$ 0,123	9,320 $\pm$ 0,311
4c	11,402 $\pm$ 0,425	11,448 $\pm$ 0,001	11,376 $\pm$ 0,438
5a	1,081 $\pm$ 0,090	1,054 $\pm$ 0,051	1,134 $\pm$ 0,016
5b	2,985 $\pm$ 0,058	2,957 $\pm$ 0,135	2,820 $\pm$ 0,210
5c	5,480 $\pm$ 0,020	5,480 $\pm$ 0,223	5,550 $\pm$ 0,245
6a	0,881 $\pm$ 0,001	0,858 $\pm$ 0,057	0,790 $\pm$ 0,039
6b	1,538 $\pm$ 0,017	1,542 $\pm$ 0,068	1,526 $\pm$ 0,001
6c	3,758 $\pm$ 0,082	3,816 $\pm$ 0,001	3,710 $\pm$ 0,150

Každé dve vzorky daného druhu vlákna vystrihnuté z rôznych oblastí pripraveného vláknitého materiálu vykazovali pri všetkých troch opakovaniach merania veľmi blízke hodnoty antioxidačnej aktivity, ktoré sa vzájomne takmer nelíšili, maximálny rozdiel dosiahol 11 %. Z tohto pozorovania možno vyvodíť, že látky s antioxidačným účinkom pochádzajúce z extraktov rias a siníc boli vo vláknach rozložené relatívne rovnomerne a nehromadili sa len v určitých oblastiach. Z týchto dvoch hodnôt boli pre dané druhy vlákien určené priemerné hodnoty antioxidačného účinku, a to pri všetkých troch opakovaniach stanovenia antioxidačnej aktivity. Z hľadiska stability antioxidantov

prítomných vo vláknach vzhľadom na dobu skladovania je možné konštatovať, že vo vláknach počas testovanej doby (8 dní) nedochádzalo k výraznému zníženiu hodnoty antioxidačného účinku vlákien, ako možno vidieť pri porovnaní hodnôt z prvého až tretieho merania uvedených v Tabuľke 12. Na základe týchto výsledkov možno predpokladať, že vo vláknach pravdepodobne nenastala významná degradácia prítomných látok s antioxidačným účinkom. Celkovo obsah stanovených antioxidantov vo vláknach bol vypočítaný na $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ použitého vlákna. Najvyššie množstvo antioxidantov bolo stanovené vo vláknach s vodným extraktom sinice *Arthrospira maxima* (vzorka 1c). Naopak najnižší obsah antioxidantov vykazovalo vlákno s najmenším prídavkom etanolové extraktu riasy *Chlorella česká*. Tieto zistenia korešpondujú aj s dátami nameranými pre samotné extrakty, kde najvyššiu antioxidačnú aktivitu mala práve vzorka vodného extraktu *A. maxima* a najmenší antioxidačný účinok bol zaznamenaný pre 96 % etanolový extrakt z Českej chlorelly, viď výsledky v kapitole 5.1.3.

5.2.5 Rýchlosť rozpúšťania vlákien

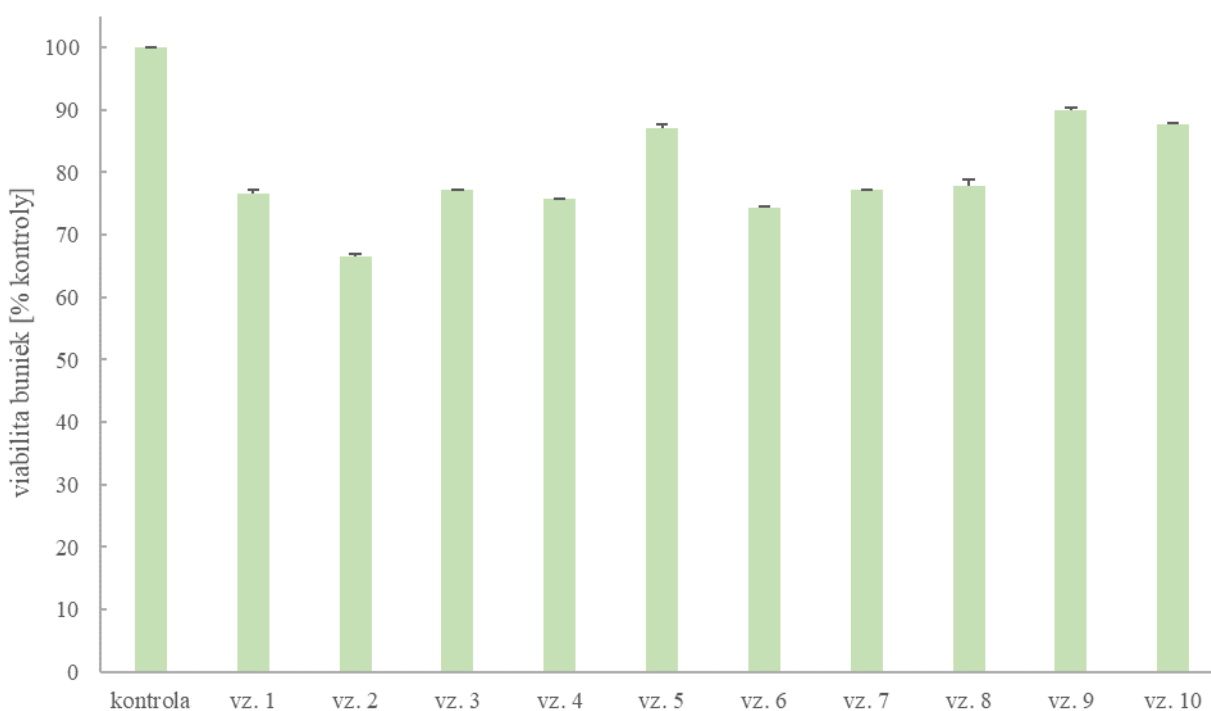
Vzorky vlákien boli hodnotené z hľadiska rýchlosti ich rozpúšťania, pokus bol prevedený podľa postupu opísanom v kapitole 4.9.5. Na vodou navlhčenej pokožke ruky sa všetky želatínové vlákna rozpustili podľa očakávania okamžite po kontakte s vlhkou pokožkou, keďže želatína je rozpustná vo vode. Na prirodzene suchej pokožke trvalo rozpúšťanie vlákien o ploche 1 cm^2 podstatne dlhšie, a líšilo sa v závislosti na hrúbke vlákna. V priemere sa vlákno o ploche 1 cm^2 a hmotnosti 1 mg rozpustilo na suchej pokožke za 1,5 minúty. Čím hrubšia bola vzorka vlákna o ploche 1 cm^2 , tým k pomalšiemu rozpúšťaniu na pokožke dochádzalo. Rýchlosť rozpúšťania pravdepodobne ovplyvnil aj aktuálny stav hydrolipidického filmu na povrchu pokožky. Keď bola pokožka výraznejšie spotená a mastnejšia, dochádzalo k rýchlejšiemu rozpúšťaniu vlákien. Pre prípadné budúce použitie želatínových vlákien ako plet'ovej masky s obsahom pridaných látok, by na základe tohto testu bolo vhodné aplikovať vlákennú masku na plet', ktorá je mierne navlhčená vodou alebo plet'ovou vodou, aby sa uľahčila aplikácia takejto masky a urýchlilo jej celkové rozpustenie na pokožke.

5.3 Testy cytotoxicity vlákien

Na MTT test cytotoxicity boli použité vzorky zvlákneneho materiálu o ploche 1 cm^2 . Pretože jednotlivé vlákenné textilie ale nemali navzájom rovnaké hrúbky, každá vzorka bola aj odvážená a pre úplnosť sú v Tabuľke 13 uvedené hmotnosti jednotlivých vzoriek, spolu s číselným označením typu vzorky v závislosti na druhu a obsahu prímеси vo vlákne. Všetky vzorky boli testované dvakrát. Výsledný cytotoxický účinok vlákien na línii buniek HaCaT je v stĺpcovom diagrame na Obrázku 22 zobrazený ako viabilita buniek v percentách vzhľadom na stopercentný nárast buniek (v kontrolnej jamke doštičky), získaná ako priemerná hodnota z oboch meraní.

Tabuľka 13: Plocha, hmotnosť a typ vzoriek vlákien použitých na testovanie cytotoxicity

Vzorka	Typ extraktu vo vlákne	Podiel riasy/sinice vo vlákne [hm. %]	Plocha [cm ²]	Hmotnosť [mg]
1	<i>Arthrospira m.</i> vodný	0,259	1	2,15
2	<i>Arthrospira m.</i> vodný	0,517	1	3,00
3	<i>Centella a.</i> vodný	0,138	1	2,20
4	<i>Centella a.</i> vodný	0,277	1	1,05
5	<i>Spirulina a.</i> vodný	0,161	1	1,55
6	<i>Spirulina a.</i> vodný	0,322	1	1,75
7	Chlorella č. 96% EtOH	0,059	1	1,80
8	Chlorella č. vodný	0,181	1	1,65
9	<i>Scenedesmus a.</i> vodný	0,133	1	1,75
10	čisté želatínové vlákna	-	1	1,80



Obrázok 22: Viabilita HaCaT buniek po kultivácii so vzorkami želatínových vlákien s rôznymi prísadami extraktov

Za hraničnú mieru viability sa považuje 50 %, nad ktorou je účinok daného materiálu (vlákna, extraktu) pre bunky netoxický. Ako možno pozorovať v stĺpcovom diagrame na Obrázku 22, pod túto hranicu neklesla viabilita buniek pre žiadnu testovanú vzorku vlákien. Na základe týchto výsledkov je možné dospieť k záveru, že čisté želatínové vlákna aj želatínové vlákna s prísadou extraktov nie sú v danom množstve toxické pre bunky línie HaCaT. Za daných podmienok testu je teda možné všetky vzorky vlákien považovať za netoxické. Vo všeobecnosti bola viabilita buniek vysoká pre všetky testované vlákna. Najväčší pokles viability buniek HaCaT vzhľadom ku kontrole, stále však nad

hodnotou 60 %, bol zaznamenaný pre vlákno, ktoré obsahovalo najvyšší hmotnostný podiel extraktu z riasy spomedzi testovaných vlákien s prímiesou. Jednalo sa o vzorku číslo 2, teda vlákno s obsahom vodného extraktu sinice *Arthrospira maxima*, pre túto vzorku bola výsledná viabilita buniek 66,46 % oproti kontrole. Vyššia koncentrácia extrahovanej biomasy riasy prítomná vo vlákne mohla mať za následok prípadné nepriaznivé účinky na viabilitu buniek HaCaT. Tento mierne výraznejší pokles viability mohol byť spôsobený aj faktom, že vzorka vlákna mala pomerne vysokú hmotnosť oproti ostatným, a tak do nej mohla pravdepodobne nasiaknuť väčšia časť živného média buniek, ktorým následne mohli chýbať potrebné živiny.

6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca bola zameraná na prípravu extraktov z mikrorias a siníc a na následnú výrobu a charakterizáciu organických vlákien s prímiesou vybraných extraktov za účelom ich aplikácie v kozmetike. V práci boli kultivované vybrané druhy rias, pre porovnanie boli použité aj komerčne dostupné riasy a sinice. Biomasa rias a siníc bola extrahovaná do rôznych rozpúšťadiel, a takto pripravené extrakty boli najskôr skúmané a charakterizované s cieľom stanovenia zastúpenia rôznych skupín potencionálne využiteľných aktívnych látok pre prípadné využitie v kozmetike. Zložením najzaujímavejšie extrakty boli následne inkorporované do organických želatínových vlákien pripravených metódou elektrospinningu.

V práci bola spracovaná rešerš zameraná na významné bioaktívne metabolity rias a siníc s potenciálnym využitím nielen pre kozmetické účely. Teoretická časť ďalej popisuje význam enkapsulácie a nanovlákien, a uvádza princíp prípravy vlákien elektrostatickým zvlákňovaním.

V experimentálnej časti boli najskôr následnou extrakciou pripravené vodné a etanolové (20, 60 a 96 % EtOH) extrakty z riasy *Scenedesmus acutus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, komerčnej riasy *Chlorella česká*, *Chlorella vulgaris*, ďalej z nami kultivovanej sinice *Arthrospira maxima* a komerčne dostupnej vysušenej biomasy sinice *Spirulina alga*. Pre porovnanie obsahu aktívnych látok prítomných v mikroriasach a siniciach s látkami vyšších rastlín bola extrahovaná aj komerčná biomasa rastliny *Centella asiatica*, ktorej extrakty sa v súčasnosti hojne využívajú v rôznych kozmetických produktoch. Komerčná riasa *Ch. vulgaris*, sinica *S. alga* a rastlina *C. asiatica* boli extrahované aj do hexánu. Extrakty rias a siníc boli analyzované pomocou UV-VIS absorpčnej spektrofotometrie, ktorá poskytla celé absorpčné spektrá všetkých extraktov, na základe ktorých bolo vypočítané zastúpenie chlorofylov a celkových karotenoidov v závislosti na druhu riasy či sinice, a na type extrakčného činidla. V jednotlivých extraktoch bol potom metódou TEAC stanovený antioxidačný účinok prítomných látok, ďalej bol určený obsah fenolických látok a obsah celkových proteínov. Vybrané kmene rias a siníc extrahovaných do 96 % etanolu boli podrobené aj analýze obsahu chlorofylov a karotenoidov pomocou HPLC. Chromatografická analýza 96 % etanolových extraktov preukázala významnejší obsah rôznych karotenoidov, vrátane betakroténu, len u sinice *Arthrospira maxima*.

Z testovaných extraktov obsahoval najviac látok s antioxidačným účinkom vodný extrakt nakultivovanej sinice *Arthrospira maxima*. Výsledky výpočtov založených na intenzite absorpcie žiarenia pri charakteristických vlnových dĺžkach preukázali, že táto sinica obsahovala aj najvyšší podiel celkových karotenoidov v pevnej hmote zo všetkých analyzovaných kmeňov a typov extraktov. Komerčná sinica *Spirulina alga* extrahovaná do destilovanej vody obsahovala najvyšší podiel chlorofylu *b*. Koncentrácia chlorofylu *a* stanovená z absorpčných spektier extraktov dosahovala najvyššiu hodnotu pre riasu *Chlorella česká*, extrahovanú do 96 % etanolu. Pre danú riasu bol taktiež detegovaný najväčší obsah celkových chlorofylov. Vysokú koncentráciu týchto pigmentov potvrdila aj HPLC analýza tohto extraktu. Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov v extraktoch preukázalo, že najvyšší podiel fenolických látok obsahovala biomasa porovnávacej rastliny *C. asiatica*. Z testovaných druhov rias a siníc obsahovala najviac polyfenolov komerčná *Spirulina alga* extrahovaná do vody. Pre riasu *Chlorella česká* extrahovanú do vody bol detegovaný najvyšší obsah celkových proteínov. Tieto extrakty boli vybrané na inkorporáciu do pripravovaných organických vlákien.

V práci boli ďalej technikou elektrostatického zvlákňovania vyrobené vlákna na báze želatíny s obsahom extraktov z rias. Celkovo bolo pripravených 19 typov vlákien, z toho jedna vzorka predstavovala čisté želatínové vlákna a 18 vzoriek navzájom sa líšiacich množstvom a typom inkorporovaného extraktu. Vlákna s prímiesou extraktov boli zhodnotené z hľadiska hmotnostného podielu enkapsulovaných pevných látok extrahovaných z rias a siníc v pripravených vláknitých vzorkách. Bola taktiež vyhodnotená efektívnosť zvlákňovania pracovných roztokov použitou technikou

elektrospinningu. Vo všeobecnosti bolo efektívnejšie zvlákňovanie roztokov s prímiesou vodných extraktov v porovnaní s roztokmi s obsahom etanolových extraktov.

Vo všetkých pripravených vláknach bola ďalej testovaná ich antioxidačná aktivita. Z dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že testované vlákna obsahovali enkapsulované látky s antioxidačným účinkom v množstvách mikrogramov na miligram hmotnosti vlákнитých vzoriek. Najväčšiu antioxidačnú aktivitu vykazovalo vlákno s najvyšším obsahom vodného extraktu zo sinice *Arthrospira maxima*. Tento výsledok bol očakávaný, keďže pre daný extrakt bol predtým stanovený najvyšší antioxidačný účinok zo všetkých testovaných extraktov. Najnižšia antioxidačná aktivita bola naopak zaznamenaná pre vzorky vlákien s inkorporovaným 96 % etanolovým extraktom riasy *Chlorella česká*. Tento výsledok taktiež zodpovedal skutočnosti, že daný extrakt mal spomedzi použitých prímiesových extraktov najnižší obsah látok s antioxidačným účinkom. Na základe týchto výsledkov možno predpokladať, že inkorporáciou extraktov do vlákien elektrospinningom sa pravdepodobne príliš nemení zloženie a pomerné zastúpenie prítomných látok v zvlákňovacom roztoku obsahujúcom primiešané extrakty.

Antioxidačná aktivita vlákien bola skúmaná aj z hľadiska stability počas doby skladovania vlákien pri laboratórnej teplote. Z výsledkov troch meraní vždy v rozostupe 4 dní možno usúdiť, že vo vláknach za podmienok a doby skladovania nedošlo k degradácii enkapsulovaných antioxidantov pochádzajúcich z rias a siníc, keďže jednotlivé hodnoty antioxidačnej hodnoty sa v priebehu troch meraní pre každý typ vlákna vzájomne takmer nelíšili, a nedošlo k ich výraznému poklesu.

Pozorovaná bola aj rýchlosť rozpúšťania vzoriek vlákien na pokožke. Ako bolo predpokladané, na vodou navlhčenej pokožke došlo k okamžitému rozpusteniu celej vzorky vlákien. Oproti tomu na prirodzene suchej pokožke trvalo rozpúšťanie vlákien výrazne dlhšie, a presný čas závisel na hrúbke vlákna a aktuálnom stave prirodzenej vlhkosti a mastnoty pokožky.

Za účelom posúdenia bezpečnosti použitia želatínových vlákien s inkorporovanými extraktmi aktívnych látok rias a siníc v kozmetike bola sledovaná cytotoxicita pripravených vlákien. Na bunkovej línii humánnych keratinocytov HaCaT bol vykonaný MTT test cytotoxicity pre vlákna s najvyšším hmotnostným obsahom vyextrahovaných inkorporovaných látok pochádzajúcich z biomasy rias a siníc, a pre vlákna vykazujúce najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity. Za cytotoxické neboli považované vzorky, pri ktorých viabilita buniek neklesla pod 50 %. Na základe tohto kritéria bolo vyhodnotené, že pripravené čisté želatínové vlákna aj vlákna s prímiesou extraktov nevykazovali cytotoxický efekt v testovanom množstve, a teda by malo byť možné používať ich v kozmetickom priemysle.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] KALINA, Tomáš, 1994. *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha: Karolinum. ISBN 80-706-6854-7.
- [2] CARDOZO, Karina H.M, Thais GUARATINI, Marcelo P BARROS, et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* [online]. Elsevier, 2007, **146**(1-2), 60-78 [cit. 2020-04-25]. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpc.2006.05.007
- [3] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS, 2015. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation* [online]. **33**(1), 1-17 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2015.1115900>
- [4] WEN, Peng, Yan WEN, Min-Hua ZONG, Robert J. LINHARDT a Hong WU, 2017. Encapsulation of Bioactive Compound in Electrospun Fibers and Its Potential Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **65**(42), 9161-9179 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02956. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b02956>
- [5] RAVEN, John A. a Mario GIORDANO, 2014. Algae. *Current Biology* [online]. **24**(13), R590-R595 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1016/j.cub.2014.05.039. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982214006046>
- [6] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA, 2005. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1036-1.
- [7] SPOLAORE, Pauline, Claire JOANNIS-CASSAN, Elie DURAN a Arsène ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering* [online]. Elsevier B.V, 2006, **101**(2), 87-96 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1389-1723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.101.87
- [8] MIŠURCOVÁ, L, F BUŇKA, J VÁVRA AMBROŽOVÁ, L MACHŮ, D SAMEK a S KRÁČMAR. Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. *Food chemistry* [online]. Elsevier, 2014, **151**(C), 120-125 [cit. 2020-05-10]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.040
- [9] EDELMANN, Minnamari, Sanni AALTO, Bhawani CHAMLAGAIN, Susanna KARILUOTO a Vieno PIIRONEN. Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders. *Journal of food composition and analysis* [online]. Elsevier, 2019, **82** [cit. 2020-10-31]. ISSN 0889-1575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2019.05.009
- [10] GILLE, Andrea, Andreas TRAUTMANN, Clemens POSTEN a Karlis BRIVIBA. Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *International journal of food sciences and nutrition* [online]. Taylor & Francis, 2016, **67**(5), 507-513 [cit. 2020-10-31]. ISSN 0963-7486. Dostupné z: doi:10.1080/09637486.2016.1181158
- [11] DALLEN, Maria, c2010. *Zelené potraviny: když jídlo je naším lékem : mladá pšenice, mladý ječmen, alfalfa, chlorela, spirulina, mořské řasy, zelenina*. Praha: Ratio Bona. ISBN 978-80-254-4590-7.
- [12] KOPECKÝ, Jiří, Richard LHOTSKÝ a Jindřiška PAICHLOVÁ, 2017. *Aktivní látky mikrořas ve výživě* [online]. Praha: Středisko společných činností AV ČR [cit. 2020-05-12]. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-2247-2. Dostupné z:

<https://www.academia.cz/uploads/media/preview/0001/04/269a43c54d6d4eee92386cb6a1c93574e041aa0a.pdf>

- [13] GÓMEZ, Carmen a José LEGIDO. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. *Cosmetics* [online]. Basel: MDPI, 2017, **4**(4) [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics4040046
- [14] RENUKADEVI, K. P., P. S. SARAVANA a J. ANGAYARKANNI, 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of *Chlamydomonas reinhardtii* sp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2(6), 1467-1472 [cit. 2021-7-26]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.298.4882&rep=rep1&type=pdf>
- [15] BARSANTI, L., GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 301 s. ISBN 0-8493-1467-4
- [16] MASOJÍDEK, Jiří, Richard LHOTSKÝ, Jiří KOPECKÝ a Ondřej PRÁŠIL, 2016. *Mikrořasy - solární továrna v jedné buňce* [online]. [Praha]: Středisko společných činností AV ČR [cit. 2020-09-06]. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-0127-9. Dostupné z: https://www.alga.cz/UserFiles/mstefanova/files/Mikro%C5%99asy_sol%C3%A1rn%C3%AD%20tov%C3%A1rna%20v%20jeden%C3%A9%20bu%C5%88ce.pdf
- [17] HALLIWELL, Barry. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* [online]. Taylor & Francis, 1999, **31**(4), 261-272 [cit. 2020-12-06]. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.1080/10715769900300841
- [18] GOIRIS, Koen, Koenraad MUYLAERT, Ilse FRAEYE, Imogen FOUBERT, Joseph DE BRABANTER a Luc DE COOMAN. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* [online]. Katholieke Universiteit Leuven, 2012, **24**(6), 1477 [cit. 2020-10-30]. ISSN 09218971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-012-9804-6
- [19] MORTON DW, Agatonovic-Kustrin S, 2013. Cosmeceuticals Derived from Bioactive Substances Found in Marine Algae. *Oceanography: Open Access*. 01(02). DOI: 10.4172/2332-2632.1000106. ISSN 23322632. Dostupné také z: <http://www.esciencecentral.org/journals/cosmeceuticals-derived-from-bioactive-substances-found-in-marine-algae-2332-2632-1-106.php?aid=19650>
- [20] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2010, **112**(9), 930-940 [cit. 2020-12-06]. ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201000044
- [21] WANG, Hui-Min David, Ching-Chun CHEN, Pauline HUYNH a Jo-Shu CHANG, 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics: potential bioactive substances for cosmeceutical applications. *Bioresource Technology* [online]. 184(1), 355-362 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.001. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414017350>
- [22] KIM, Se-kwon, Y. RAVICHANDRAN, Sher KHAN a Young KIM, 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. Heidelberg: The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, **13**(5), 511-523 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1007/s12257-008-0113-5. ISSN 1226-8372. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-008-0113-5>
- [23] DE JESUS RAPOSO, Maria, Alcina DE MORAIS a Rui DE MORAIS, 2015. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine*

- Drugs* [online]. 13(5), 2967-3028 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.3390/md13052967. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/5/2967>
- [24] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín*. Bratislava: STU, 1991, 224 s. ISBN 80-227-0374-5
- [25] GARCIA-PICHEL, Ferran a Richard W. CASTENHOLZ. CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS OF SCYTONEMIN, A CYANOBACTERIAL SHEATH PIGMENT 1. *Journal of Phycology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 1991, 27(3), 395-409 [cit. 2020-11-06]. ISSN 0022-3646. Dostupné z: doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00395.x
- [26] D'ORAZIO, Nicolantonio, Maria GAMMONE, Eugenio GEMELLO, Massimo GIROLAMO, Salvatore CUSENZA a Graziano RICCIONI. Marine Bioactives: Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases. *Marine Drugs* [online]. Basel: MDPI, 2012, 10(4), 812-833 [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: doi:10.3390/md10040812
- [27] VODRÁŽKA, Zdeněk, 1993. *Biochemie*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0438-6.
- [28] IGIELSKA-KALWAT, Joanna, Agata WAWRZYŃCZAK a Izabela NOWAK, 2012. β -Carotene as an exemplary carotenoid and its application in cosmetic industry. *CHEMIK* [online]. 66(2), 140-144 [cit. 2020-05-22]. ISSN 0009-2886. Dostupné z: http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.baztech-article-BPP2-0017-0047/c/Igielska-Kalwat_eng.pdf
- [29] CHRISTAKI, Efterpi, Eleftherios BONOS, Ilias GIANNENAS a Panagiota FLOROU-PANERI, 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 93(1), 5-11 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1002/jsfa.5902. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5902>
- [30] TOMINAGA, Kumi, Nobuko HONGO, Mariko KARATO a Eiji YAMASHITA, 2012. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 59(1) [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.18388/abp.2012_2168. ISSN 1734-154X. Dostupné z: <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/2168>
- [31] PENG, Juan, Jian-ping YUAN, Chou-fei WU a Jiang-hai WANG. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs* [online]. Basel: MDPI, 2011, 9(10), 1806-1828 [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: doi:10.3390/md9101806
- [32] SCHLOSSMAN, M. L. The chemistry and manufacture of cosmetics: cosmetic specialties and ingredients. IL: Amazon, 2010. ISBN 978-1-932633-70-2
- [33] VÍT, Radek, 2020. *Analýza glukánů v rostlinných a mikrobiálních vzorcích* [online]. Brno [cit. 2020-11-07]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/xmlui/handle/11012/190997>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie.
- [34] ZHU, Fengmei, Bin DU a Baojun XU. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food hydrocolloids* [online]. Elsevier, 2016, 52(C), 275-288 [cit. 2020-11-07]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.003
- [35] PILLAI, R., M. REDMOND a J. RÖDING. Anti-Wrinkle Therapy: Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 2005, 27(5), 292-292 [cit. 2020-11-07]. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x
- [36] ARIEDE, Máira Bueno, Thalita Marcílio CANDIDO, Ana Lucia Morocho JACOME, Maria Valéria Robles VELASCO, João Carlos M. DE CARVALHO a André Rolim BABY, 2017.

- Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research* [online]. 25, 483-487 [cit. 2021-7-27]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2017.05.019.
- [37] HAGINO, Hiroshi a Masanobu SAITO, *Use of Algal Proteins in Cosmetics*. EP1433463 (A1). Uděleno 30.6.2004. Dostupné také z: <https://patents.google.com/patent/EP1433463B1/en>
- [38] JIN, Gi Hong, Bon Uk KOO a Ju Dong LEE, *Anti-irritation, anti-inflammatory cosmetic composition containing linseed extract and enteromorpha compressa extract*. KR19990058639A. Uděleno 24.1.2000. Dostupné také z: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/040242512/publication/KR100253425B1?q=pn%3DKR100253425B1>
- [39] JIMENEZ-LOPEZ, C, A.G PEREIRA, C LOURENÇO-LOPES, P GARCIA-OLIVEIRA, L CASSANI, M FRAGA-CORRAL, M.A PRIETO a J SIMAL-GANDARA. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food chemistry* [online]. Elsevier, 2021, 341(Pt 2) [cit. 2020-12-12]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128262
- [40] BOKROVÁ, Jitka, 2019. PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ, NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN PRO KOSMETICKÉ A POTRAVINÁŘSKÉ ÚČELY [online]. Brno [cit. 2020-11-08]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=178299. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [41] BALASUNDRAM, N., K. SUNDRAM a S. SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry* [online]. 2006, 99, 191-203 [cit. 2020-04-24]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- [42] JAHAN, Afroz, Iffat Zareen AHMAD, Nida FATIMA, Vaseem A ANSARI a Juber AKHTAR. Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: a review. *Phycologia (Oxford)* [online]. Taylor & Francis, 2017, 56(4), 410-422 [cit. 2020-10-30]. ISSN 0031-8884. Dostupné z: doi:10.2216/15.58.1
- [43] JEREZ-MARTEL, Idaira, Sara GARCÍA-POZA, Gara RODRÍGUEZ-MARTEL, Milagros RICO, Cristina AFONSO-OLIVARES a Juan Luis GÓMEZ-PINCHETTI. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. *Journal of Food Quality* [online]. Hindawi, 2017, 2017 [cit. 2021-02-01]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2017/2924508
- [44] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-808-6659-152.
- [45] CHOPRA, Dharam P. a B. Allen FLAXMAN, 1975. The Effect of Vitamin A on Growth and Differentiation of Human Keratinocytes in Vitro. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 64(1), 19-22 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12540883. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15444331>
- [46] TELANG, PurniSaokar, 2013. Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal* [online]. 4(2) [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.4103/2229-5178.110593. ISSN 2229-5178. Dostupné z: <http://www.idoj.in/text.asp?2013/4/2/143/110593>
- [47] PULLAR, Juliet, Anitra CARR a Margreet VISSERS, 2017. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* [online]. 9(8) [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.3390/nu9080866. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/8/866>

- [48] KLOUDA, Pavel, 2016. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [49] LUQUE DE CASTRO, M.D a F PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online]. Elsevier B.V, 2010, **1217**(16), 2383-2389 [cit. 2020-11-18]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.11.027
- [50] VOLKA, Karel, Jaroslav FOGL, Milan POPL a Miloslav SUCHÁNEK. *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT, 1997, 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [51] LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN, 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 1(1), F4.3.1-F4.3.8 [cit. 2021-7-26]. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- [52] JOHNSON, Matthew P., 2016. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* [online]. 60(3), 255-273 [cit. 2021-7-26]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20160016
- [53] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy* [online]. 2004, **98**(4), 174-179 [cit. 2020-11-18]. ISSN 00092770. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [54] ALAM, Md. Nur, Nusrat Jahan BRISTI a Md RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal* [online]. Elsevier B.V, 2013, **21**(2), 143-152 [cit. 2020-11-18]. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002
- [55] PATEIRO, Mirian, Belén GÓMEZ, Paulo E. S. MUNEKATA, Francisco J. BARBA, Predrag PUTNIK, Danijela Bursać KOVAČEVIĆ a José M. LORENZO, 2021. Nanoencapsulation of Promising Bioactive Compounds to Improve Their Absorption, Stability, Functionality and the Appearance of the Final Food Products. *Molecules* [online]. 26(6) [cit. 2021-7-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26061547
- [56] EDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI, 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. **1**, 1806-1815 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [57] SILVA, Pablo Teixeira Da, Leadir Lucy Martins FRIES, Cristiano Ragagnin de MENEZES, Augusto Tasch HOLKEM, Carla Luisa SCHWAN, Evelin Francine WIGMANN, Juliana de Oliveira BASTOS a Cristiane de Bona Da SILVA. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural* [online]. Universidade Federal de Santa Maria, 2014, **44**(7), 1304-1311 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1590/0103-8478cr20130971. ISSN 1678-4596. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701304&lng=en&tlng=en
- [58] YILMAZ, Fulya, Gizem CELEP a Gamze TETIK, 2016. Nanofibers in Cosmetics. *Nanofiber Research - Reaching New Heights* [online]. InTech, 2016-10-19, s. 127-137 [cit. 2020-11-09]. ISBN 978-953-51-2528-0. Dostupné z: doi:10.5772/64172
- [59] ALTAY, Filiz a Nagihan OKUTAN, 2015. Nanofibre Encapsulation of Active Ingredients and their Controlled Release. *Advances in Food Biotechnology* [online]. Chichester, UK, 2015-10-30, 607-616 [cit. 2021-6-27]. ISBN 9781118864463. Dostupné z: doi:10.1002/9781118864463.ch37

- [60] NGUYEN, Luong T. H., Shilin CHEN, Naveen K. ELUMALAI, Molamma P. PRABHAKARAN, Yun ZONG, Chellappan VIJILA, Suleyman I. ALLAKHVERDIEV a Seeram RAMAKRISHNA. Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2013, **298**(8), 822-867 [cit. 2020-11-09]. ISSN 1438-7492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201200143
- [61] RAMAKRISHNA, Seeram, Kazutoshi FUJIHARA, Wee-eong TEO, Thomas YONG, Zuwei MA a Ramakrishna RAMASESHAN. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials today (Kidlington, England)* [online]. Elsevier, 2006, **9**(3), 40-50 [cit. 2020-11-11]. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(06)71389-X
- [62] FATHI-AZARBAYJANI, Anahita, Lin QUN, Yew CHAN a Sui CHAN. Novel Vitamin and Gold-Loaded Nanofiber Facial Mask for Topical Delivery. *AAPS PharmSciTech* [online]. Boston: Springer US, 2010, **11**(3), 1164-1170 [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-010-9475-z
- [63] SON, Young, Woo KIM a Hyuk YOO. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, **37**(1), 69-78 [cit. 2020-11-11]. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-013-0284-2
- [64] NAYAK, Rajkishore, Rajiv PADHYE, Ilias Louis KYRATZIS, Yen Bach TRUONG a Lyndon ARNOLD. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal* [online]. London, England: SAGE Publications, 2012, **82**(2), 129-147 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1177/0040517511424524. ISSN 0040-5175. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0040517511424524>
- [65] PAVLIŇÁKOVÁ, Veronika, 2016. *Elektrostatické zvlákňování modifikovaných biopolymerů pro medicínské aplikace* [online]. Brno [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/63678>. Disertace. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů.
- [66] RAMAKRISHNA, Seeram, 2005. *An introduction to electrospinning and nanofibers* [online]. Hackensack, NJ: World Scientific [cit. 2020-04-25]. ISBN 98-125-6415-2. Dostupné z: <https://epdf.pub/queue/an-introduction-to-electrospinning-and-nanofibers.html>
- [67] SCHIFFMAN, Jessica D a Caroline L SCHAUER. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer reviews* [online]. Taylor & Francis Group, 2008, **48**(2), 317-352 [cit. 2020-11-11]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720802022182
- [68] DROSOU, Christina G., Magdalini K. KROKIDA a Costas G. BILIADERIS, 2016. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology* [online]. **35**(2), 139-162 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1080/07373937.2016.1162797. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07373937.2016.1162797>
- [69] HUANG, Zheng-ming, Y.-Z ZHANG, M KOTAKI a S RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. Elsevier, 2003, **63**(15), 2223-2253 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7. ISSN 0266-3538. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266353803001787>

- [70] DIVÍNOVÁ, Nikol, 2017. *Reologické chování roztoků polymeru vhodných pro elektrostatické zvláknování* [online]. Brno [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=145052. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů.
- [71] ZHANG, Y.Z., J. VENUGOPAL, Z.-M. HUANG, C.T. LIM a S. RAMAKRISHNA, 2006. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* [online]. **47**(8), 2911-2917 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.polymer.2006.02.046. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386106001789>
- [72] HANI, Norziah M, Amir E TORKAMANI, Mohammad H AZARIAN, Kamil Wa MAHMOOD a Siti Hawa NGALIM. Characterisation of electrospun gelatine nanofibres encapsulated with Moringa oleifera bioactive extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2017, **97**(10), 3348-3358 [cit. 2020-11-13]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.8185
- [73] SKOTAK, Maciej, Sandra NORIEGA, Gustavo LARSEN a Anuradha SUBRAMANIAN. Electrospun cross-linked gelatin fibers with controlled diameter: The effect of matrix stiffness on proliferative and biosynthetic activity of chondrocytes cultured in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010, **95**(3), 828-836 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1002/jbm.a.32850. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32850>
- [74] TU, Roger, Shih-hwa SHEN, David LIN, Cary HATA, Kalathi THYAGARAJAN, Yasuharu NOISHIKI, Rodolfo QUIJANO a Roger TU. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* [online]. 1994, **28**(6), 677-684 [cit. 2020-04-26]. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/745658728/>
- [75] CHONG, E.J, T.T PHAN, I.J LIM, Y.Z ZHANG, B.H BAY, S RAMAKRISHNA a C.T LIM. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia* [online]. Elsevier, 2007, **3**(3), 321-330 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.actbio.2007.01.002. ISSN 1742-7061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706107000153>
- [76] LI†, Jia Kui, Nuo WANG† a Xue Shen WU. Gelatin nanoencapsulation of protein/peptide drugs using an emulsifier-free emulsion method. *Journal of Microencapsulation* [online]. Taylor & Francis, 1998, **15**(2), 163-172 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.3109/02652049809006846. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/02652049809006846>
- [77] RIEBELING, Christian, Jean-pascal PIRET, Bénédicte TROUILLER, Inge NELISSEN, Christelle SAOUT, Olivier TOUSSAINT a Andrea HAASE. A guide to nanosafety testing: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *NanoImpact* [online]. Elsevier, 2018, **10**, 1-10 [cit. 2020-11-13]. ISSN 2452-0748. Dostupné z: doi:10.1016/j.impact.2017.11.004
- [78] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* [online]. Elsevier B.V, 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2020-11-13]. ISSN 2095-1779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [79] BAHUGUNA, Ashutosh a Imran KHAN. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology* [online]. Bangladesh Pharmacological Society, 2017, **12**(2) [cit. 2020-11-15]. Dostupné z: doi:10.3329/bjp.v12i2.30892

- [80] LI, Heyu, Maochun WANG, Gareth R. WILLIAMS, Junzi WU, Xiaozhu SUN, Yao LV a Li-min ZHU. Electrospun gelatin nanofibers loaded with vitamins A and E as antibacterial wound dressing materials. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(55), 50267-50277 [cit. 2020-11-15]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c6ra05092a
- [81] TAVASSOLI-KAFRANI, Elham, Sayed GOLI a Milad FATHI. Encapsulation of Orange Essential Oil Using Cross-linked Electrospun Gelatin Nanofibers. *Food and Bioprocess Technology* [online]. New York: Springer US, 2018, **11**(2), 427-434 [cit. 2020-11-15]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-017-2026-9
- [82] İNANÇ HORUZ, Tuğba a K Bülent BELİBAĞLI. Production of electrospun gelatin nanofibers: an optimization study by using Taguchi's methodology. *Materials Research Express* [online]. 2017, **4**(1), 015023 [cit. 2020-11-15]. ISSN 20531591. Dostupné z: doi:10.1088/2053-1591/aa57ea

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)

DMSO – dimetylsulfoxid

GC – plynová chromatografia

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

LC – kvapalinová chromatografia

MF – mobilná fáza

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)

NS – nosičový systém

NV – nanovlákná

PHA – polyhydroxyalkanoáty

PHB – polyhydroxybutyrát

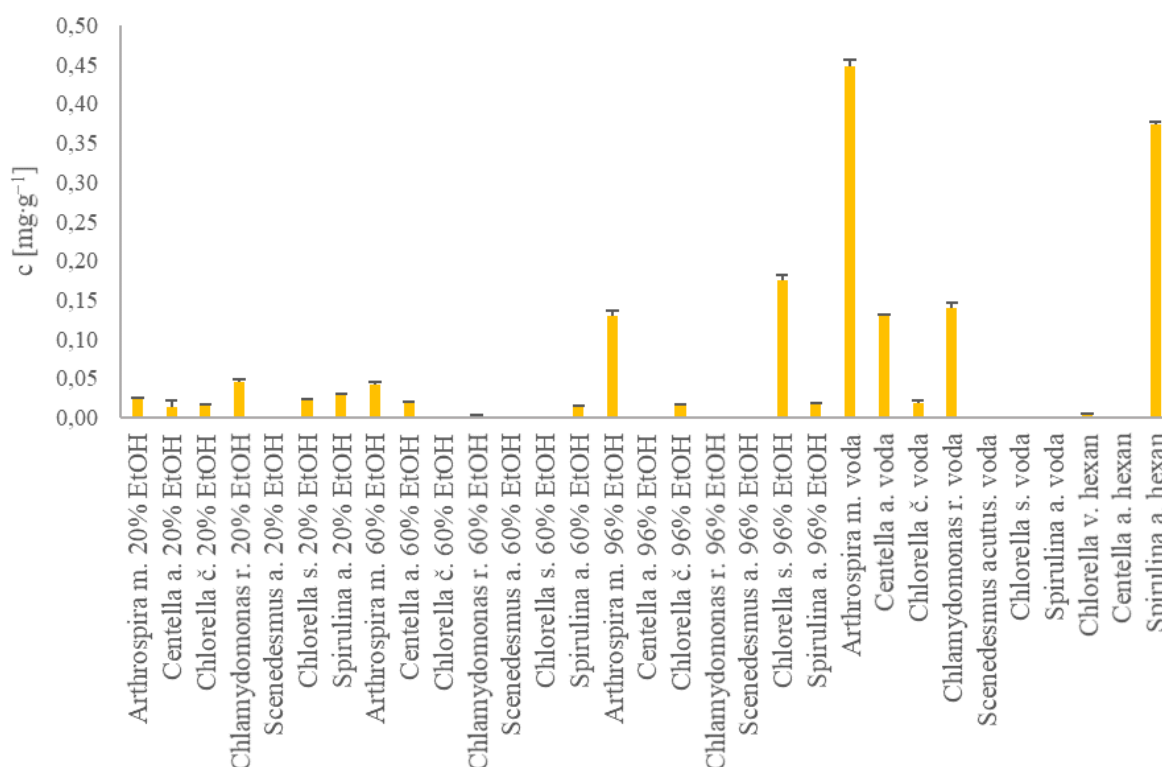
PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny s dlhým reťazcom (polyunsaturated fatty acids)

SF – stacionárna fáza

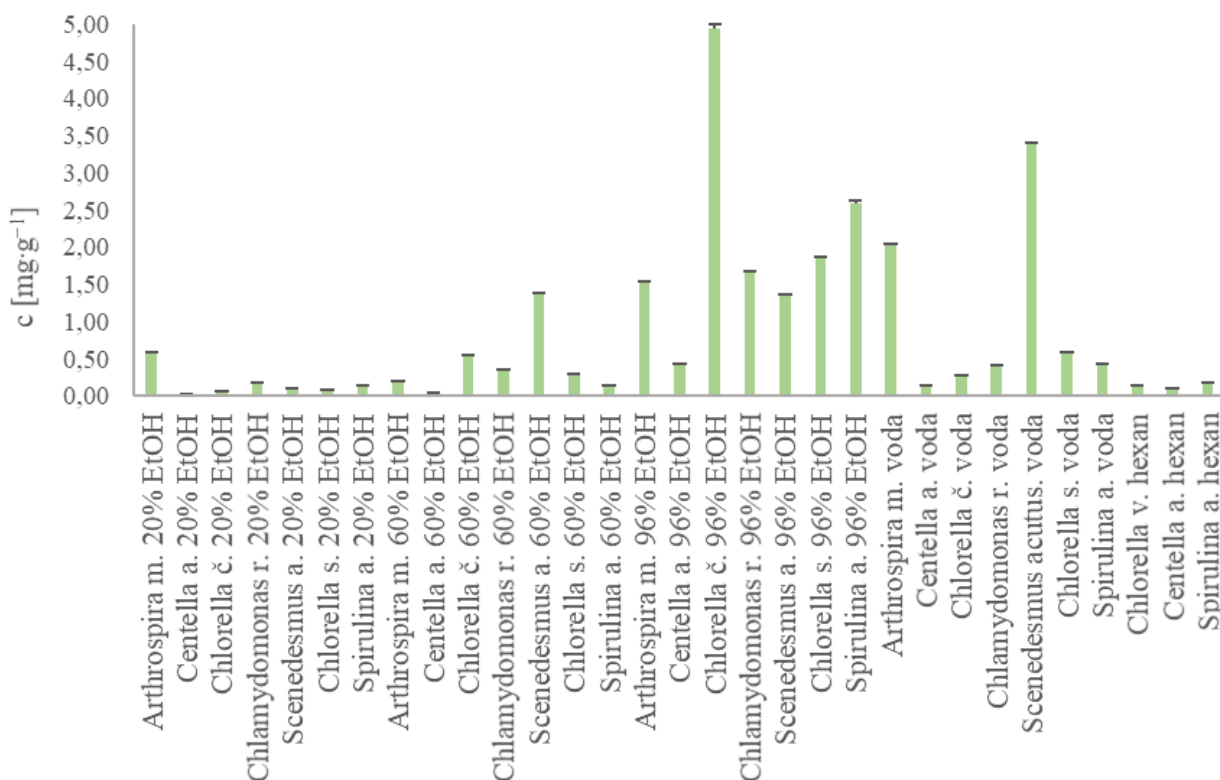
TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

9 PRÍLOHY

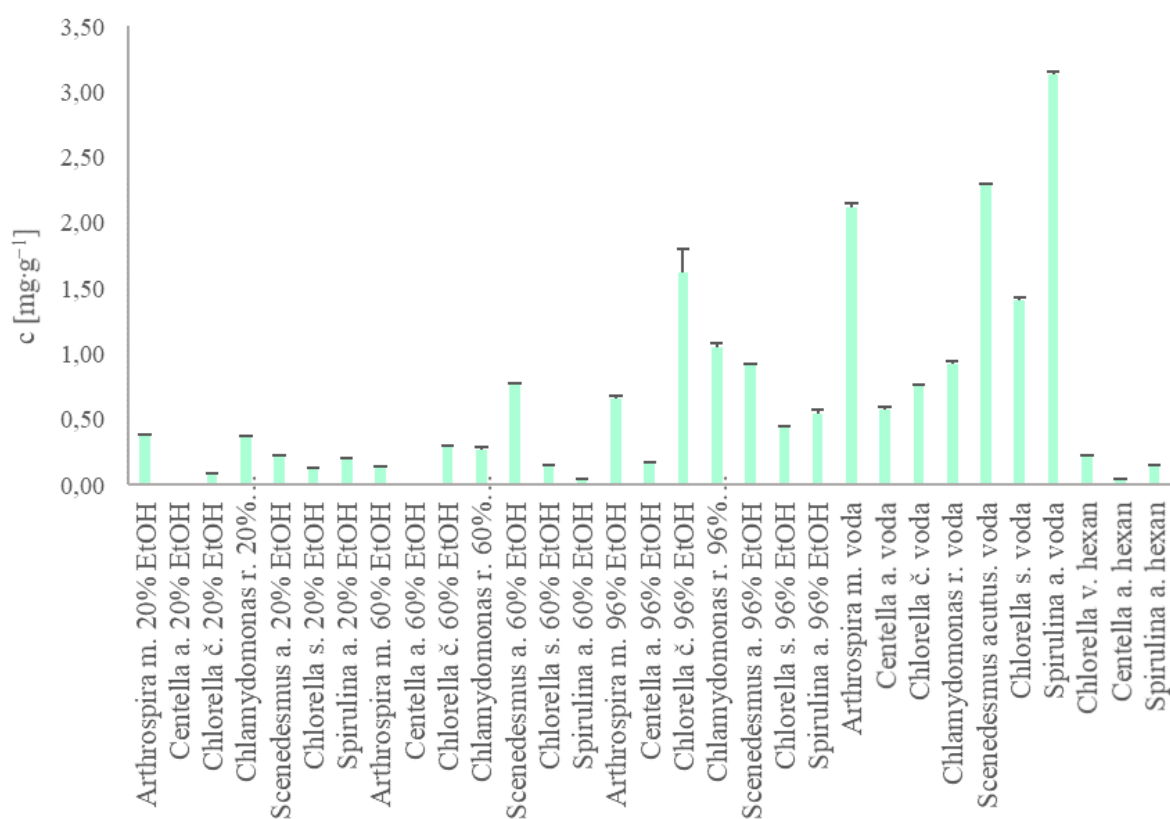
9.1 Stanovenie obsahu karotenoidov a chlorofylu z absorpčných spektier



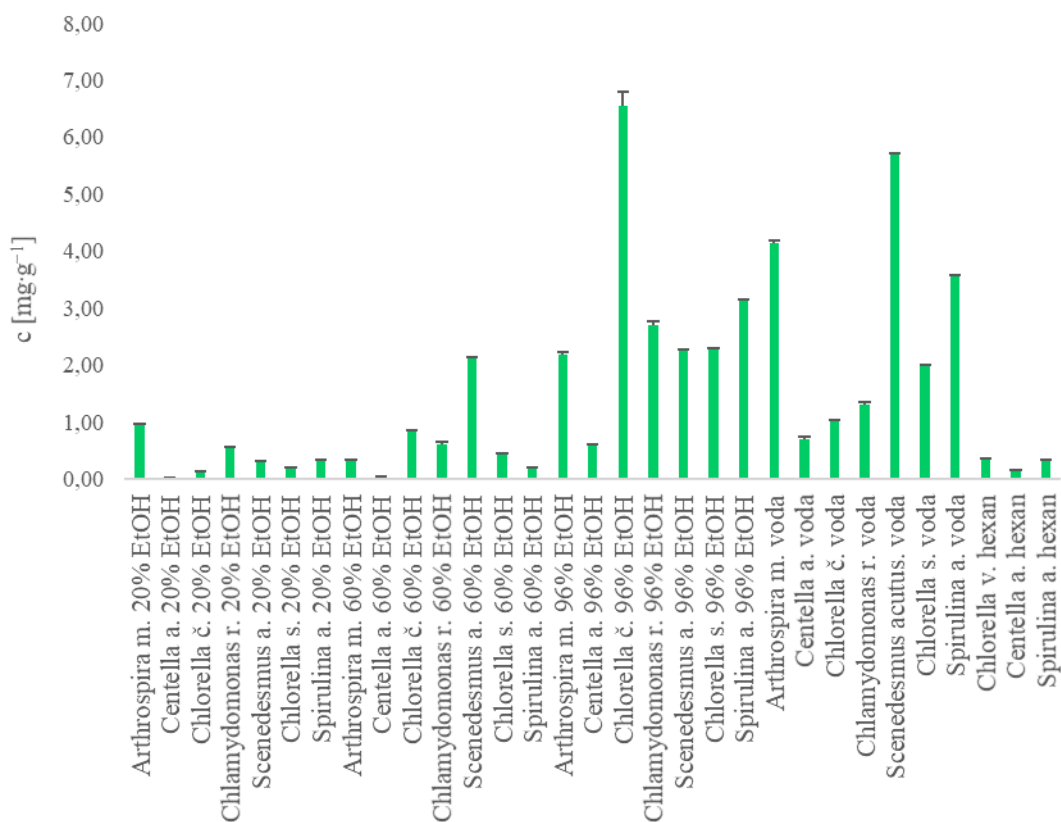
Obrázok 23: Porovnanie obsahu karotenoidov



Obrázok 24: Porovnanie obsahu chlorofylu A

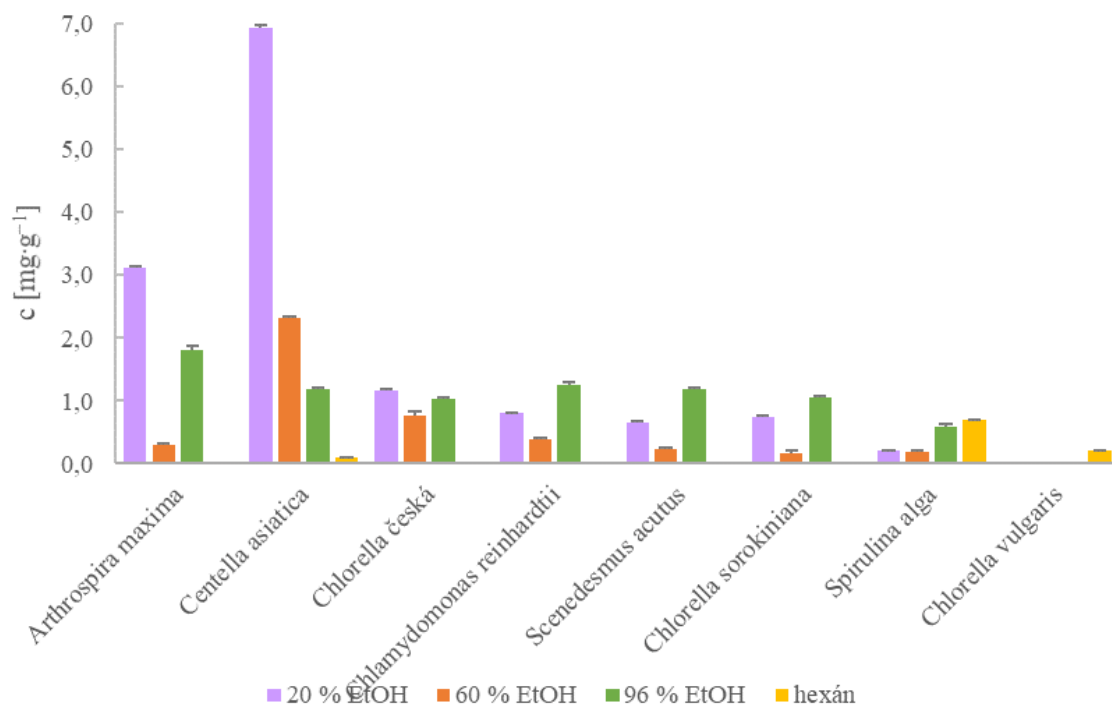


Obrázok 25: Porovnanie obsahu chlorofylu B

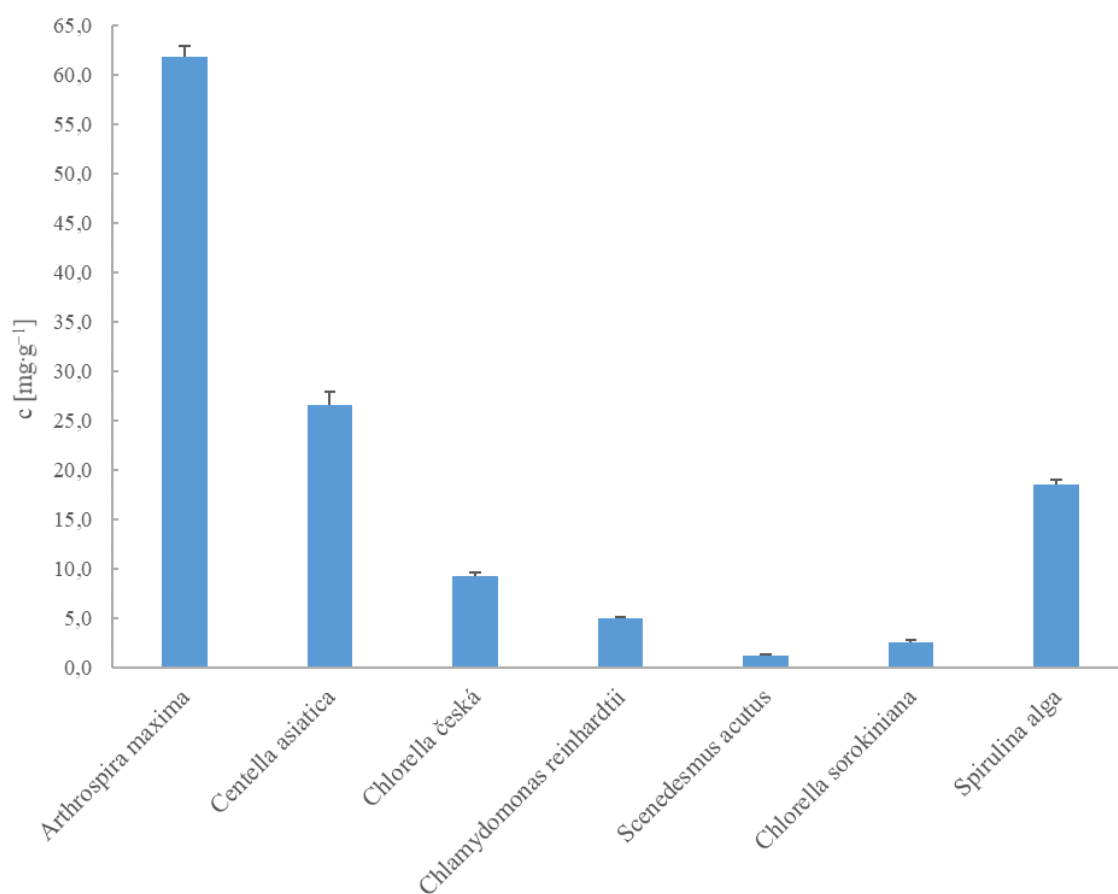


Obrázok 26: Porovnanie celkového obsahu chlorofylu (suma obsahu chlorofylu A a obsahu chlorofylu B)

9.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou TEAC



Obrázok 27: Antioxidačné aktivity hexánových, 20 %, 60 % a 96 % etanolových extraktov



Obrázok 28: Antioxidačné aktivity vodných extraktov

9.3 Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky

Tabuľka 14: Hodnoty koncentrácie celkových polyfenolov v extraktoch

Riasa/sinica/rastlina	Extrakt	c (mg·g ⁻¹)
<i>Spirulina alga</i>	Hexánový	0,189 ± 0,002
<i>Centella asiatica</i>	Hexánový	0,837 ± 0,007
<i>Centella asiatica</i>	20% etanol	11,551 ± 0,227
Česká chlorella	Vodný	11,551 ± 0,076
<i>Arthrospira maxima</i>	Vodný	17,641 ± 0,305
<i>Spirulina alga</i>	vodný	21,213 ± 0,199
<i>Centella asiatica</i>	vodný	40,817 ± 0,380