



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VÝVOJ KOSMETICKÝCH VÝROBKŮ S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM

DEVELOPMENT OF COSMETIC PRODUCTS WITH ANTIMICROBIAL EFFECT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Dribňáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1751/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Dribňáková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Vývoj kosmetických výrobků s antimikrobiálním účinkem

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše zaměřená na metody přípravy a charakterizace nanočástic a nanovláken, materiály pro jejich výrobu a na přírodní antimikrobiální látky
- 2) optimalizace přípravy nanovláken z vybraných biopolymerů metodou rotačního zvlákňování
- 3) funkcionalizace nanočástic a nanovláken vybranými přírodními antimikrobiálními látkami (thymol, karvakol)
- 4) testování antimikrobiální aktivity připravených produktů na mikrobiálních buňkách

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Barbora Dribňáková
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zaoberá štúdiom a prípravou nanomateriálov s antimikrobiálnym účinkom. Boli pripravené nanovláčna metódou forcespinningu z biopolymérov a taktiež lipozómy metódou sonifikácie. Aktívne látky využívané v tejto práci sú tymol, karvakrol a eugenol.

V teoretickej časti sú popísané niektoré z možností prípravy nanovlákien a nanočastíc a tiež materiály pre syntézu týchto nanomateriálov. Ďalšie kapitoly popisujú aj problematiku enkapsulácie účinných látok do nanomateriálov. Táto časť sa práce venuje aj mikrobiómu pokožky, antimikrobiálnemu účinku a antimikrobiálnym látkam, či už syntetickým alebo prírodným.

Praktická časť tejto práce sa zaoberá stanovením absorpčných maxím, antioxidačnej aktivity a obsahu polyfenolov u jednotlivých aktívnych látok. Ďalej sa venuje príprave nanovlákien z polyhydroxybutyrátu. Do týchto vlákien boli enkapsulované aktívne látky a tiež bolo stanovené postupné uvoľňovanie účinných látok do dvoch prostredí, a to fyziologický roztok a destilovaná voda. Táto časť práce taktiež popisuje optimalizáciu prípravy nanovlákien z chitozánu a polyamidu metódou rotačného zvlákňovania. Funkcionalizované lipozómy boli charakterizované z hľadiska ich veľkosti, stability, enkapsulačnej účinnosti a taktiež bolo zaznamenané postupné uvoľňovanie aktívnych látok. Lipozómy vykazovali aj po niekoľkých týždňoch vysokú stabilitu a ich veľkosť sa pohybovala v rozmedzí od $170,90 \pm 1,63$ nm do $243,07 \pm 7,83$ nm. V neposlednom rade bola otestovaná antimikrobiálna aktivita pripravených produktov a aj samotných aktívnych látok. Mikroorganizmy použité k tomuto stanoveniu zahŕňajú tri bakteriálne kmene, a to *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. Testované aktívne látky, či už v čistej alebo enkapsulovanej forme, preukázali antimikrobiálny účinok voči grampozitívnym aj gramnegatívnym baktériám. Na základe dosiahnutých výsledkov teda predpokladáme možnosť využitia pripravených produktov v kozmetických výrobkoch, určených pre liečbu akné a iných kožných chorôb, a tiež ich využitie v podobe konzervantov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kozmetika, antimikrobiálny účinok, antimikrobiálna látka, nanovláčna, lipozómy, forcespinning, chitozán, polyhydroxybutyrát, nanoenkapsulácia

ABSTRACT

The proposed bachelor's thesis focuses on the preparation and study of nanomaterials with antimicrobial properties. The nanofibers were synthesized from biopolymers using the forcespinning method, and liposomes were prepared using the sonification method. Active ingredients used in this work are tymol, carvacrol, and eugenol.

The theoretical section of the thesis discusses the methods for preparing nanofibers and nanoparticles and the materials required for their synthesis. It also covers the encapsulation of active ingredients in nanomaterials. Additionally, this part explores the skin microbiome, antimicrobial effects, and the use of both natural and synthetic antimicrobial agents.

The practical part of the thesis focuses on determining the polyphenol content and antioxidant activity of each active ingredient. The gradual release of active ingredients into saline solution and distilled water was determined for nanofibers synthesized from polyhydroxybutyrate with encapsulated active ingredients. Furthermore, it deals with the optimization of nanofiber synthesis from chitosan and polyamide using the forcespinning method. The functionalized liposomes were characterized in terms of their size, stability, encapsulation efficiency, and gradual release of active ingredients. The liposomes showed high stability even after several weeks, and their size ranged from 170.90 ± 1.63 nm to 243.07 ± 7.83 nm. Finally, the antimicrobial activity of the prepared products and active ingredients was tested against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*. The tested active ingredients in pure and encapsulated form, demonstrated antimicrobial effect against both gram-positive and gram-negative bacteria. We assume the possibility of using the prepared nanomaterials in cosmetic products intended for the treatment of acne and other skin diseases, and also its use in the form of preservatives.

KEYWORDS

Cosmetics, antimicrobial effect, antimicrobial substance, nanofibers, liposomes, forcespinning, chitosan, polyhydroxybutyrate, nanoencapsulation

DRIBŇÁKOVÁ, Barbora. *Vývoj kosmetických výrobků s antimikrobiálním účinkem* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149180>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Týmto by som sa rada poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za jej prívetivý prístup a možnosť pracovať pod jej vedením. Veľká vďaka patrí tiež Ing. Lucii Dzurickej za pomoc pri spracovaní experimentálnej časti, jej ochotu, trpezlivosť, cenné rady a v neposlednom rade za jej čas, ktorý mi venovala. Moje poďakovanie patrí tiež mojej rodine, priateľom a blízkym, ktorí ma podporovali behom celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1	Nanotechnológie a nanovlákná	11
2.1.1	Spôsoby prípravy nanovláknien.....	11
2.1.1.1	Forcespinning	11
2.1.1.2	Elektrospinning.....	12
2.2	Polyméry pre prípravu nanovláknien	13
2.2.1	Chitozán	13
2.2.1.1	Elektrospinning čistého chitozánu.....	13
2.2.1.2	Elektrospinning chitozánu s prídavkom syntetických polymérov....	14
2.2.1.3	Elektrospinning chitozánu s prídavkom anorganických nanočastíc.	14
2.2.2	Želatína	14
2.2.3	Polyhydroxybutyrát (PHB).....	14
2.2.4	Celulóza	15
2.3	Rozpúšťadlá pre zvlákňovanie	16
2.4	Nanočastice	16
2.4.1	Polymérne nanočastice	16
2.4.1.1	Lipozómy	17
2.4.2	Príprava polymérnych nanočastíc	17
2.4.2.1	Sonifikácia.....	18
2.5	Mikrobióm pokožky	18
2.5.1	Baktérie.....	18
2.5.1.1	Cutibacterium acnes.....	18
2.5.1.2	Staphylococcus aureus	19
2.5.1.3	Staphylococcus epidermidis	19
2.5.1.4	Escherichia coli.....	19
2.5.2	Vírusy	19
2.5.3	Huby a roztoče	20
2.5.3.1	Rod Malassezia.....	20
2.6	Antimikrobiálny účinok.....	20
2.6.1	Parabény.....	20
2.6.2	Benzoylperoxid	21

2.6.3	Prírodné látky s antimikrobiálnym účinkom.....	21
2.6.3.1	Tymol.....	21
2.6.3.2	Karvakrol.....	22
2.6.3.3	Kurkumín	22
2.6.3.4	Eugenol	23
2.6.3.5	Spirulina	24
2.6.4	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity.....	24
2.6.4.1	Disková difuzná metóda.....	25
2.6.4.2	Bujónová dilučná metóda.....	25
2.6.5	Resazurínový test	25
3	CIELE PRÁCE.....	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1	Použité prístroje a pomôcky.....	27
4.2	Použité chemikálie.....	27
4.2.1	Chemikálie použité pre stanovenia.....	27
4.2.2	Chemikálie použité pre prípravu nanovlákien	27
4.2.3	Chemikálie použité pre prípravu nanočastíc.....	27
4.2.4	Chemikálie použité pri kultivácii mikroorganizmov.....	28
4.3	Použité mikroorganizmy.....	28
4.4	Použité štandardné aktívne látky.....	28
4.5	Charakterizácia aktívnych látok.....	28
4.5.1	Stanovenie absorpčného maxima a zostavenie kalibračných kriviek účinných látok.....	28
4.5.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity vybraných aktívnych látok pomocou ABTS ^{•+}	29
4.5.3	Stanovenie celkových polyfenolov vybraných aktívnych látok	29
4.6	Príprava PHB nanovlákien metódou forcespinningu	29
4.7	Postupné uvoľňovanie aktívnych látok z PHB nanovlákien.....	29
4.8	Príprava chitozán – polyamid nanovlákien metódou forcespinningu	30
4.8.1	Chitozánové nanovlákná.....	30
4.8.2	Chitozán – polyamid nanovlákná.....	30
4.9	Príprava nanočastíc.....	30
4.10	Charakterizácia nanočastíc.....	30
4.10.1	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti	30

4.10.2	Stanovenie veľkosti lipozómov pomocou DLS	31
4.10.3	Stanovenie stability lipozómov pomocou Zeta potenciálu	31
4.11	Postupné uvoľňovanie aktívnych látok z lipozómov.....	31
4.12	Antimikrobiálne testy	31
4.12.1	Bujónová dilučná metóda	32
4.12.1.1	Antimikrobiálna aktivita aktívnych látok.....	32
4.12.1.2	Antimikrobiálna aktivita funkcionalizovaných nanovlákien	32
4.12.1.3	Antimikrobiálna aktivita funkcionalizovaných lipozómov	32
4.12.2	Resazurínový test	33
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	34
5.1	Charakterizácia aktívnych látok.....	34
5.1.1	Absorpčné maximá a kalibračné krivky aktívnych látok	34
5.1.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity	36
5.1.3	Stanovenie celkových polyfenolov	37
5.2	Optimalizácia prípravy nanovlákien z PHB pomocou forcespinningu	38
5.3	Postupné uvoľňovanie účinných látok z nanovlákien na báze PHB	39
5.3.1	Postupné uvoľňovanie tymolu z nanovlákien	39
5.3.2	Postupné uvoľňovanie karvakrolu z nanovlákien	40
5.3.3	Postupné uvoľňovanie eugenolu z nanovlákien.....	41
5.4	Optimalizácia prípravy nanovlákien z chitozánu a polyamidu.....	42
5.4.1	Chitozánové nanovlákná.....	43
5.4.2	Chitozán – polyamid nanovlákná.....	44
5.5	Charakterizácia nanočastíc.....	45
5.5.1	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti aktívnych látok do lipozómov	45
5.5.2	Stanovenie veľkosti lipozómov.....	46
5.5.3	Stanovenie stability lipozómov	47
5.6	Postupné uvoľňovanie účinných látok z nanočastíc.....	49
5.6.1	Postupné uvoľňovanie tymolu z nanočastíc.....	49
5.6.2	Postupné uvoľňovanie karvakrolu z nanočastíc.....	49
5.6.3	Postupné uvoľňovanie eugenolu z nanočastíc	50
5.7	Antimikrobiálne testy	51
5.7.1	Antimikrobiálny účinok aktívnych látok	51
5.7.1.1	DMSO	52

5.7.1.2	Tymol.....	52
5.7.1.3	Karvakrol.....	54
5.7.1.4	Eugenol	55
5.7.2	Antimikrobiálna aktivita PHB nanovlákién.....	56
5.7.3	Antimikrobiálna aktivita lipozómov.....	59
5.7.3.1	Lipozómy s enkapsulovaným tymolom	60
5.7.3.2	Lipozómy s enkapsulovaným karvakrolom	61
5.7.3.3	Lipozómy s enkapsulovaným eugenolom	61
5.8	Možnosti aplikácie funkcionalizovaných nanomateriálov	62
6	ZÁVER	64
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	66
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	75

1 ÚVOD

Kozmetický priemysel sa neustále vyvíja vzhľadom na meniace sa preferencie spotrebiteľov a potrebu prispôbiť sa novším, pokročilým technológiám. Jedným z najrýchlejšie rozvíjajúcich sa odvetví, a to nielen v kozmetike, sú nanomateriály [1].

Nanovlákná a nanočastice vykazujú pozoruhodné vlastnosti a stávajú sa stále populárnejšími. Sú široko využívané vo farmaceutickom, potravinárskom a tiež kozmetickom priemysle. Veľkou výhodou je možnosť enkapsulácie látok do nanosystémov. Takto zapuzdrené aktívne látky sú chránené pred predčasnou degradáciou a dokážu sa tak bezpečne dostať na miesto určenia a vykonávať svoju funkciu. Nanoenkapsulované látky v kozmetike sú teda stabilnejšie, dokážu lepšie penetrovať do pokožky a dochádza tiež k zlepšeniu UV ochrany [2]. V kozmetickom a farmaceutickom priemysle to môžu byť napríklad prírodné antimikrobiálne látky. Cieľom je podpora liečby kožných ochorení, ako je napríklad akné, či zamedzenie šírenia infekcie, a teda urýchlenie hojenia rán. Ďalšou skupinou látok, ktoré môžu byť enkapsulované sú antioxidanty, ktoré dokážu spomaľovať proces starnutia pokožky [2; 3].

Mnoho mikroorganizmov dnes vykazuje rezistenciu voči antibiotikám. Je preto dôležité hľadať nové možnosti látok s antimikrobiálnou aktivitou. Tieto látky dokážu zabrániť šíreniu infekcie alebo eliminovať patogénne mikroorganizmy. Ide buď o syntetické alebo prírodné zlúčeniny so špecifickým mechanizmom účinku. Prírodné zlúčeniny rastlinného pôvodu by mohli predstavovať zaujímavé alternatívy k syntetickým molekulám [4].

Cieľom tejto práce je inkorporácia antimikrobiálnych látok do nanomateriálov, otestovanie ich účinku na mikrobiálnych bunkách a návrh možností pre ich aplikáciu v kozmetickom priemysle. Takto pripravené produkty boli charakterizované z pohľadu ich veľkosti, stability, enkapsulačnej účinnosti a tiež boli vykonané testy postupného uvoľňovania aktívnych látok.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

Teoretická časť tejto bakalárskej práce sa zaoberá nanomateriálmi, ktoré by mohli byť využívané pre prípravu kozmetických produktov. V ďalších kapitolách vidíme spôsoby prípravy nanovláken a nanočastíc a taktiež materiály pre ich syntézu. Zaoberá sa tiež kožným mikrobiómom a antimikrobiálnym účinkom prírodných aj syntetických látok.

2.1 Nanotechnológie a nanovláka

Pojem nanotechnológie vyjadruje manipuláciu s hmotou v takmer atómovom meradle, za účelom výroby nových štruktúr, materiálov a zariadení. Rozmery nanomateriálov sa pohybujú v rozmedzí od 1 do 100 nanometrov. Pri tejto veľkosti začínajú materiály vykazovať jedinečné vlastnosti, ktoré ovplyvňujú ich fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti [5]. Nanovláka môžeme definovať ako pevné vlákna s priemerom menším ako 100 nm, pričom ich dĺžka je značne väčšia ako ich priemer. Priemer nanovláken závisí na použítom polyméry pre ich syntézu a tiež spôsobe ich výroby. Nanovláka majú veľký povrch, vysokú pórovitosť, malú veľkosť pórov a nízku hustotu. Veľký pomer povrchu k objemu nanovláken umožňuje ich funkcionalizáciu. Pórovitosť je morfológická vlastnosť nanovláken, ktorá umožňuje kontrolované uvoľňovanie látok. Vizualizácia štruktúry a morfológie nanovláken je možná pomocou metód ako transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) alebo skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM). Pre zlepšenie vlastností nanovláken podľa preferencií sa používajú rôzne anorganické aj organické materiály. Príkladmi môžu byť anorganické nanočastice, uhlíkové nanorúrky, rastové faktory, proteíny a mnoho ďalších [1]. Nanovláka majú široké uplatnenie vo farmácii, textíliách, tkanivovom inžinierstve, kozmetickom priemysle a v rôznych systémoch distribúcie liečiv [6].

2.1.1 Spôsobu prípravy nanovláken

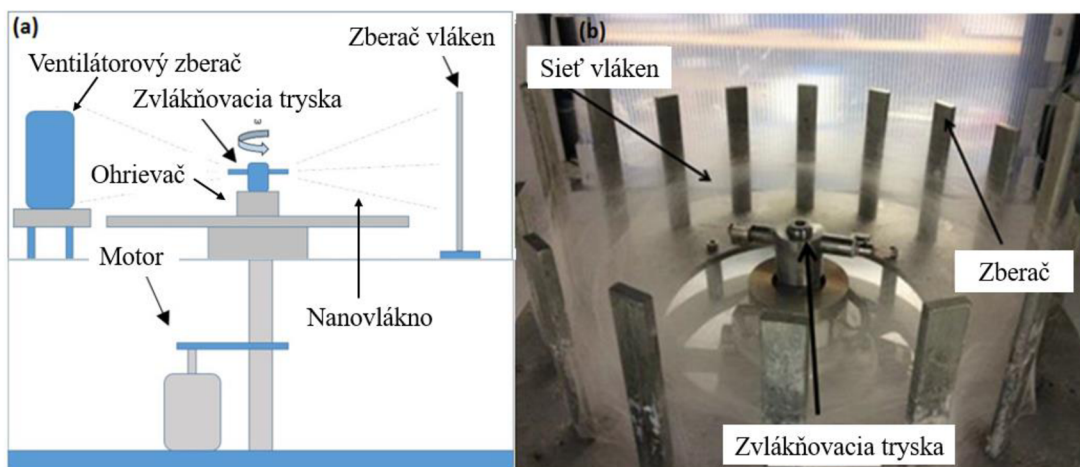
Nanovláka môžu byť vyrábané rôznymi technikami ako sú lyofilizácia, templátová syntéza, polymerizácia, vyfukovanie roztoku, plazmou indukovaná syntéza, tepelne indukovaná separácia fáz, elektrostatické zvlákňovanie (elektrospinning) či rotačné zvlákňovanie (forcespinning) a ďalšie [7].

2.1.1.1 Forcespinning

Na rozdiel od elektrostatického zvlákňovania, kde sú vlákna ňahované pomocou elektrostatických síl, forcespinning (FS) využíva odstredivé sily. To umožňuje výrazné zvýšenie výnosu a jednoduchosť výroby [8]. Touto metódou môžeme pripravovať nanovláka z roztokov alebo z čistých roztavených materiálov, takzvaných tavenín. Je možné používať vodivé aj nevodivé materiály, čo zväčšuje škálu pre výber materiálu [9]. Táto technológia vyžaduje menej rozpúšťadla prípadne žiadne rozpúšťadlo, čím sa stáva cenovo efektívnejšou metódou s lepšou bezpečnosťou prevádzky, v porovnaní s elektrospinningom.

Proces FS začína naplnením roztoku/taveniny do zvlákňovacej trysky. Počas výroby nanovláken sa roztok polyméru odťahuje z otvoru rotačnými silami [10]. Kľúčovými parametrami sú rýchlosť otáčania zvlákňovacej trysky, polomer otvoru, povrchové napätie, teplota okolitého prostredia, vzdialenosť otvoru zvlákňovacej dýzy od kolektora, zberný systém, rýchlosť vyparovania rozpúšťadla a reologické vlastnosti materiálu na výrobu

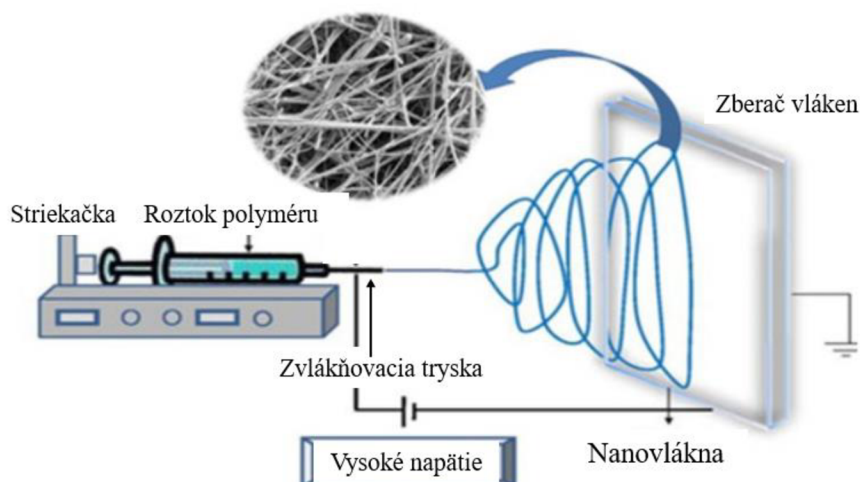
nanovlákien. Otvory zvlákňovacej dýzy disponujú rôznymi geometrickými tvarmi. [9; 10]. Rýchlosť odparovania rozpúšťadla má vplyv na viskozitu a elasticitu polyméru [10].



Obrázok 1: Znáznornenie procesu forcesspinningu: a) náskres procesu, b) reálny proces [11]

2.1.1.2 Elektrospinning

Elektrostatické zvlákňovanie, ktoré je založené na elektrostatickej hnacej sile, ponúka kontinuálnu výrobu nanovlákien. Okrem toho podporuje výrobu nanovlákien zo širokej škály prírodných, syntetických a hybridných polymérov s rôznymi fyzikálnymi, chemickými a mechanickými vlastnosťami [12]. Ďalšou výhodou elektrostatického zvlákňovania je, že nevyžaduje žiadny funkcionalizačný proces. Potrebuje iba rozpúšťadlo, ktoré rozpustí polymér a dokáže sa dobre odparovať počas zvlákňovania za laboratórnej teploty. Faktory, ktoré ovplyvňujú proces elektrostatického zvlákňovania sú koncentrácia polyméru, viskozita roztoku, prietok, intenzita elektrického poľa, vlhkosť vzduchu a vzdialenosť zvlákňovacej ihly od kolektora [13]. V procese elektrostatického zvlákňovania je aplikované vysoké napätie na kvapalnú polymér. Kvapka sa pomocou Coulombických síl predĺži a vytvorí sa takzvaný „Taylorov kužeľ“. Ďalej je kvapka vytlačená z kužeľa, aby sa vytvoril prúd vlákien. Rozpúšťadlo sa odparí pri prechádzaní prúdov vlákien atmosférou a vlákna pevného polyméru sa usporadúvajú na zberači vo forme netkanej siete [14].



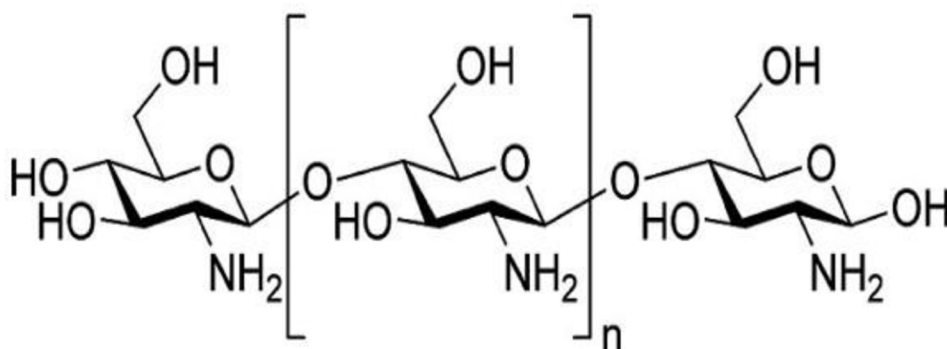
Obrázok 2: Znáznornenie procesu elektrospinningu [15]

2.2 Polyméry pre prípravu nanovlákién

Najbežnejšie používané polyméry pre výrobu nanovlákién sú celulóza, kolagén, želatína, dextrans, nylón, polystyrén, polyakrylonitril, polykarbonát, polyimidy, polyvinylalkohol, polybenzimidazol a polydrohydroxybutyrát [6]. Významným polymérom je tiež chitozán, ktorý má okrem iného aj antimikrobiálne účinky [16]. V súčasnosti sa často využíva aj enkapsulácia aktívnych látok alebo liekov do polymérov v procese zvlákňovania. Pomáha to zabrániť predčasnej degradácii a taktiež k zachovaniu aktivity zapuzdrenej zlúčeniny [17].

2.2.1 Chitozán

Chitozán (poly- β -1,4-glukóزامín), je zlúčenina odvodená od chitínu a patrí k prírodným polysacharidom. Ide o polymér nerozpustný vo vode alebo bežných organických rozpúšťadlách. Je ho však možné rozpustiť v kyseline octovej či mravčej. Chitozán má v oblasti biomedicíny široké využitie vďaka svojej netoxicity, biokompatibilite a biodegradabilite. Okrem toho má niekoľko jedinečných vlastností: je antimikrobiálny a inhibuje rast širokej škály húb, kvasiniek a baktérií [16]. Chitozán má adsorpčné vlastnosti hlavne vďaka amino- a hydroxylovým skupinám v jeho štruktúre. Nanovlákná chitozánu je možné pripraviť elektrospinnigom alebo po prídavku nejakých syntetických polymérov aj pomocou forcespinnigom. Napríklad v kombinácii s polyamidom a ako rozpúšťadlo môže byť použitá kyselina mravčia [18].



Obrázok 3: Štruktúra chitozánu [19]

2.2.1.1 Elektrospinning čistého chitozánu

Odpudivé sily medzi iónovými skupinami, ktoré vznikajú v dôsledku aplikácie vysokého elektrického poľa počas elektrospinnigom, obmedzujú tvorbu spojených vlákién a často produkujú guľôčky. Je preto náročné vyrobiť čisté chitozánové nanovlákná. Štúdie ukazujú, že je možné pripraviť ich napríklad pomocou kyseliny trifluorocetovej ako rozpúšťadla a pridaním dichlórmetánu ako spolurozpúšťadla. Zlepší sa tým homogenita chitozánových vlákién, bez vzájomného prepojenia vláknitých sietí. Vznikajú tak vlákná chitozánu s priemerom 330 nm. Pri kontakte so zásaditou látkou by ale došlo k strate vláknitej štruktúry. Preto je podľa tejto štúdie vhodné pridať roztok uhličitanu sodného ako neutralizačného činidla. Vhodným ekvivalentom spolurozpúšťadla by bola aj kyselina octová. Kvôli nie príliš priaznivým podmienkam zvlákňovania čistého chitozánu a tiež tvorbe guľôčok sú k chitozánu pridávané napríklad syntetické polyméry alebo nanočastice. Tieto dva spôsoby sú popísané nižšie [16].

2.2.1.2 Elektrospinning chitozánu s prídavkom syntetických polymérov

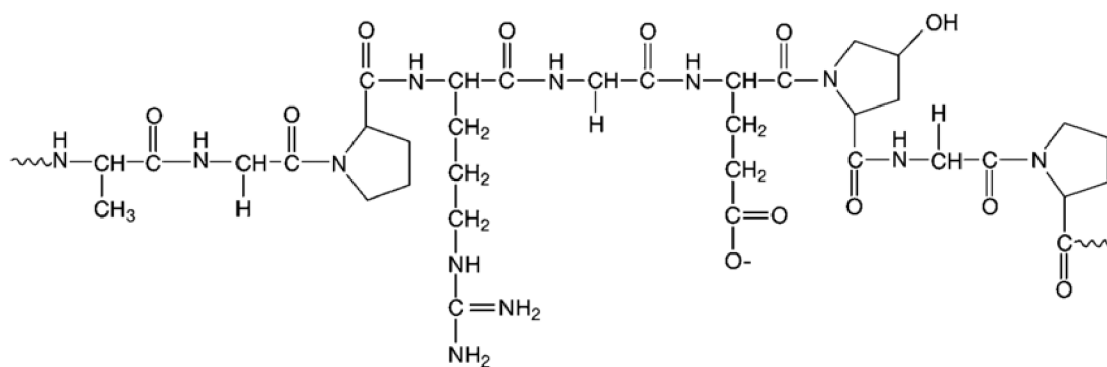
Vývin chitozánových nanovláken je možný a v mnohých prípadoch efektívnejší po pridaní syntetických polymérov. Využívajú sa polyméry ako polyvinylalkohol (PVA), polyetylénoxid (PEO), polyetylénterftalát, polymliečna kyselina, nylón a ďalšie. Ich prídavkom sa môžu zlepšiť mechanické, biokompatibilné aj antibakteriálne vlastnosti chitozánových nanovláken [16].

2.2.1.3 Elektrospinning chitozánu s prídavkom anorganických nanočastíc

Vlákná tohto typu vykazujú jedinečné vlastnosti a vyhovujú špeciálnym potrebám. K. Sun a kol. uvádzajú, že je možné pripraviť nanovlákná chitozánu s prídavkom strieborných nanočastíc a ako rozpúšťadlo sa v tomto prípade používa PEO [16]. Ďalej vlákna s prídavkom nanočastíc oxidu titaničitého a PVA ako rozpúšťadla vykazujú antibakteriálne vlastnosti voči baktériám ako *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [16].

2.2.2 Želatína

Želatína je biodegradabilný, biokompatibilný, jedlý polymér, ktorý vzniká hydrolýzou kolagénu, prirodzene sa vyskytujúcom v ľudskom tele. Na rozdiel od iných polymérov, želatína poskytuje lepšie prostredie pre zachytenie, rast a proliferáciu buniek. Preto je dnes hojne využívaná na výrobu scaffoldov v tkanivovom inžinierstve. Na výrobu želatinových nanovláken sa používa elektrospinning [20]. Elektricky zvlákňované želatinové nanovlákná sú však rozpustné vo vode a majú zlú mechanickú pevnosť, preto sa často robia sieťovacie úpravy. Zosieťovanie sa môže realizovať fyzikálnymi procesmi, ako je sušenie, zahrievanie, elektrónový lúč a vystavenie UV žiareniu. Ďalšou možnosťou sú chemické úpravy pomocou sieťovacieho činidla, ako napríklad formaldehyd, glutaraldehyd, epoxidové zlúčeniny, karbodiimid, acylazid a transglutamináza. Na rozpustenie želatíny sa používajú organické kyseliny a fluorované alkoholy [14].

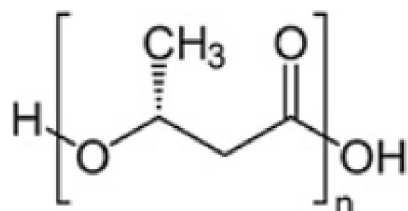


Obrázok 4: Štruktúra želatíny [21]

2.2.3 Polyhydroxybutyrát (PHB)

PHB patrí do triedy polyhydroxyalkanoátov a je tvorený z 3-hydroxybutyrátových monomérov spojených esterovou väzbou [22]. Je to netoxický, nerozpustný vo vode, biodegradabilný, biokompatibilný polymér, s fyzikálnymi vlastnosťami podobnými polypropylénu. Pripravuje sa bakteriálnou fermentáciou z baktérii *Bacillus megaterium* a je vhodný pre biomedicínske aplikácie. Dnes sa využíva u systémov s kontrolovaným uvoľňovaním liečiv, v tkanivovom inžinierstve a tiež u materiálov na náhradu kože. Nanovlákná PHB môžu byť pripravované

napríklad metódou elektrospinningu. *D. Correia a kol.* uvádzajú ako jednu z možností syntézu s použitím chloroformu a N,N-dimetylformamidu (DMF) ako rozpúšťadiel [23]. Chloroform má nízku dielektrickú konštantu a teplotu varu a dochádza tak k rýchlej kryštalizácii polyméru. Preto sa môže pridať ešte DMF s vyššou dielektrickou konštantou a nižšou prchavosťou. Výsledkom je teda stabilné a kontinuálne spracovanie vlákien [23].



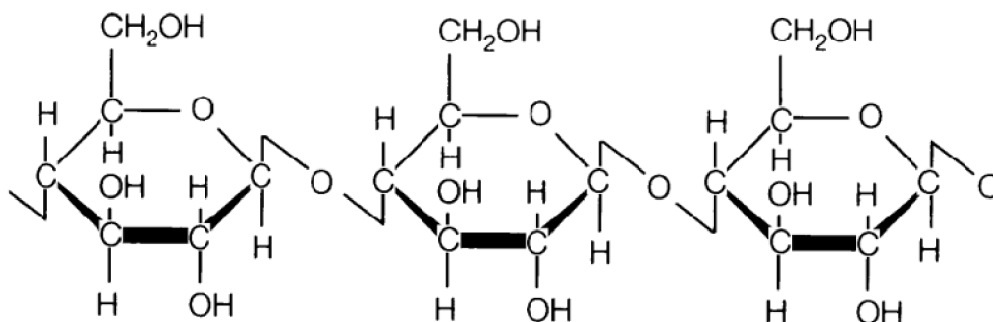
Obrázok 5: Štruktúra polyhydroxybutyrátu [22]

2.2.4 Celulóza

Celulóza patrí k najrozšírenejším biologicky odbúrateľným materiálom s vysokou pevnosťou. Ide o vo vode nerozpustný polysacharid, z ktorého je zložená bunková stena rastlín. Je tvorená z viac ako 1000 stavebných jednotiek β -1,4-D-glukopyranózy. Celulózu dokážeme chemickými alebo fyzikálnymi metódami extrahovať z rôznych prírodných zdrojov [14]. Využívajú sa štyri druhy celulózových nanomateriálov, a to celulózové nanovlákná (celulózové nanofibrily), celulózové nanokryštály, bakteriálna celulóza a elektricky zvlákňované celulózové nanovlákná [24].

Celulózové nanovlákná pripravené elektrospinnigom sú zvyčajne používané v kombinácii s iným polymérom. Sú vysoko porézne a prispôsobivé pre mnohé aplikácie [24].

Bakteriálnu celulózu (BC) syntetizuje baktéria *Acetobacter xylinum*. BC vykazuje vysokú biokompatibilitu, netoxicitu a má vysokú mechanickú pevnosť. Vlákna BC majú veľmi veľký povrch na jednotku hmotnosti. V kombinácii s ich hydrofilnosťou vedú tieto vlastnosti k vysokej kapacite pre nahromadenie kvapaliny. Nevýhodou BC je, že vykazuje iba slabé antibakteriálne, antioxidantné, vodivé a magnetické vlastnosti, čo obmedzuje jej použitie v biomedicíne. Jednou z možností je kombinácia BC s inými materiálmi ako sú uhlíkové nanorúrky. Ďalej derivát acetát celulózy má dobrú stabilitu a rozpustnosť v organických rozpúšťadlách. Selektívne dokáže absorbovať organické látky a toxíny. Jeho mechanické vlastnosti sú ale slabé [14].



Obrázok 6: Štruktúra celulózy [25]

2.3 Rozpúšťadlá pre zvlákňovanie

Výber rozpúšťadla je kľúčový pri formovaní nanovláknien pomocou elektrospinningu. Aby vznikli nanovlákná bez takzvaných koráliek, rozpúšťadlo by malo úplne rozpustiť polymér tak, aby vznikol homogénny roztok s miernou prchavosťou. Rozpúšťadlá by sa mali odparovať počas prechodu nanovlákná od ihly ku kolektoru. Vysoko prchavé rozpúšťadlá sa ale odparujú už pri hrote ihly a dochádza tak k jeho upchatiu. Je tiež vhodné vyhnúť sa neprchavým rozpúšťadlám, pretože by došlo k neúplnému vysušeniu nanovláknien a následnej tvorbe korálok. Ak sa použije zmes rozpúšťadiel, pričom jedno z nich nebude látku rozpúšťať a bude vytvárať dve fázy, vieme vytvoriť porézne nanovlákná. Ako príklad môžeme uviesť polystyrénové nanovlákná rozpustené v tetrahydrofuráne (THF) a dimetylformamide (DMF). THF je rozpúšťadlo s vysokou prchavosťou a DMF je menej prchavé rozpúšťadlo. THF vytvára vlákna s veľkou pórovitosťou a DMF tvorí hladké nanovlákná. Ak teda zvýšime percento DMF v roztoku, poklesne aj pórovitosť vlákien [26].

2.4 Nanočastice

Nanočastica je jednotka s rozmermi radovo v nanometroch s jedinečnými materiálovými vlastnosťami. Nanočastice (NČ) môžeme rozdeliť do niekoľkých kategórií v závislosti na ich chemickom zložení, morfológií aj veľkosti. NČ môžeme deliť buď na anorganické, kam patria kvantové bodky, fullerény a nanočastice zlata alebo organické – lipozómy, dendriméry a polymérne nanočastice. Iné delenie NČ je podľa toho či ide o častice na uhlíkovej báze, keramické, kovové alebo polymérne NČ [27].

Aby sa zlepšila biologická aktivita liečiv a iných aktívnych látok, bol navrhnutý proces enkapsulácie do nanočastíc. Enkapsulácia liečiv umožňuje zlepšenie ich rozpustnosti, predchádzanie predčasnej degradácie liečiv a tiež nežiadúcim interakciám. Tohto procesu je využívané najmä u liekov s krátkym polčasom rozpadu, liekov s nízkou rozpustnosťou či s variabilnou absorpciou. Využívajú sa k tomu syntetické alebo prírodné polymérne nosiče. Tieto nanosystémy vykazujú vysokú biokompatibilitu a biodegradabilitu. Polymérne nosiče môžu dodávať liečivo na miesto určenia buď difúziou alebo osmotickými, degradačnými či eróznymi procesmi [28].

Enkapsulácia do nanočastíc si našla svoje využitie nielen vo farmaceutickom, ale aj v kozmetickom priemysle. Nanoenkapsulácia dokáže zlepšiť penetráciu aktívnych látok do pokožky, ochranu proti UV žiareniu, stabilitu prenášanej látky, antioxidačné účinky a tiež celkovú kvalitu produktu. Takto upravené aktívne látky v kozmetike vykazujú aj synergistický efekt s ostatnými zložkami a zlepšujú účinnosť kozmetických výrobkov. Ako príklad môžeme uviesť fenolické zlúčeniny. Ide o látky s antioxidačnými, antimikrobiálnymi a protizápalovými vlastnosťami. Problémom je, že pri extrakcii nie sú stabilné a často podliehajú degradácii. Ďalej nie sú dobre rozpustné vo vode a rýchlo metabolizujú. Preto sa využíva enkapsulácia fenolov do nanonosičov, ako sú napríklad lipozómy [2].

2.4.1 Polymérne nanočastice

Polymérne nanočastice sú klasifikované ako tuhé koloidné častice s rozmermi od 10 do 1000 nm [29]. Zvyčajne ide o ľahko funkcionalizovateľné, organické NČ v tvare

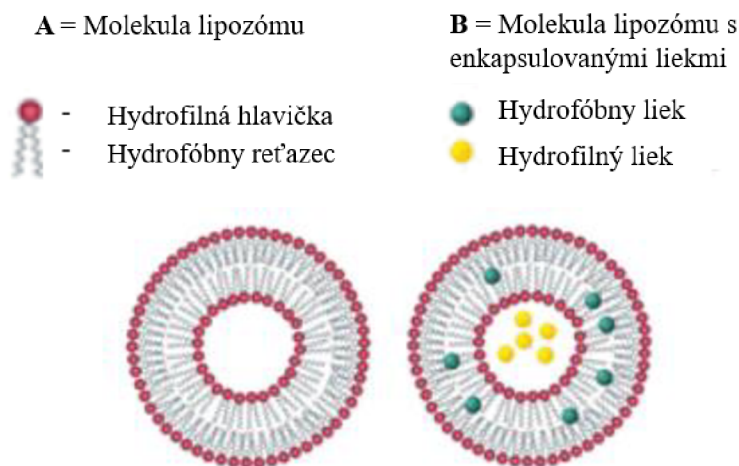
nanogulôčok alebo nanokapsulí. Nanokapsule sú vezikulárne systémy, kedy je liečivo uzavreté v dutine obklopanej polymérnou membránou. Zatiaľ čo v nanogulôčkach je liečivo rovnomerne dispergované [27]. Polymér poskytuje prenášanej látke ochranu. Výhodou polymérov pri príprave NČ je aj zachovanie stability prchavých zlúčenín či schopnosť udržiavať vysoké koncentrácie enkapsulovaných látok. Navyše je výroba NČ z polymérov aj ekologická a bezpečná pre životné prostredie [29].

2.4.1.1 Lipozómy

Lipozómy sú štruktúry guľovitého tvaru s dvojvrstvou fosfolipidov, ktorej veľkosť je v rozmedzí od 20 – 1000 nm, vznikajúce vo vodnom prostredí. Z fosfolipidov tvoriacich lipozóm sú to napríklad fosfatidylcholíny, fosfatidylseríny, fosfatidylglyceroly, fosfatidyletanolamíny a ďalej je tiež využívaný cholesterol ako stabilizátor.

Ide o všestranné materiály, ktoré dokážu transportovať ako aj hydrofóbne, tak aj hydrofilné látky, zahŕňajúc nukleové kyseliny, proteíny aj malé molekuly. Vďaka svojej schopnosti kontrolované prenášať liečivo na presné miesto a v určitom čase sú lipozómy využívané aj pri liečbe rôznych chorôb. Hydrofilné liečivá sú prenášané vo vodnom prostredí, ktoré tvorí vnútro lipozómu a naopak hydrofóbne liečivá sú zachytené medzi vrstvami fosfolipidov, kde sa nachádzajú uhlíkové reťazce lipidovej vrstvy.

Štruktúra lipozómov závisí od spôsobu ich prípravy. Ich veľkosť je možné merať niekoľkými metódami ako sú dynamický rozptyl svetla, mikroskopia či vylučovacia chromatografia. Lipozómy môžu byť nabité buď kladne, negatívne alebo zwitteriónovo – majú na povrchu oba náboje. Povrchový náboj častice vyjadruje zeta potenciál. Ak je zeta potenciál menší ako -30 mV alebo väčší ako $+30$ mV, ide o stabilné častice [30].



Obrázok 7: Štruktúra lipozómov a enkapsulácia liekov do hydrofóbnej a hydrofilnej časti lipozómu [30]

2.4.2 Príprava polymérnych nanočastíc

Všeobecne existujú dva prístupy, ktorými je možné pripraviť nanočastice, a to top – down a bottom – up. Top – down funguje na princípe rozkladania väčších molekúl na menšie časti, ktoré môžeme následne využiť k syntéze nanočastíc. Bottom – up zahŕňa zostavovanie väčších častíc z menších. Takto je možné pripraviť lipozómy, micely, polymérne nanočastice

alebo dendriméry. Sily pôsobiace pri tomto zostavovaní sú hlavne van der Waalsovú, Coulombické, hydrofóbne a stérické sily [31].

Polymérne nanočastice môžeme pripraviť buď polymerizáciou alebo z predom vytvoreného polyméru. Využíva sa k tomu niekoľko metód v závislosti od požiadaviek prenášanej látky, a to vysolovanie, ultrazvuk (sonifikácia), dialýza odparovaním rozpúšťadla, homogenizácia za tepla a studena, sušenie rozprašovaním, vysokošmyková homogenizácia, príprava na báze mikroemulzií, metóda odparovaním rozpúšťadla a ďalšie [32].

2.4.2.1 Sonifikácia

Sonifikačná metóda prípravy lipozómov spočíva v aplikácii vysokého ultrazvukového vstupu na roztok lipozómov. Metóda je založená na kavitácií, kedy sa vytvára a následne zaniká, v kvapaline hydrodynamická dutina pri prudkom poklese okolitého tlaku. Pri príprave lipozómov z roztoku sa používajú dve sonifikačné techniky. Buď sa lipozómy sonifikujú sonikátorom kúpeľového typu alebo sonikátorom so sondou.

Pri metóde prípravy, ktorá využíva sonifikačnú sondu sa hrot sonifikátora ponorí do roztoku. Roztok je potrebné súčasne chladieť, aby nedošlo k degradácii lipozómov, vplyvom veľkého vstupu energie. Je častejšie využívaná pre malé objemy roztokov. Hlavnou nevýhodou tejto techniky je, že môže dôjsť k uvoľňovaniu kovových častíc z hrotu sonifikátora a to vedie ku kontaminácii pripravovaného roztoku. Ako ďalšiu nevýhodu môžeme uviesť, že v prípade ak sonifikácia prebieha viac ako hodinu môže dochádzať k deesterifikácii lipozómov.

Sonifikácia v kúpeli sa používa pre väčšie objemy roztokov. Lipozómová disperzia je umiestená do kúpeľového sonifikátora. Môže byť chránená pod inertnou atmosférou alebo v sterilnej nádobe. U tejto metódy je však dosahované nižšej miery enkapsulácie, dochádza k degradácii fosfolipidov a výsledkom sú lipozómy s vysokou polydisperzitou [33].

2.5 Mikrobióm pokožky

Kožný mikrobióm tvorí akúsi bariéru pokožky, ktorá prispieva k jej homeostáze. Kožnú mikroflóru tvoria komenzálne baktérie, huby, vírusy aj roztoče. Táto ochranná sieť hrá dôležitú rolu pri ochrane pred potencionálnymi patogénmi, a to tak že produkuje antimikrobiálne peptidy, komenzálne baktérie a huby rodu *Malassezia*, ktoré inhibujú mnohé kvasinky a plesne [34]. Narušenie kožného mikrobiómu často vedie k bežným kožným ochoreniam ako je akné či atopická dermatitída [35].

2.5.1 Baktérie

Na základe analýzy sekvenovania génov bolo zistených na pokožke niekoľko rodov baktérií. Prevládajú tu grampozitívne baktérie rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enhydrococcus*, *Micrococcus* a *Cutibacterium*. Z gramnegatívnych baktérií to sú najmä baktérie rodu *Actinobacter* [34].

2.5.1.1 *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) v minulosti nazývané aj *Propionibacterium acnes*, je striktno anaeróbná, gram-pozitívna baktéria, ktorá je súčasťou komenzálnej flóry kože. Vyskytuje sa prevažne v mazových žľazách a predstavuje 20 – 70 % mikroflóry [36]. Pri premnožení *C. acnes* dochádza k nerovnováhe kožnej mikroflóry a ide o najčastejšiu príčinu tvorby

akné [35]. *C. acnes* je zapuzdrená vo vnútri kožných žliaz a tiež produkuje biofilm odolný voči antibiotikám, čo komplikuje pôsobenie antiseptických a antibiotických látok [37].

2.5.1.1.1 *Acne vulgaris*

Acne vulgaris je kožné ochorenie, ktoré vzniká, ak sa vlasové folikuly upchajú lipidmi a odumretými kožnými bunkami [35]. *C. acnes*, ktorý osídľuje lézie, tiež prispieva k zápalu metabolizovaním kožného mazu za vzniku dráždivých mastných kyselín, ako je kyselina propiónová. Sekrécia kožného mazu je pod hormonálnou kontrolou a výrazne sa zvyšuje v puberte. Potom pokračuje vo zvýšenej miere až do pokročilého dospelého života. *Acne vulgaris* sa vyskytuje na tvári, ramenách a hornej časti trupu dospievajúcich. Charakteristickým znakom *acne vulgaris* je komedón, bežne známy ako čierna bodka. Postihnuté oblasti kože tiež vykazujú zapálené papuly, pustuly a cysty [38].

2.5.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) inak nazývaný aj zlatý stafylokok je gram-pozitívna baktéria, ktorá má tvar kokov. Má tendenciu byť usporiadaná do zhlukov, ktoré sa označujú ako „hroznové“. Prirodzene sa vyskytuje na pokožke a za normálnych podmienok nespôsobuje infekciu na zdravej koži. Ak sa ale dostane do krvného obehu alebo vnútorných tkanív, táto baktéria môže spôsobiť závažné infekcie [39]. Typickými prejavmi sú ekzém alebo atopická dermatitída. Ide o ochorenie kože charakterizované začervenaním, opuchom, šupinatosťou a svrbením [40].

2.5.1.3 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) je grampozitívna, fakultatívne anaerobná, koková baktéria, ktorá tvorí strapce. V jej prirodzenom prostredí ako je ľudská koža a sliznica je zvyčajne neškodná. Táto baktéria je takzvaná nemocničná baktéria. To znamená, že ak má pacient zavedený katéter, môže sa *Staphylococcus epidermidis* dostať z kože do krvi, a taktiež môže byť prenesený aj zdravotníckymi pomôckami. Vznikajú tak zápaly, erytrém, hnisavé a bolestivé miesta v okolí miesta infekcie. Spôsobuje aj infekčnú endokarditídu a nakazení pacienti trpia horúčkou, zimnicou, malátnosťou a dýchavičnosťou [41].

2.5.1.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegatívna, pohyblivá, fakultatívne anaeróbna, tyčinkovitá baktéria, ktorá sa prirodzene vyskytuje v hrubom čreve u ľudí aj živočíchov [42]. Táto baktéria iba zriedka spôsobuje ochorenia, môže sa tak ale stať v prípade pacientov so zníženou imunitou alebo pri porušení membrány tráviaceho traktu [43]. Najčastejšie k nákaze dochádza v nemocnici a môže spôsobiť infekcie močových ciest, brušné infekcie, infekcie krvného riečiska a ďalšie [42].

2.5.2 Vírusy

V rámci vírusov prevládajú na pokožke bakteriofágy, ktoré sa svojou lytickou aktivitou podieľajú na modulácii baktérií a prispievajú tak k homeostáze kožnej mikroflóry [44].

2.5.3 Huby a roztoče

Najčastejšie izolovanými druhmi húb z pokožky sú kvasinky rodu *Malassezia*, ktoré sa vyskytujú najmä v mazových oblastiach. Roztoče ako *Demodex folliculorum* a *Demodex brevis* sú mikroskopické článkonožce, ktoré sa tiež považujú za súčasť normálnej kožnej mikroflóry [44].

2.5.3.1 Rod *Malassezia*

Kvasinky *Malassezia* sú prirodzenou súčasťou kožného mikrobiómu, ale ako aj ostatné zložky mikroflóry môžu byť považované za patogény, pretože za priaznivých okolností môžu spôsobiť rôzne kožné ochorenia. Druhy *Malassezia globosa*, *Malassezia prohibita* a *Malassezia furfur* sú najčastejšie druhy zodpovedné za choroby kože u ľudí. Spôsobujú ochorenia ako pityriasis versicolor, folikulitídu *Malassezia*, seboroickú dermatitídu a lupiny, ale podieľajú sa aj na atopickej dermatitíde, psoriáze a ďalších kožných ochoreniach [45]. Kvasinky rodu *Malassezia* sa tiež podieľajú na patogenéze akné [46].

2.6 Antimikrobiálny účinok

Antimikrobiálna aktivita sa zaoberá procesmi usmrtenia alebo inhibície rastu mikróbov, ktoré spôsobujú ochorenia. Využívajú sa k tomu antimikrobiálne látky, ktoré majú antibakteriálne, antivírusové alebo antimykotické účinky [47].

Antimikrobiálne látky sú buď syntetické, produkty metabolizmu mikroorganizmov alebo látky rastlinného pôvodu. Ich mechanizmus účinku je špecifický v závislosti na tom ako interagujú s mikroorganizmom. Niektoré antimikrobiálne látky blokujú syntézu bunkovej steny, iné replikáciu DNA, proteosyntézu alebo interagujú s cytoplazmatickou membránou mikroorganizmu, kedy dochádza k uvoľneniu bunkového obsahu do prostredia [48].

2.6.1 Parabény

Parabény, estery kyseliny p-hydroxybenzoovej, sú lacné, širokospektrálne antimikrobiálne a antiseptické konzervačné látky [49]. Sú veľmi často používané v kozmetickom, potravinárskom aj farmaceutickom priemysle. Ich antimikrobiálna aktivita sa zvyšuje s dĺžkou alkylového reťazca a využívajú sa najčastejšie parabény od methyl- po n-butylparabén. Taktiež záleží na rozvetvení reťazca, pretože parabény s rozvetveným reťazcom sú účinnejšie ako parabény s lineárnym reťazcom. V kozmetike je povolené iba určité percento parabénov. Môžu totiž spôsobiť alergické reakcie, kontaktnú dermatitídu, vykazujú estrogénnu aktivitu a sú spojené aj s rakovinou prsníka. Parabény sú schopné rýchlej absorpcie cez pokožku do telových tekutín a ich penetráciu zvyšujú aj látky ako etanol a metanol, často prítomné v kozmetických produktoch. Rozsah penetrácie závisí od vlastností parabénu (rozpustnosť, lipofilita) ako aj od zloženia prípravku. Percento parabénu preniknutého cez kožu sa znižuje v poradí metylparabén, etylparabén, propylparabén, v súlade so znižujúcou sa rozpustnosťou a zvyšujúcou sa lipofilitou [50]. Na druhú stranu majú ale parabény s dlhším a rozvetveným reťazcom vyššiu toxicitu a narušajú endokrinný systém viac ako parabény lineárne a nerozvetvené. Izobutylparabén, izopropylparabén, benzylparabén, fenylparabén a pentylparabén sú v Európe dokonca zakázané. Používanie parabénov s krátkym reťazcom je v Európe obmedzené na 0,4 % z celkovej hmotnosti produktu a parabénov s dlhým reťazcom na 0,19 % [49].

2.6.2 Benzoylperoxid

Benzoylperoxid je v kozmetike jedným z najefektívnejších lokálnych prostriedkov proti akné [51]. Má komedolytické a protizápalové účinky proti baktérii *Cutibacterium acnes*. Jeho mechanizmus účinku je rozrušenie bunkovej steny baktérií. Ukázalo sa tiež, že benzoylperoxid je rýchly a účinný aj proti ďalším baktériám a hubám, spôsobujúcim kožné ochorenia. Benzoylperoxid sa však pri atopickej dermatitíde alebo psoriáze nesmie používať, pretože spôsobuje podráždenie kože a počas užívania tohto liečiva sa môže objaviť erytém, teda začervenanie kože alebo vyrážka [46]. Benzoylperoxid tiež zlepšuje účinok antibiotík a znižuje mieru rezistencie na antibiotiká. Preto sa odporúča používať benzoylperoxid v kombinácii s lokálnymi alebo perorálnymi antibiotikami. Medzi jeho negatívne stránky patrí podráždenie pokožky, vrátane vysušenia a olupovania kože, svrbenie, pálenie a začervenanie. Dokáže odfarbiť vlasy a oblečenie [51].

2.6.3 Prírodné látky s antimikrobiálnym účinkom

Rastliny boli kedysi hlavný zdroj a základ všetkých kozmetických prípravkov, dávno predtým než boli objavené metódy syntézy látok s podobnými vlastnosťami [40]. Dnes môžeme pozorovať v kozmetickom a farmaceutickom priemysle rastúci záujem o nahradenie syntetických antimikrobiálnych látok vo výrobkoch za prírodné. Prírodné antimikrobiálne látky sú okrem iného aj ekologicky šetrnejšie [4].

Hlavné antimikrobiálne látky rastlinného pôvodu sú fenoly, ktoré zahŕňajú terpény, alifatické alkoholy, aldehydy, ketóny, kyseliny a izoflavonoidy [52]. Fenoly interagujú s bunkovou membránou alebo bunkovou stenou mikroorganizmu, čo vedie k zmenám v permeabilite membrány, inaktivácii enzýmov, poškodeniu DNA a k následnej deštrukcii buniek patogénov [4; 53]. Antimikrobiálne zložky rastlinných materiálov sa vyskytujú v bylinkách a koreninách (rozmarín, šalvia, bazalka, oregáno, tymián, kardamón a klinček), ovocí a zelenine (guava, kapusta, cesnak, cibuľa, citrusy) či semenách a listoch (hroznové semená, fenikel, muškátový oriešok, petržlen a olivové listy) [52].

2.6.3.1 Tymol

Tymol (2-isopropyl-5-methylfenol) je jednou z hlavných zložiek tymiánu [54]. Tymián obsahuje vysoké množstvo flavonoidov, fenolových kyselín, terpenoidov a glykozidov [55]. Tymol bol prvýkrát extrahovaný v roku 1719 Casparom Neumannom. Vytvára bezfarebné kryštály, s korenisto-bylinnou vôňou [54]. Je rozpustný v alkoholoch a organických rozpúšťadlách, ale len málo rozpustný vo vode. [55]. V súčasnej dobe je využívaný vo farmácii, potravinárstve a tiež v kozmetickom priemysle. Tymol vykazuje antimikrobiálne, antioxidantné aj protizápalové účinky. Má široké antibakteriálne spektrum, zahŕňajúce ako aj grampozitívne, tak aj gramnegatívne baktérie. Antioxidantné účinky tymolu súvisia s jeho fenolickou štruktúrou, ktorá dokáže adsorbovať a neutralizovať voľné radikály [54]. Je často využívaný v zubnom lekárstve na liečbu infekcií ústnej dutiny, kvôli svojim antimikrobiálnym účinkom. Tymol sa všeobecne považuje za bezpečný so zanedbateľnou toxicitou [55].

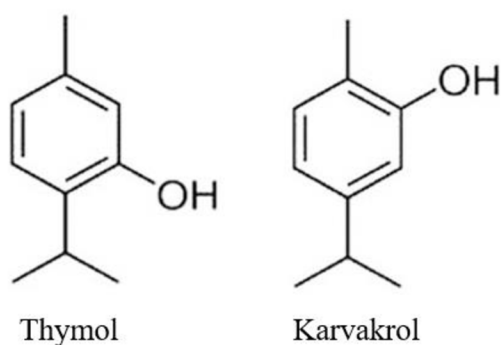


Obrázok 8: Tymián [56]

2.6.3.2 Karvakrol

Karvakrol (5-isopropyl-2-methylfenol) je tekutý fenolický monotерpenoid, ktorý sa vyskytuje v silici oregána, tymiánu, bergamotu a ďalších rastlín. Ide o izomér tymolu a taktiež vykazuje antimikrobiálnu, antioxidačnú, protizápalovú aj protirakovinovú aktivitu [57]. Obsah karvakrolu v tymiáne je však značne nižší ako obsah tymolu [58]. Antimikrobiálna aktivita karvakrolu je vyššia ako u iných prchavých zlúčenín v dôsledku voľnej hydroxylovej skupiny, fenolovej skupiny a jeho hydrofóbnosti. Má vysoký inhibičný účinok proti grampozitívnym aj gramnegatívnym baktériám. Je obzvlášť účinný najmä voči potravinovým patogénom ako sú *E. coli*, *Salmonella* či *Bacillus cereus*. Ďalej vykazuje antimikrobiálnu aktivitu voči baktériám *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a taktiež voči rôznym druhom plesní. Karvakrol je nerozpustný vo vode, ale obzvlášť rozpustný v etanole, acetóne a dietyléteri.

Karvakrol a tiež tymol dokážu interferovať s lipidovou dvojvrstvou cytoplazmatickej membrány, čo spôsobí stratu jej integrity, zvýši jej permeabilitu a tekutosť. To vedie k úniku iónov, nukleových kyselín aj ATP z bunky baktérií, teda k takzvanej lýze buniek [57]. Naočkovaním karvakrolu reakciou Schiffovej bázy na nanočastice chitozánu dokážeme zlepšiť jeho antioxidačné a antimikrobiálne účinky. Enkapsuláciou do lipozómov vieme vyriešiť problém s lipofilitou karvakrolu a podporiť jeho biologickú aktivitu [59].

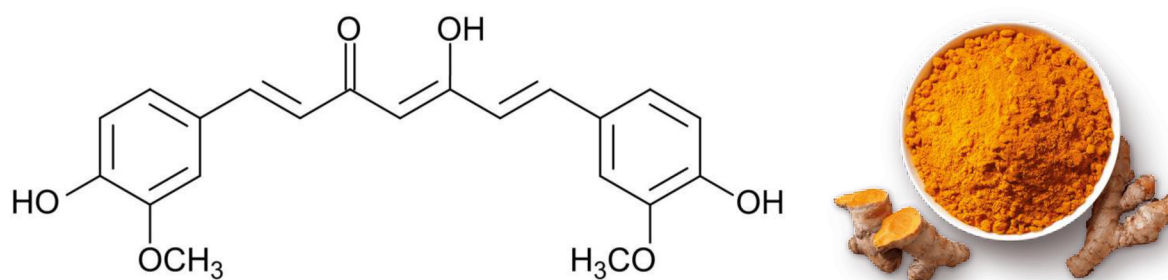


Obrázok 9: Porovnanie štruktúr izomérov tymolu a karvakrolu (vľavo) a oregano (vpravo) [60; 61]

2.6.3.3 Kurkumín

Kurkumín (diferuloylmetán) je polyfenol izolovaný z podzemku rastliny *Curcuma longa*, teda u nás známa ako kurkuma [62]. Ide o dimérny derivát kyseliny ferulovej, ktorý je zložený z dvoch o-methoxyfenolových kruhov spojených heptadiéndiónovým reťazcom. Je to lipofilná látka s charakteristickou sýtou žlto-oranžovou farbou [63]. Má veľkú rozmanitosť

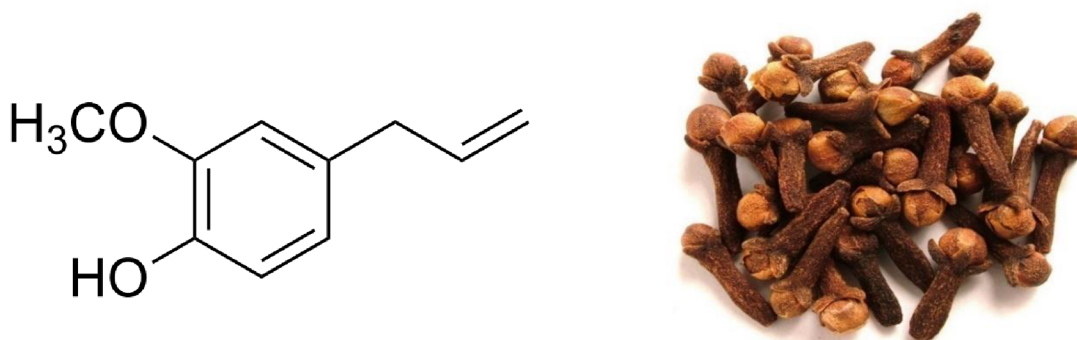
farmakologických aktivít, ako sú antibakteriálne, antioxidačné, antiparazitické aj anti-HIV účinky. Používa sa aj na prevenciu, liečbu alebo kontrolu psoriázy a iných kožných ochorení ako napríklad akné, popáleniny, ekzémy, poškodenie pokožky slnkom a predčasné starnutie v dôsledku inhibície aktivity enzýmu fosforylázo-kináza [40]. Štúdie ukázali, že kurkumín je účinný voči niekoľkým ľudským patogénom, vrátane baktérií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. Kurkumín vykazuje antimikrobiálnu aktivitu voči *Staphylococcus aureus* a má synergistický účinok s rôznymi antibiotikami ako oxacilín, ampicilín, amikacín, norflocacín a ďalšie. Kurkumín je účinný aj proti baktériám *Streptococcus pyogenes*, ktoré spôsobujú okrem iného aj ochorenia kože ako sú impetigo, spôsobujúce hnisavé pupienky na koži, či erysipel, čiže zápal kože a podkožia [62; 64].



Obrázok 10: Štruktúra kurkumínu (vľavo) a kurkuma (vpravo) [65; 66]

2.6.3.4 Eugenol

Eugenol (2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)fenol) je organická zlúčenina s príjemnou korenistou vôňou, zvyčajne sa vyskytuje vo forme svetlo žltej olejovitej kvapaliny. Má dobrú rozpustnosť v organických rozpúšťadlách, vo vode je však len mierne rozpustný. Ide o prchavú látku s nízkou stabilitou, je citlivý na oxidácie a chemické interakcie. Eugenol bol prvýkrát izolovaný v roku 1929 z klinčeka (*Eugenia caryophyllata*), podľa ktorého bol aj pomenovaný. Ďalšími významnými zdrojmi eugenolu sú škoricca, bobkový list či muškátový oriešok [67]. V súčasnosti sa využíva na výrobu parfumov, ústnych vôd, kozmetiky, indonézskeho klinčekového cigariet a aj ako medziprodukt pri výrobe vanilínu. Ďalej v kombinácii s oxidom zinočnatým tvorí zmes pre zubné výplne a využitie si našiel taktiež pri výrobe biofungicídov a bioinsekticídov. Eugenol je známy pre svoje antiseptické, anestetické, analgetické, antimikrobiálne či protizápalové účinky [68].



Obrázok 11: Štruktúra eugenolu (vľavo) a klinček (vpravo) [69; 70]

2.6.3.5 *Spirulina*

Spirulina (Spirulina platensis) je modrozelená, jedlá, mikroskopická, fototrofná sinica z čeľade *Cyanophyta*. Obsahuje množstvo vitamínov, minerálov, polynenasytených mastných kyselín a proteínov. Extrakty zo spiruliny vykazujú pozoruhodné vlastnosti ako sú prevencia proti rakovine, zníženie krvného cholesterolu, stimuluje imunitný systém a poskytuje ochranu voči slnečnému žiareniu. Tieto vlastnosti sú pripisované jej zložkám ako fenoly, karotenoidy, sulfátové polysacharidy spirulány a polynenasytené mastné kyseliny. *Spirulina* ako aj mnoho iných druhov siníc má potenciál produkovať veľké množstvo antimikrobiálnych látok proti baktériám a hubám. Poskytuje nám teda veľa možností pre jej využitie v kozmetických a farmaceutických výrobkoch. Preukázal sa jej účinok voči niekoľkým baktériám a tiež hubám, ktoré spôsobujú kožné a iné ochorenia [71]. Potenciálne sekundárne metabolity, ako je benzofenón, dihydro-metyl-fenylakridín, kyselina karbanilová, dinitrobenzoát, propándiamín, izochinolín, piperidín, oxazolidín a pyrolidín, boli preukázané ako účinné voči grampozitívnym a aj gramnegatívnym baktériám [72]. Minimálna inhibičná koncentrácia spirulliny však závisí na použitom rozpúšťadle a druhu mikroorganizmu.

Pri príprave extraktov sa *spirulina* rozomelie na prášok a následne sa aktívne látky extrahujú do rozpúšťadla. Ako rozpúšťadlo môžeme použiť metanol, etanol, acetón, hexán či petroléter a roztoky sú ďalej extrahované Soxhletovým extraktorom, až kým nevznikne číry roztok [71]. *A. Moneim a kol.* zvädzajú, že metanolový extrakt mal vyšší celkový obsah fenolov, antimikrobiálnu aktivitu a antioxidačnú aktivitu v porovnaní s ostatnými extraktmi [73]. Výťažky zo spiruliny boli účinné napríklad voči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* aj *Candida glabrata* [71].



Obrázok 12: *Spirullina* [74]

2.6.4 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Pre porovnanie výsledkov a stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie je nutné poznať antimikrobiálnu aktivitu účinných látok. Najčastejšie metódy využívané na toto stanovenie sú disková – difúzna metóda a dilučná – bujónová metóda [75]. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) je definovaná ako najnižšia koncentrácia aktívnej látky, ktorá inhibuje viditeľný rast mikroorganizmov počas inkubácie [76].

2.6.4.1 Disková difuzná metóda

Agarové platne s vhodným médiom sú naočkované kultúrou, na ktorú sú následne ukladané disky z filtračného papiera nasiaknuté aktívnou látkou. Inhibícia rastu ale nutne neznamená smrť mikroorganizmu, a preto sa touto metódou nedajú rozlíšiť baktericídne a bakteriostatické účinky. Nie je tiež možné určiť presne MIC ani presne kvantifikovať množstvo aktívnej látky, ktoré difundovalo do agaru. Výhodami tejto metódy sú jednoduchosť prevedenia a nízke náklady, je teda vhodná pre skrínigové štúdie [75].

2.6.4.2 Bujónová dilučná metóda

Dilučné metódy patria k najvhodnejším k stanoveniu hodnôt MIC. Bujónová dilučná metóda prebieha v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, pričom potrebujeme štandardizovať mikrobiálnu suspenziu pomocou 0,5 McFarlandovej stupnice. Po dôkladnom premiešaní kultúry a aktívnej látky na doštičke sa za vhodných podmienok mikroorganizmus kultivuje. Následne sa spektrofotometricky stanoví MIC na základe zmeny zákalu. Zákal indikuje nárast kultúry. Najväčšou nevýhodou tejto metódy je dĺžka prevedenia experimentu [75].

2.6.5 Resazurínový test

Resazurínový test alebo test Almar Blue sa využíva na stanovenie životaschopností buniek baktérií. Živé bunky dokážu nefluorescenčné farbivo resazurín redukovať na fluorescenčne aktívny rezorufín, za pomoci mitochondriálnej reductázy. Úroveň fluorescencie je teda závislá na počte životaschopných buniek. Táto metóda je pre bunky netoxická [77].

3 CIELE PRÁCE

Cieľom tejto bakalárskej práce je príprava nanomateriálov s antimikrobiálnym účinkom a ich možnosti využitia v kozmetike. Súčasťou práce je dosiahnutie týchto čiastkových cieľov:

- 1) Spísanie literárnej rešerše zameranej na prírodné antimikrobiálne látky, metódy prípravy a charakterizácie nanočastíc a nanovlákien a materiály pre ich syntézu
- 2) Optimalizácia prípravy nanovlákien z biopolymérov pomocou forcespinningu
- 3) Funkcionalizácia nanovlákien a nanočastíc antimikrobiálnymi látkami, a to tymolom a karvakrolom
- 4) Testovanie antimikrobiálnej aktivity pripravených produktov na mikrobiálnych bunkách

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité prístroje a pomôcky

- Analytické váhy, Ohaus (Čína)
- Automatické pipety o rôznom objeme, Discovery (Nemecko)
- Centrifúga MiniSpin, Eppendorf (Nemecko)
- ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (Nemecko)
- Laminárny box AURA MINI, BioAir Instruments (USA)
- Magnetická miešačka, Lavat (Česká republika)
- Mc Farland Standard Set
- Rotačný zvlákňovací prístroj (prototyp)
- Spektrofotometer, VWR Collection
- Temperovaná trepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (Česká republika)
- Ultrazvukový homogenizátor, Badelin Sonopuls, Sonerex Technik (Nemecko)
- Vortex, Ohaus (Čína)
- Zetasizer Nano ZS, Malvern (Veľká Británia)

4.2 Použité chemikálie

4.2.1 Chemikálie použité pre stanovenia

- 2,2-azinobis(3-ethylbenzothioazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Etanol UV-VIS, Penta (Česká republika)
- Folin-Ciocalteuov reagent, VWR Chemicals BDH (Francúzsko)
- Chlorid sodný, Penta (Česká republika)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Resazurín, Acros Organics (Čína)
- Uhličitan sodný, Lach-Ner (Česká republika)

4.2.2 Chemikálie použité pre prípravu nanovlákien

- Chitosan, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Chloroform, VWR Chemicals BDH (USA)
- Kyselina mravčia, VWR Chemicals BDH (USA)
- Polyamid, Sigma-Aldrich (Švajčiarsko)
- Polyhydroxybutyrát, VWR Chemicals BDH (USA)

4.2.3 Chemikálie použité pre prípravu nanočastíc

- Cholesterol, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- L- α -fosfatidylcholín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Polyhydroxybutyrát, VWR Chemicals BDH (USA)

4.2.4 Chemikálie použité pri kultivácii mikroorganizmov

- BHI médium, Himedia (India)
- LB médium, Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.3 Použité mikroorganizmy

Na testovanie antimikrobiálnej aktivity boli použité tri bakteriálne kmene, ktoré pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne:

- *Cutibacterium acnes* (CCM 3437)
- *Escherichia coli* (CCM 7395)
- *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418)

4.4 Použité štandardné aktívne látky

- Eugenol, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Karvakrol, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Tymol, Sigma-Aldrich (Nemecko)



Obrázok 13: Aktívne látky použité v práci

4.5 Charakterizácia aktívnych látok

Aktívne látky boli charakterizované z hľadiska ich antioxidačnej aktivity a tiež obsahu polyfenolov. Boli taktiež stanovené absorpčné maximá látok a boli vyhotovené kalibračné krivky aktívnych látok.

4.5.1 Stanovenie absorpčného maxima a zostavenie kalibračných kriviek účinných látok

Spektrofotometricky bolo stanovené absorpčné spektrum v rozmedzí vlnových dĺžok 200 – 400 nm u tymolu, karvakrolu aj eugenolu. Všetky aktívne látky boli rozpustené v chloroforme. Z grafu boli následne odčítané absorpčné maximá týchto látok.

Následne sme zostavili kalibračnú krivku tymolu rozpusteného v chloroforme. Použili sme rozmedzie koncentrácií 5,0 – 60,0 $\mu\text{g/ml}$. Meranie prebiehalo spektrofotometricky pri absorpčnom maxime tejto látky, a to 275 nm. V rozmedzí koncentrácií 2,5 – 60,0 $\mu\text{g/ml}$ bola

zostavená tiež kalibračná krivka karvakrolu rozpusteného v chloroforme pri 274 nm. U eugenolu boli použité koncentrácie 5,0 – 50,0 µg/ml a meranie prebiehalo pri 280 nm.

4.5.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity vybraných aktívnych látok pomocou ABTS^{•+}

Táto metóda je založená na schopnosti antioxidačnej látky zhášať kation-radikál 2,2 - azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) teda ABTS^{•+}. Pre zhotovenie kalibračnej krivky sa v tomto prípade využíva Trolox. ABTS bolo rozpustené v destilovanej vode tak, aby bola dosiahnutá koncentrácia roztoku 7 mM. Následne bolo pridaných 2,45 mM peroxidisíranu draselného a roztok bol ponechaný v tme na 12 hodín pri laboratórnej teplote. Po uplynutí potrebného času sa roztok ABTS^{•+} zriedil etanolom pre UV/VIS na absorbanciu $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm proti etanolu UV/VIS. Ďalej bolo napipetovaných 1 ml zriedeného ABTS^{•+} a 10 µl DMSO a zmeraná absorbancia v čase 0 (A_0). Do ďalšej kvety sme napipetovali 1 ml ABTS^{•+} a 10 µl extraktu vzorky, vzorka bola premiešaná a ponechaná v tme na 10 minút. Následne bol zmeraný pokles absorbancie u tejto vzorky (A_{10}). Pre stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity bol vypočítaný rozdiel hodnôt $A_0 - A_{10}$, ktorý sme dosadili do kalibračnej závislosti Troloxu (40-400 µl/ml) rozpusteného v 60% etanole. Rovnica zhotovenej kalibračnej krivky je $y = 1,2868x$.

4.5.3 Stanovenie celkových polyfenolov vybraných aktívnych látok

K stanoveniu celkových polyfenolov sa využíva reakcia Folin-Ciocalteuovho činidla s polyfenolmi, pričom vzniká modré sfarbenie. Absorbancia roztokov je následne zmeraná spektrofotometricky. Pre získanie kalibračnej závislosti bola využitá kyselina gallová v koncentračnom rozmedzí 0,1 až 0,5 mg/ml. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 750 nm proti slepej vzorke. Najprv bol pripravený roztok Folin – Ciocalteuova činidla, ktorý sme nariadili destilovanou vodou v pomere 1:9. Následne bolo 7,5 g uhličitanu sodného rozpustených v 95 ml vody. Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml zriedeného Folin – Ciocalteuovho činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 µl vzorky rozpustenej v DMSO. Skúmavka so vzorkou bola premiešaná a po 5 minútach bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku Na_2CO_3 . Po ďalších 15 minútach stávia roztoku bola zmeraná absorbancia roztokov. Slepá vzorka bola pripravená rovnakým spôsobom, ale namiesto 100 µl vzorky bolo použitých 100 µl destilovanej vody. Hodnoty obsahu polyfenolov boli vypočítané z kalibračnej rovnice kyseliny gallovej ($y = 2,3905x$).

4.6 Príprava PHB nanovlákiem metódou forcespinningu

Nanovlákná boli pripravené pomocou rotačného zvlákňovacieho prístroja. Na syntézu týchto nanovlákiem bol používaný polyhydroxybutyrát (PHB). Ako prvý bol pripravený 4% roztok PHB. PHB bolo rozpustené v chloroforme za stáleho miešania na magnetickej miešačke pri 100 °C. Pre vytvorenie vlákiem s enkapsulovanou aktívnou látkou bolo k roztoku PHB pridaných 10% aktívnej látky z pevného podielu polyméru. Následne bol roztok PHB dávkovaný po kvapkách na rotor prístroja pre forcespinning. Nanovlákná boli zozbierané z kolektora a uložené v Petriho miskách.

4.7 Postupné uvoľňovanie aktívnych látok z PHB nanovlákiem

Stanovenie uvoľňovania aktívnych látok z PHB nanovlákiem bolo prevedené spektrofotometricky. Vlnová dĺžka, pri ktorej prebiehalo toto meranie bola zvolená na základe absorpčného maxima jednotlivých látok (kapitola 4.5.1). Vlákná boli nastrihané na štvorce

o rozmeroch 1 cm² a zvážené. Modelovými prostrediami pre uvoľňovanie látok boli destilovaná voda a fyziologický roztok. Vlákna boli ponechané v 2 ml modelových prostrediach pri laboratórnej teplote. Po uplynutí zvoleného času (15 a 30 minút a ďalej 3, 8, 24, 48 a 72 hodín) boli nanovlákná zo skúmavky odobraté a k roztoku bol pridávaný chloroform. Po 5 minútovom vytrepávaní bola zmeraná absorbanca vzoriek. Následne bolo vypočítané množstvo látky, ktoré sa uvoľnilo do destilovanej vody alebo fyziologického roztoku.

4.8 Príprava chitozán – polyamid nanovlákiem metódou forcespinningu

Druhý typ nanovlákiem bol pripravený z chitozánu v kombinácii s polyamidom v rôznych pomeroch podľa postupu v článku, ktorého autorom je *Dotto G. a kol.* Tento postup bolo ale potrebné mierne upraviť [18].

4.8.1 Chitozánové nanovlákná

Pri príprave chitozánových nanovlákiem metódou forcespinningu sme použili chitozán bez prídavku pomocných látok. Bolo použitých 0,75 g chitozánu a 6,20 ml kyseliny mravčej. Roztok bol premiešavaný na magnetickej miešačke celkovo 10 hodín pri 80 °C [18]. Tento roztok bol následne ešte zriedený kyselinou mravčou (3,70 ml) a tiež sme sa pokúsili o zakoncentrovanie pôvodného roztoku (bolo pridaných 0,75 g chitozánu). Všetky 3 vzorky boli pridávané na rotor prístroja pomocou pipety.

4.8.2 Chitozán – polyamid nanovlákná

Chitozán a polyamid (0,50 g a 0,75 g) boli rozpustené v 10,25 ml kyseliny mravčej. Roztok bol premiešavaný na magnetickej miešačke a zahrievaný na 120 °C celkovo 4 hodiny [18]. K roztoku bolo po neúspešnom zvláknení pridaných ešte 2 g polyamidu a roztok bol znova premiešaný na magnetickej miešačke, až do úplného rozpustenia tuhej látky. Pomocou pipety bol roztok prikvapkávaný na rotor prístroja.

4.9 Príprava nanočastíc

Lipozómy boli pripravené pomocou ultrazvukového homogenizátora. Na prípravu prázdnych lipozómov bolo použitých 10 mg cholesterolu, 90 mg lecithínu a 1 ml chloroformu. Lipozómy s aktívnou látkou obsahovali ešte tymol, karvakrol alebo eugenol o koncentráciách 1 mg, 0,5 mg alebo 0,25 mg. Táto zmes bola pridaná k 10 ml destilovanej vody a ultrazvukovaná v 15 sekundových intervaloch po dobu 1 minúty. Zmes bola počas celého procesu ochladzovaná pomocou vodného kúpeľu. Následne bola zahrievaná so súčasným miešaním na magnetickej miešačke až do odparenia chloroformu. Zmes bola v 2 ml Eppendorf skúmavkách centrifugovaná najskôr 5 minút pri 6000 otáčkach. Potom bol odliaty supernatant, ktorý bol znova centrifugovaný 60 minút pri 11000 otáčkach. Pripravené lipozómy boli následne oddelené od supernatantu.

4.10 Charakterizácia nanočastíc

Pripravené lipozómy boli charakterizované z hľadiska enkapsulačnej účinnosti, ich veľkosti a stability.

4.10.1 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti

Enkapsulačná účinnosť látok bola stanovená spektrofotometrickou metódou. Pripravené lipozómy podľa postupu v kapitole 4.9 boli zlyofilizované a následne rozsuspendované

v chloroforme. Bola zmeraná absorbanca vzoriek proti chloroformu, ktorý bol použitý ako blank. Vlnová dĺžka bola zvolená podľa zisteného absorpčného maxima látok (kapitola 4.5.1). Zo získaných hodnôt bola vypočítaná enkapsulačná účinnosť jednotlivých látok. K tomuto stanoveniu boli použité rovnice kalibračných kriviek jednotlivých látok, ktoré boli vyhotovené na základe postupu v kapitole 4.5.1.

4.10.2 Stanovenie veľkosti lipozómov pomocou DLS

Pripravené lipozómy boli rozsuspendované v destilovanej vode a následne boli zriedené stokrát destilovanou vodou. Bola zmeraná veľkosť a polydisperzita častíc pomocou prístroja ZetaSizer.

4.10.3 Stanovenie stability lipozómov pomocou Zeta potenciálu

Lipozómy boli ponechané v modelových prostrediach, a to v destilovanej vode alebo fyziologickom roztoku a tesne pred meraním boli stokrát zriedené destilovanou vodou. Vzorky boli preliate do kyvety s "Dip Cellou" a vložené do prístroja Zeta Sizer. Bola zistená hodnota Zeta potenciálu, na základe ktorého sme určili stabilitu pripravených lipozómov. Meranie prebiehalo hneď po príprave, ďalej po 1 týždni a tiež po 1 mesiaci, pričom vzorky boli uchovávané pri laboratórnej teplote.

4.11 Postupné uvoľňovanie aktívnych látok z lipozómov

Lipozómy boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.9. Následne boli rozsuspendované a ponechané v destilovanej vode alebo fyziologickom roztoku. U lipozómov s enkapsulovaným eugenolom a tymolom predstavovala koncentrácia aktívnej látky 1 mg/ml a u karvakrolu to bolo 0,25 mg/ml. Po uplynutí určitej doby uvoľňovania, boli lipozómy scentrifugované pri 11 000 otáčkach 60 minút. Následne bolo odpipetovaných vždy 0,5 ml supernatantu a doplnené vhodným množstvom chloroformu. Vzorky boli 5 minút vytrepávané a bola stanovená absorbanca pri vlnovej dĺžke príslušnej k absorpčnému maximu látky. Výpočtom bolo stanovené uvoľnené množstvo látky do prostredia.

4.12 Antimikrobiálne testy

Pre otestovanie antimikrobiálnej aktivity vybraných aktívnych látok boli použité mikroorganizmy uvedené v kapitole 4.3. Mikroorganizmy boli kultivované 24 hodín v Erlenmeyerových bankách vo vhodnom médiu uvedenom v Tabuľke 1 pri 37 °C. Médiá boli pred použitím sterilizované pri 120 °C 35 minút. K stanoveniu antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok a tiež pripravených nanomateriálov s enkapsulovanými látkami bola použitá bujónová dilučná metóda (kapitola 4.12.1). Ďalej bol využitý tiež resazurínový test (kapitola 4.12.2).

Tabuľka 1: Mikroorganizmy, použité médium a potrebné navážky

Mikroorganizmus	Médium	Navážka (g/l)
<i>Cutibacterium acnes</i>	BHI	37
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI	37
<i>Escherichia coli</i>	LB	20

4.12.1 Bujónová dilučná metóda

Antimikrobiálna aktivita látok bola pozorovaná pomocou bujónovej dilučnej metódy v 96 – jamkovej a 24 – jamkovej mikrotitračnej doštičke. Zmena absorbancie bola zaznamenaná pomocou prístroja ELISA Reader v čase 0 a po 24 – hodinovej kultivácii pri 630 nm. Výpočtom bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia, teda MIC. MIC₈₀ popisuje koncentráciu kedy došlo k inhibícii rastu buniek z viac ako 80 % oproti kontrole [78]. Antimikrobiálny účinok bol sledovaný u samotných látok a tiež u funkcionalizovaných nanovlákiek aj nanočastíc.

4.12.1.1 Antimikrobiálna aktivita aktívnych látok

Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok bola použitá 96 – jamková mikrotitračná doštička. Do jamiek v prvom riadku na doštičke bolo napipetovaných 180 µl vhodného média, 20 µl aktívnej látky a 100 µl nariadenej kultúry pomocou 0,5 McFarlandovej stupnice. Všetky látky boli vhodne nariadené a otestované v triplikátoch. Ako pozitívna kontrola bolo použité 25% DMSO a ako negatívna kontrola slúžilo 100 µl nariadenej kultúry a 100 µl média. Pre kontrolu média bolo použitých 200 µl média. Boli tiež vytvorené koncentračné rady DMSO. Následne bola zmeraná absorbancia v čase 0 pomocou prístroja ELISA Reader pri 630 nm. Bola prevedená 24 – hodinová kultivácia pri 37 °C a znova zmeraná absorbancia doštičiek pri 630 nm. Zmena zákalu v čase 0 a po 24 hodinách bola porovnaná s negatívnou kontrolou. Na tomto základe bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia aktívnych látok pre testované mikroorganizmy (MIC₈₀).

4.12.1.2 Antimikrobiálna aktivita funkcionalizovaných nanovlákiek

Nanovláka boli pripravené na základe postupu v kapitole 4.6. Otestovanie antimikrobiálnej aktivity PHB nanovlákiek bolo prevedené v 24 – jamkovej mikrotitračnej doštičke. Do každej jamky bol napipetovaný 1 ml sterilného média a 1 ml vhodne nariadenej kultúry. Následne bola zmeraná absorbancia v čase 0 pri 630 nm. Do jamôčok boli pridané vysterilizované nanovláka o rozmere 1 cm². Nanovláka boli predom zvažované a doštičky boli inkubované pri 37 °C 24 hodín. Po uplynutí tohto času boli vlákna pinzetou z jamôčok odstránené a znova bola zmeraná absorbancia pri 630 nm. Ako negatívna kontrola bol použitý 1 ml média a 1 ml kultúry. Ako kontrola média bolo použitých 2 ml média. Zmenu absorbancie v čase 0 a 24 hodín sme porovnali s negatívnou kontrolou a stanovili sme antimikrobiálnu aktivitu nanovlákiek.

4.12.1.3 Antimikrobiálna aktivita funkcionalizovaných lipozómov

Lipozómy boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.9 a následne boli rozsuspendované v 1 ml vhodného média. Do 96 – jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo do prvej rady napipetovaných 200 µl média s rozsuspendovanými nanočasticami. Do ostatných jamiek bolo pridaných 100 µl média. Pôvodná koncentrácia látok v lipozómoch predstavovala 1 mg/ml u eugenolu a tymolu, a 0,25 mg/ml u karvakrolu. Množstvo pridaných lipozómov bolo s každou jamôčkou dvakrát nariadené a nakoniec bolo pridaných 100 µl nariadenej kultúry pomocou 0,5 Mc Farlandovej stupnice. Pri 630 nm a pomocou prístroja ELISA Reader bola zmeraná absorbancia v čase 0, po 24 – hodinovej kultivácii a tiež po 48 hodinách. Ako negatívna kontrola bolo použitých 100 µl média a 100 µl kultúry a pre pozitívnu kontrolu 25% DMSO. Jamka s kontrolou média obsahovala 200 µl média. Hodnoty absorbancie v čase 0, 24 a 48 hodín boli porovnané s kontrolou rastu buniek a bola stanovená antimikrobiálna aktivita lipozómov.

4.12.2 Resazurínový test

Po 24 hodinovej kultivácii mikroorganizmov s aktívnou látkou bol prevedený resazurínový test. Do 96-jamkových doštičiek bolo napipetovaných 20 μ l sterilného roztoku resazurínu a 200 μ l do 24 – jamkovej doštičky. Doštičky boli ponechané v termostate na 30 minút pri 37 °C. Po uplynutí inkubácie bola pomocou prístroja ELISA Reader zmeraná absorbancia pri 570 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto bakalárska práca sa zameriava na prípravu a charakterizáciu funkcionalizovaných nanomateriálov. U jednotlivých aktívnych látok – tymol, karvakrol a eugenol bol stanovený obsah polyfenolov a ich antioxidačná aktivita. Ďalej bola otestovaná ich antimikrobiálna aktivita voči vybraným baktériám – *E. coli*, *C. acnes* a *S. epidermidis*. Nanovlákná z polyhydroxybutyrátu boli pripravené pomocou forcespinningu a bolo sledované postupné uvoľňovanie aktívnych látok z takto pripravených nanovláknien. Následne boli otestované ich antimikrobiálne vlastnosti pomocou bujónovej dilučnej metódy a resazurínového testu. Aktívne látky boli enkapsulované tiež do nanočastíc, ktoré boli pripravené pomocou sonifikácie. Nanočastice boli charakterizované pomocou merania veľkosti, ich stability a tiež bolo pozorované postupné uvoľňovanie látok z nanočastíc. Bola zistená taktiež enkapsulačná účinnosť aktívnych látok do lipozómov. Na záver bola aj u lipozómov otestovaná ich antimikrobiálna aktivita.

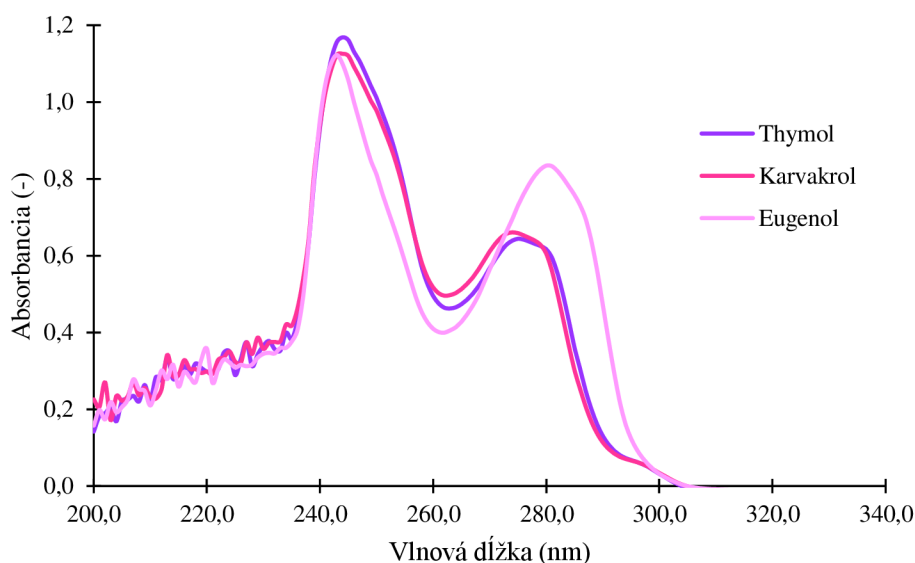
Cieľom bolo pripraviť nanomateriály, ktoré by si mohli nájsť využitie v kozmetickom priemysle. V prípade nanovláknien by mohli byť výsledné produkty používané vo forme pleťových masiek alebo náplastí na akné. Funkcionalizované nanočastice by mohli byť využívané ako konzervanty či prídavné látky v kozmetických produktoch pre liečbu akné a iných kožných chorôb.

5.1 Charakterizácia aktívnych látok

U tymolu, karvakrolu a eugenolu boli premerané ich absorpčné spektrá a zostavené kalibračné krivky pre všetky tri látky. Taktiež boli tieto látky charakterizované z hľadiska ich antioxidačnej aktivity a obsahu polyfenolov.

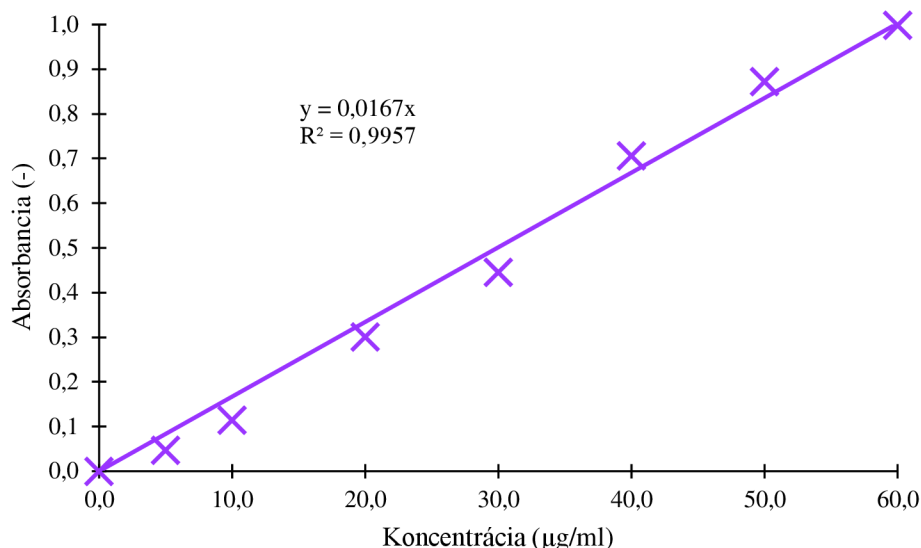
5.1.1 Absorpčné maximá a kalibračné krivky aktívnych látok

Ako prvé boli premerané absorpčné spektrá látok používaných v tejto práci a následne boli zostavené ich kalibračné závislosti. Toto meranie prebiehalo podľa postupu v kapitole 4.5.1.



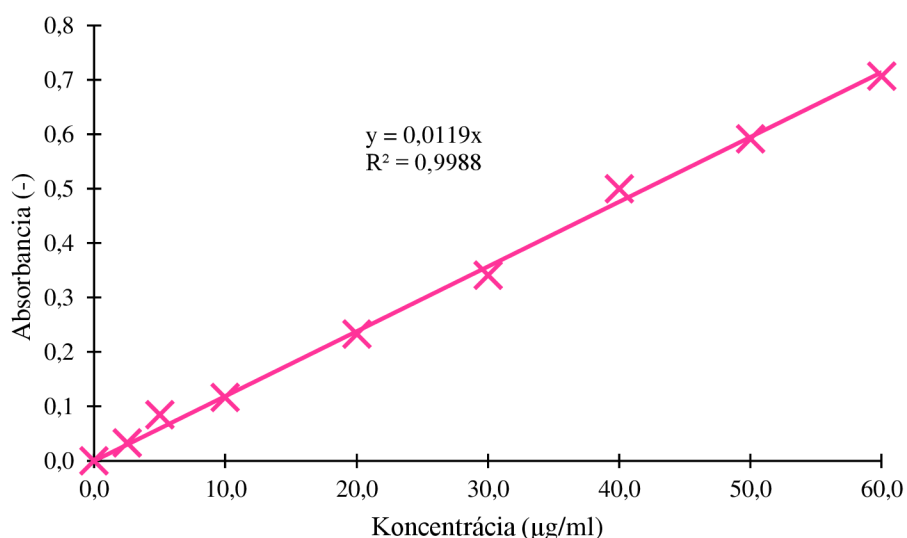
Obrázok 14: Absorpčné spektrá aktívnych látok

V grafe (Obrázok 14) vidíme zobrazené absorpčné spektrá všetkých aktívnych látok v rozmedzí vlnových dĺžok 200 – 400 nm. Absorpčné maximum tymolu činí 275 nm, u karvakrolu je táto hodnota 274 nm a u eugenolu 280 nm. Na tomto základe boli zmerané kalibračné závislosti látok uvedené v grafoch nižšie (Obrázok 15, Obrázok 16 a Obrázok 17).



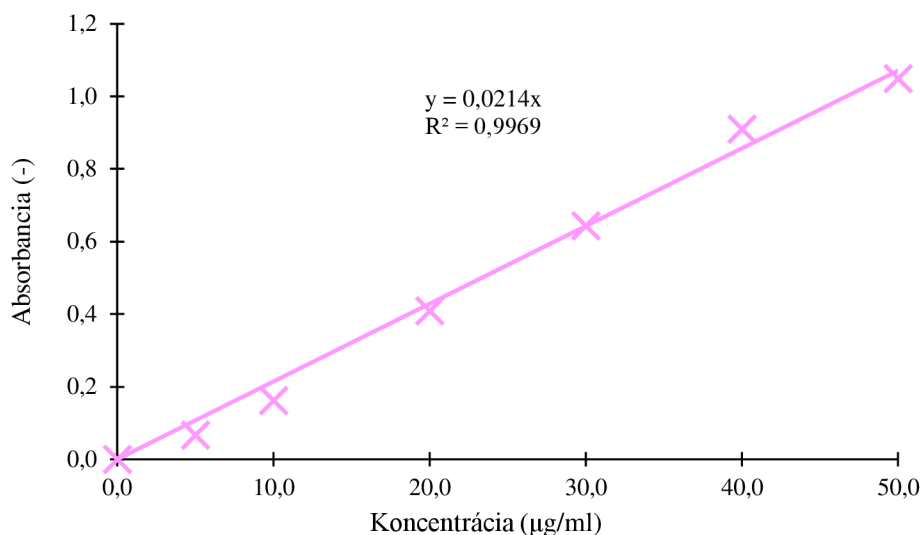
Obrázok 15: Kalibračná krivka tymolu

Graf (Obrázok 15) zobrazuje kalibračnú závislosť tymolu, ktorý bol rozpustený v chloroforme. Získali sme rovnicu krivky, ktorá slúžila pre vypočítanie enkapsulačnej účinnosti tymolu podľa postupu v kapitole 4.10.1. Táto rovnica odpovedá $y = 0,0167x$.



Obrázok 16: Kalibračná krivka karvakrolu

Kalibračnú závislosť karvakrolu je možné vidieť v grafe vyššie (Obrázok 16). Bola vyobrazená rovnica priamky ($y = 0,0119x$), na základe ktorej bola stanovená enkapsulačná účinnosť karvakrolu podľa postupu v kapitole 4.10.1.

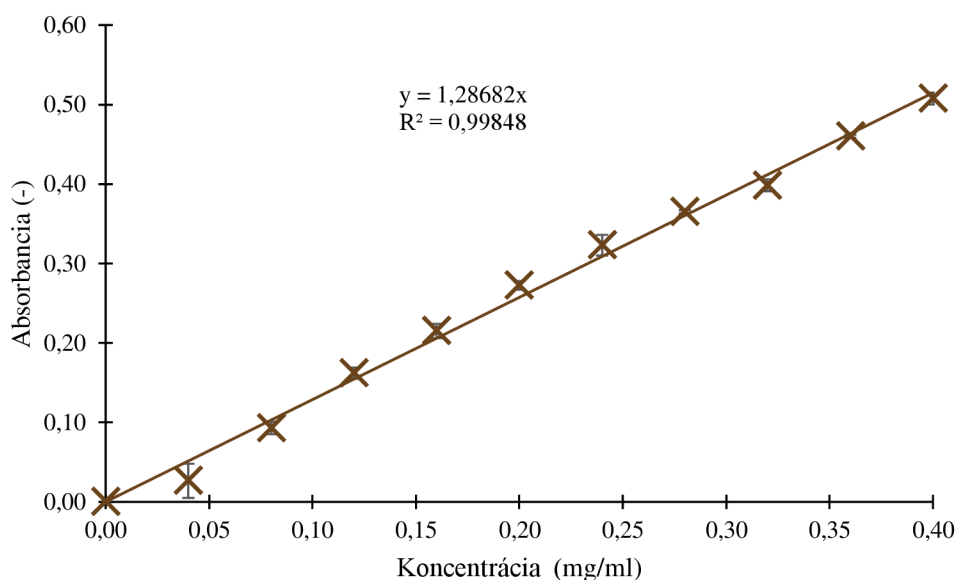


Obrázok 17: Kalibračná krivka eugenolu

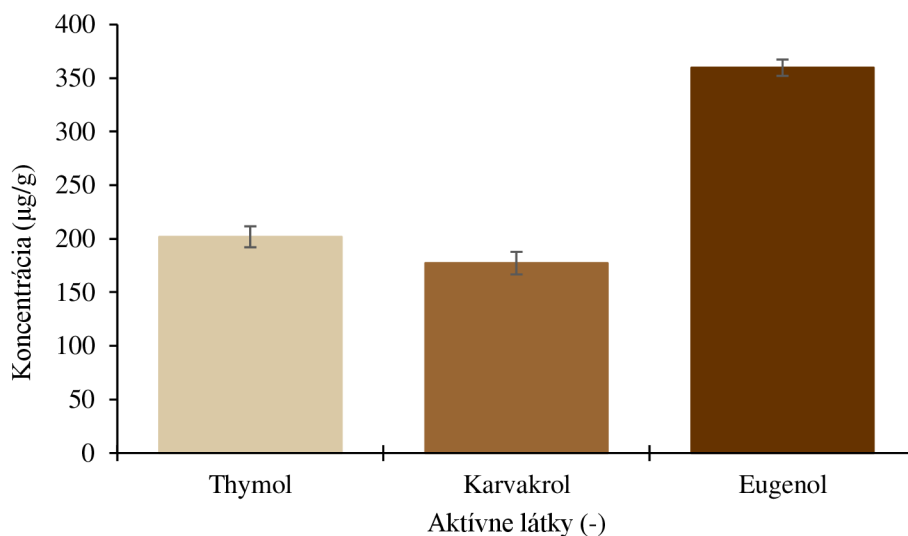
U eugenolu bola taktiež zostavená kalibračná krivka a zobrazená rovnica priamky (Obrázok 17). Pomocou tejto rovnice ($y = 0,0214x$) bola neskôr vypočítaná enkapsulačná účinnosť eugenolu, podľa postupu v kapitole 4.10.1.

5.1.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5.2. Bola zostavená kalibračná krivka Troloxu (Obrázok 18), na základe ktorej sme vypočítali celkovú antioxidačnú aktivitu jednotlivých látok. Výsledky sú uvedené v grafe nižšie (Obrázok 19).



Obrázok 18: Kalibračná krivka troloxu



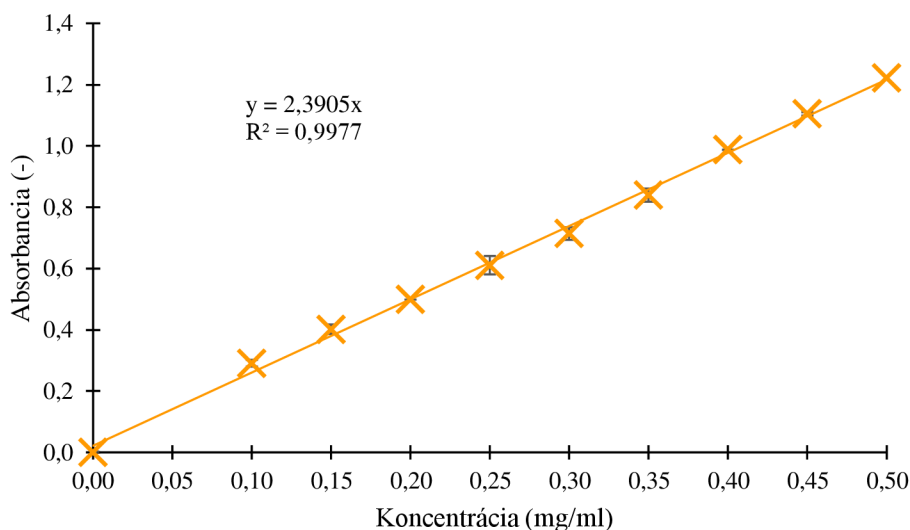
Obrázok 19: Antioxidačná aktivita aktívnych látok

Z grafu (Obrázok 19) môžeme vyčítať, že najvyššia antioxidačná aktivita bola zistená u eugenolu ($359,72 \pm 7,59 \mu\text{g/g}$). U izomérov tymol a karvakrol, vykazuje vyššiu antioxidačnú aktivitu tymol, a to $201,86 \pm 9,79 \mu\text{g/g}$. Stanovená hodnota u karvakrolu číni $177,30 \pm 10,56 \mu\text{g/g}$. *Nagoor Meeran a kol.* tiež uvádzajú, že tymol má lepšie antioxidačné schopnosti oproti karvakrolu, vďaka lepšiemu stérickému usporiadaniu fenolových skupín [55].

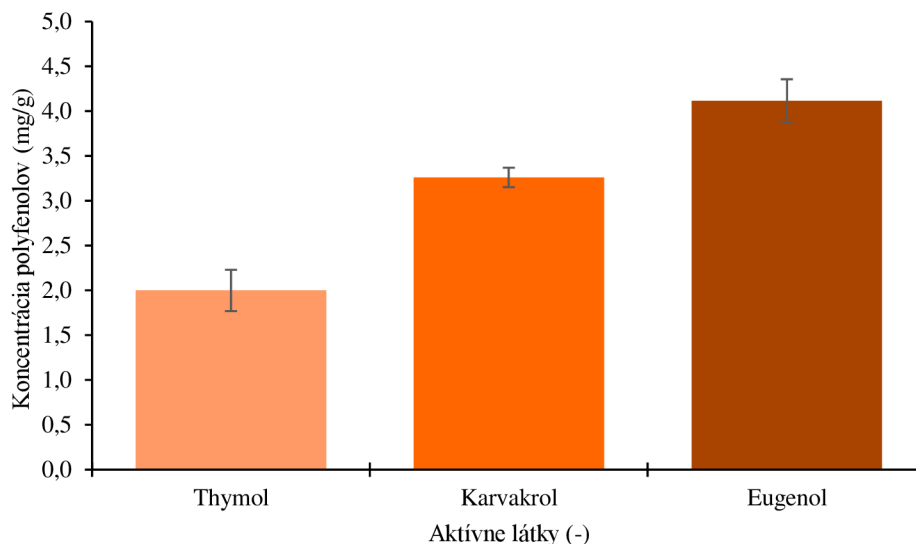
Vďaka antioxidačnej aktivite testované látky účinne znižujú negatívny vplyv voľných radikálov. Vzhľadom k tomu, by mohli byť využívané v kozmetike, za účelom spomalenia procesu starnutia pokožky [3].

5.1.3 Stanovenie celkových polyfenolov

Pre stanovenie obsahu polyfenolov v aktívnych látkach bola ako prvé zostavená kalibračná krivka kyseliny gallovej (Obrázok 20) podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. Pomocou rovnice krivky bol vypočítaný obsah polyfenolov v jednotlivých aktívnych látkach.



Obrázok 20: Kalibračná krivka kyseliny gallovej



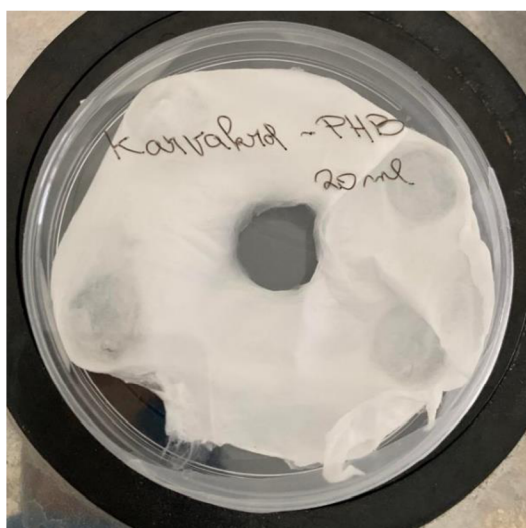
Obrázok 21: Obsah polyfenolov v aktívnych látkach

Z grafu (Obrázok 21) vidíme, že najvyšší podiel polyfenolov je obsiahnutý v eugenole, a to $4,12 \pm 0,24$ mg/g. Karvakrol obsahoval $3,26 \pm 0,11$ mg/g polyfenolov a najmenšie zastúpenie sme zistili u tymolu, konkrétne $2,00 \pm 0,23$ mg/g.

5.2 Optimalizácia prípravy nanovlákien z PHB pomocou forcespinningu

Nanovlákná zo 4% roztoku polyhydroxybutyrátu (PHB) boli pripravené pomocou rotačného zvlákňovacieho prístroja podľa postupu v kapitole 4.6.

PHB nanovlákná bez prídavku účinných látok a vlákna s enkapsulovanými aktívnymi látkami boli pripravené z 10 ml a aj 20 ml 4% roztoku PHB. Nanovlákná pripravené z 10 ml roztoku PHB boli tenšie a v niektorých prípadoch sa pri odoberaní z kolektora trhali. Vlákna z 20 ml roztoku PHB boli pevné, kompaktné a nelepivé. Po prídavku aktívnych látok nedošlo k žiadnym viditeľným zmenám v porovnaní s čistými nanovláknami. Podarilo sa nám pripraviť vlákna, u ktorých bola otestovaná ich antimikrobiálna aktivita a taktiež postupné uvoľňovanie z nanovlákien. Pripravené nanovlákná vidíme na obrázku nižšie (Obrázok 22).



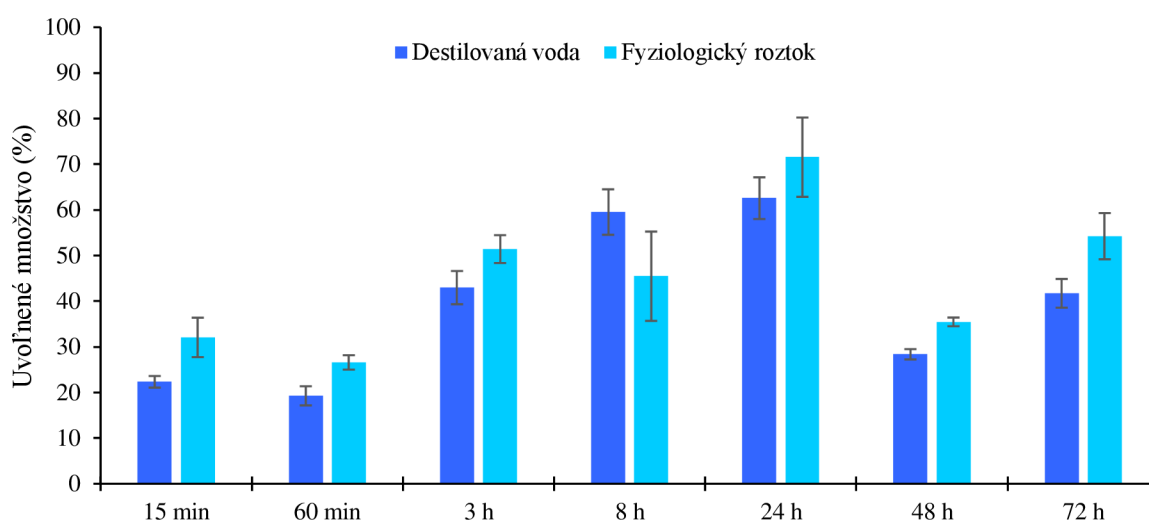
Obrázok 22: PHB nanovlákná s enkapsulovaným karvakrolom - 20 ml

5.3 Postupné uvoľňovanie účinných látok z nanovlákien na báze PHB

PHB nanovlákná boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.6. Do nanovlákien bolo enkapsulovaných vždy 10 % aktívnej látky z pevného podielu PHB. Stanovenie uvoľneného množstva aktívnej látky z vlákien bolo prevedené podľa postupu v kapitole 4.7. Meranie prebiehalo spektrofotometricky vždy v triplikátoch a boli vypočítané smerodatné odchýlky. Bolo sledované postupné uvoľňovanie látok do destilovanej vody i fyziologického roztoku, pri 25 °C. Prostredie destilovanej vody je prostredie modelujúce laboratórne podmienky a prostredie fyziologického roztoku zasa modeluje prostredie na povrchu pokožky. Časy vybrané pre toto stanovenie boli nasledujúce: 15 a 60 minút a ďalej 3, 8, 24, 48 a 72 hodín.

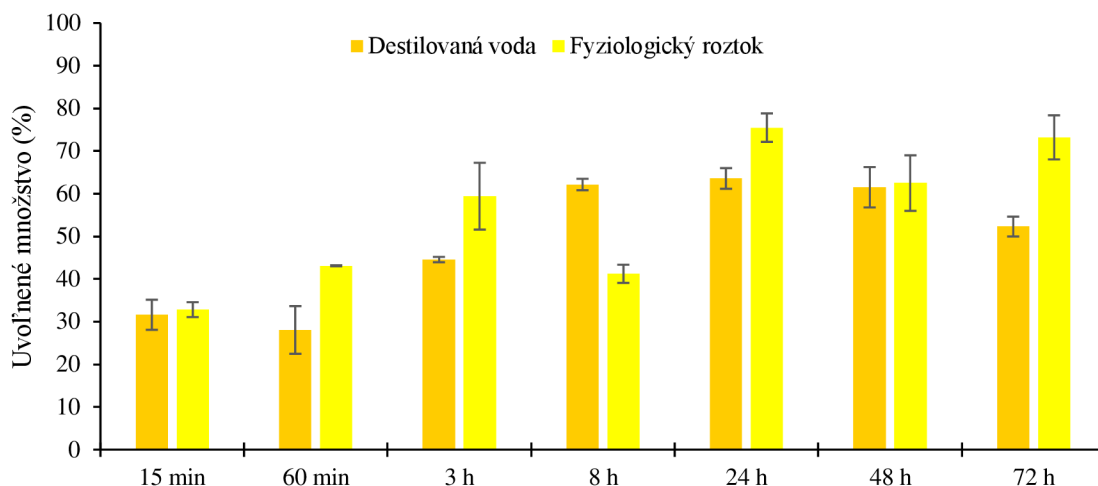
5.3.1 Postupné uvoľňovanie tymolu z nanovlákien

V nasledujúcich grafoch (Obrázok 23 a Obrázok 24) sú zobrazené percentuálne hodnoty uvoľneného množstva tymolu z celkového enkapsulovaného množstva.



Obrázok 23: Uvoľnené množstvo tymolu z nanovlákien pripravených z 10 ml roztoku PHB

Na obrázku (Obrázok 23) môžeme vidieť uvoľnené množstvo tymolu z nanovlákien, ktoré boli pripravené z 10 ml 4% roztoku PHB. Ide o porovnanie postupného uvoľňovania do destilovanej vody a fyziologického roztoku. Uvoľňovanie tymolu stúpalo po dobu 24 hodín. Pri meraní po 48 hodinách môžeme pozorovať značný pokles uvoľneného tymolu. Po uplynutí 72 hodín obsah tymolu znova stúpa, aj keď už len v menšej miere. Domnievame sa, že tento pokles je spôsobený degradáciou uvoľneného tymolu. K degradácii tymolu môže dochádzať aj vplyvom svetla [79]. Opätovný nárast je zasa dôsledkom rozpadu nanovlákien sprevádzaný uvoľnením tymolu z vlákien. Odchýlky od tohto trendu môžu byť spôsobené nárazovým uvoľňovaním, kedy dochádza k utrhnutiu menšej časti vlákna. Vo všeobecnosti môžeme povedať, že vyššie množstvo tymolu sa uvoľnilo do fyziologického roztoku, až na výnimku pri 8 hodinách. To môže byť spôsobené rýchlejšou difúziou aktívnej látky z nanovlákien do fyziologického roztoku v porovnaní s destilovanou vodou [80]. Najviac uvoľneného tymolu sme zaznamenali po 24 hodinách, do fyziologického roztoku, a to konkrétne $71,54 \pm 8,69$ %.



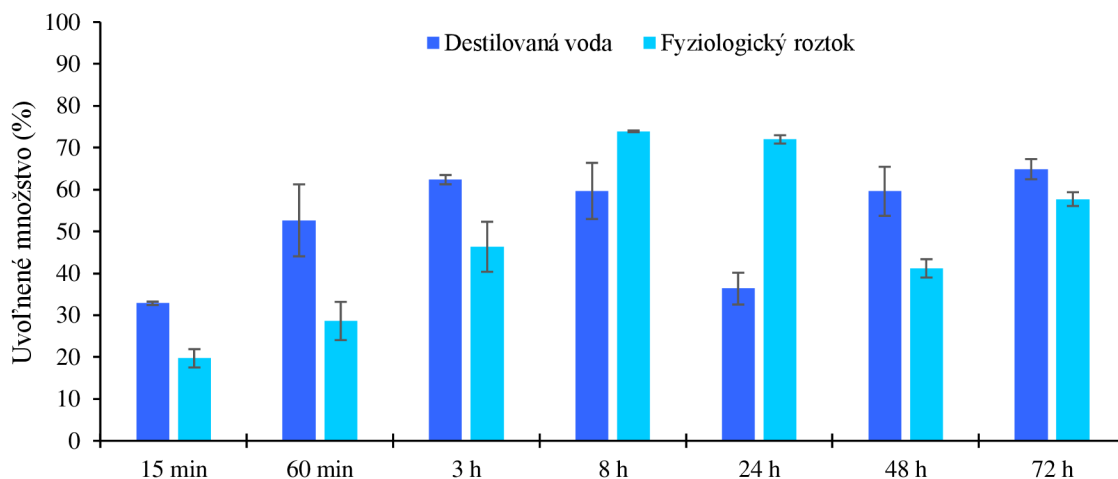
Obrázok 24: Uvoľnené množstvo tymolu z nanovlákien pripravených z 20 ml roztoku PHB

Graf (Obrázok 24) zobrazuje postupné uvoľňovanie tymolu z nanovlákien pripravených z 20 ml 4% roztoku PHB. Rastúce množstvo uvoľneného tymolu počas 24 hodín môžeme sledovať aj v tomto prípade, až na menšie odchýlky od tohto trendu. Ako aj v prípade 10 ml nanovlákien, tu tiež pravdepodobne došlo k nárazovému uvoľneniu. K utrhnutiu časti vlákna došlo podľa grafu po 15 minútach uvoľňovania v destilovanej vode a taktiež po 3 hodinách vo fyziologickom roztoku. Po uplynutí 48 hodín, hodnoty následne znova začínajú klesať. U fyziologického roztoku sme po 72 hodinách zaznamenali opätovný nárast hodnôt. Najvyššia zaznamenaná hodnota je v prípade uvoľňovania z nanovlákien, ktoré boli ponechané vo fyziologickom roztoku počas 24 hodín. Táto hodnota činí $75,47 \pm 3,34$ %.

Ak porovnávame nanovláka s objemom 10 ml a tie s objemom 20 ml, zistíme, že viac tymolu sa dokázalo uvoľniť z 20 ml nanovlákien. Predpokladáme, že je tomu tak vďaka väčšiemu adsorpčnému povrchu. Väčší povrch vlákna taktiež znamená, že môže takéto vlákno viac reagovať s modelovým prostredím.

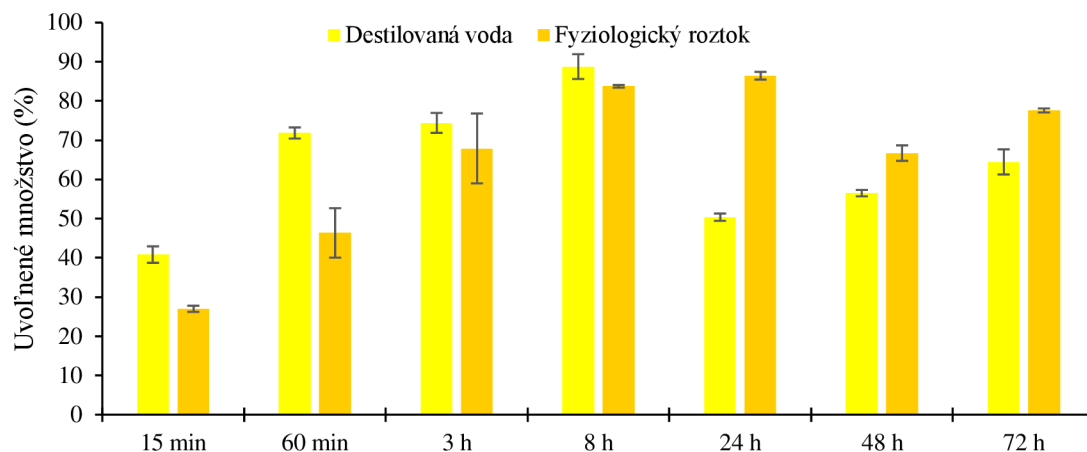
5.3.2 Postupné uvoľňovanie karvakrolu z nanovlákien

Grafy (Obrázok 25 a Obrázok 26) zobrazujú množstvo uvoľneného karvakrolu z pripravených nanovlákien.



Obrázok 25: Uvoľnené množstvo karvakrolu z nanovlákien pripravených z 10 ml PHB

Ako môžeme pozorovať v grafe (Obrázok 25) množstvo uvoľneného karvakrolu počas 8 hodín postupne stúpalo, no následne došlo k poklesu a opätovnému nárastu. Zvyšovanie hodnôt sme zaznamenali v rozmedzí 15 minút až 8 hodín. Najvyššie uvoľnené množstvo karvakrolu činilo $73,89 \pm 0,20$ %, a to do prostredia fyziologického roztoku pri 25 °C. V prípade fyziologického roztoku došlo k výraznejšiemu poklesu hodnôt, a teda degradácii látky, až po 48 hodinách. Kdežto u destilovanej vody bol pozorovaný významný pokles už po 24 hodinách.

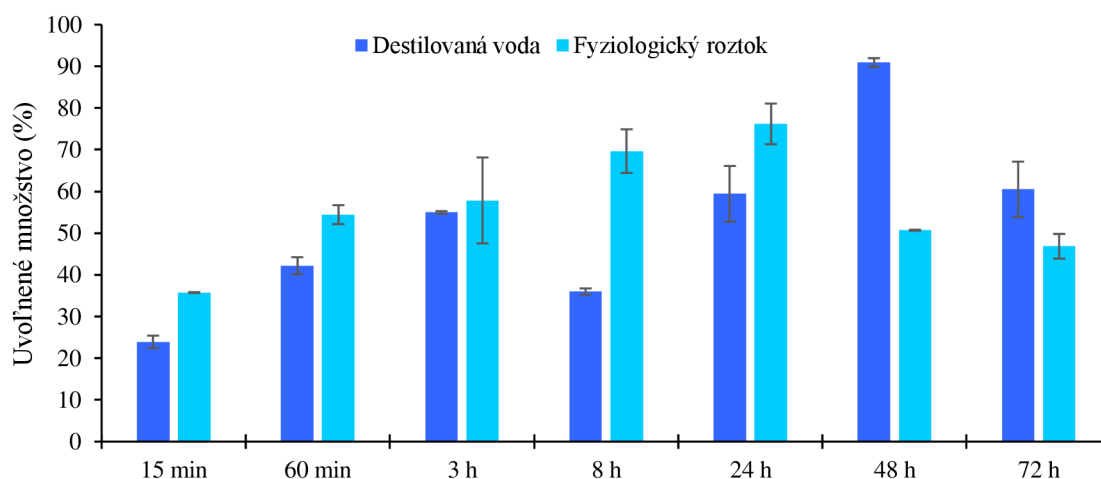


Obrázok 26: Uvoľnené množstvo karvakrolu z nanovlákien pripravených z 20 ml PHB

V prípade 20 ml nanovlákien s enkapsulovaným karvakrolom (Obrázok 26) pozorujeme rovnaký trend ako u 10 ml nanovlákien. Najvyššie uvoľnené množstvo karvakrolu bolo stanovené po 8 hodinách uvoľňovania v destilovanej vode, a to $88,78 \pm 3,16$ %. V časoch 15 minút až 8 hodín uvoľňovanie do destilovanej vody prevažovalo nad uvoľňovaním do fyziologického roztoku. Predpokladáme, že k tomu môže dôjsť v prípade, ak degradácia nanovlákien a následne uvoľnenie látky do prostredia prevažuje nad rýchlosťou difúzie [80]. Po výraznom poklese uvoľneného množstva do destilovanej vody po 24 hodinách, sa viac karvakrolu začalo uvoľňovať do fyziologického roztoku.

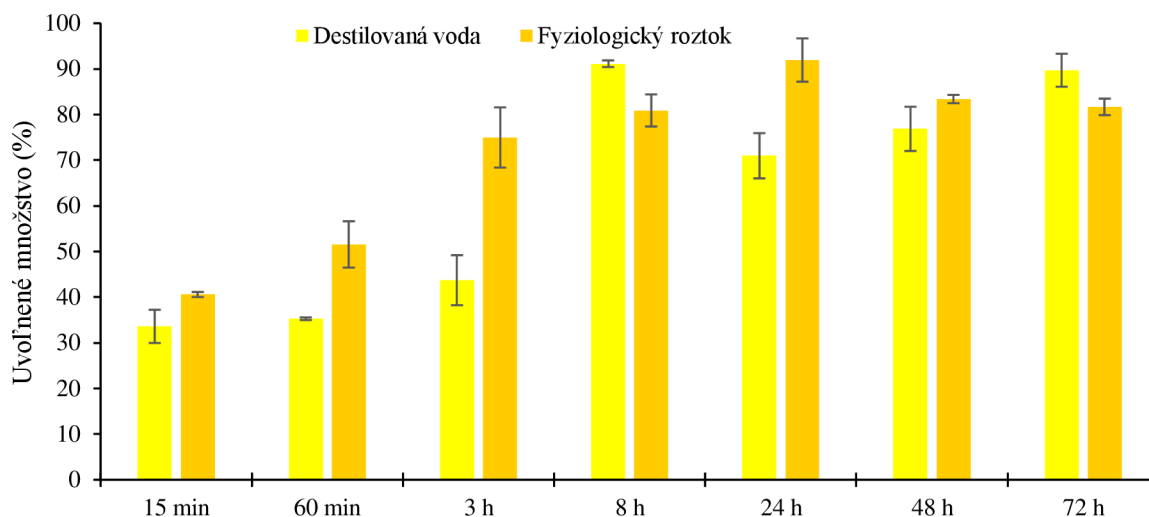
5.3.3 Postupné uvoľňovanie eugenolu z nanovlákien

Na obrázkoch (Obrázok 27 a Obrázok 28) vidíme grafické spracovanie postupného uvoľňovania eugenolu.



Obrázok 27: Uvoľnené množstvo eugenolu z nanovlákien pripravených z 10 ml PHB

V grafe (Obrázok 27) môžeme pozorovať, že množstvo uvoľneného eugenolu postupom času narastá a následne dochádza k poklesu. Najvyššie uvoľnené množstvo sme zaznamenali po 48 hodinovom uvoľňovaní eugenolu do destilovanej vody, a to $90,93 \pm 1,04$ %. Toto náhle uvoľnenie veľkého množstva bolo pravdepodobne dôsledkom odtrhnutia malej časti vlákna. V prípade destilovanej vody došlo k zníženiu uvoľneného množstva po 72 hodinách, no pri fyziologickom roztoku, sme pozorovali zníženie už po 48 hodinách. Ako aj v prípade ostatných sledovaných účinných látok, aj tu môžeme vidieť, že došlo k čiastočnej degradácii uvoľneného eugenolu.



Obrázok 28: Uvoľnené množstvo eugenolu z nanovlákieň pripravených z 20 ml PHB

Ako vidíme na obrázku (Obrázok 28) vyššie množstvo eugenolu sa uvoľňuje do prostredia fyziologického roztoku, až na menšie výnimky. Trend zvyšovania uvoľneného množstva eugenolu v určitom časovom úseku, pokles a opätovné zvýšenie, je nasledovaný aj v tomto prípade. Z grafu však vidíme, že detekované množstvá eugenolu sa v čase rozmedzí 8 až 72 hodín pohybujú nad hodnotou 70%. Môžeme teda tvrdiť, že eugenol zostáva v oboch prostrediach stabilný aj po dlhšom čase. Najvyššia nameraná hodnota činí $91,94 \pm 4,74$ %. Takéto množstvo eugenolu bolo uvoľnené do fyziologického roztoku, po 24 hodinách, pri 25°C .

Ak porovnáme všetky grafy postupného uvoľňovania z nanovlákieň, u všetkých aktívnych látok, zistíme, že najvyššie množstvá uvoľnenej látky boli detekované u eugenolu (Obrázok 27 a Obrázok 28), a to v oboch prostrediach a pri oboch objemoch nanovlákieň.

Taktiež môžeme porovnať uvoľňovanie z nanovlákieň pripravených z 10 ml PHB a z 20 ml PHB. Vo všetkých prípadoch môžeme konštatovať, že väčšie percentá látky boli uvoľnené z vlákieň s väčším objemom, teda 20 ml. Pravdepodobne, je tomu tak z dôvodu väčšieho povrchu vlákieň, ktorý môže reagovať s prostredím a tiež z dôvodu, že 20 ml nanovlákaňa majú väčší adsorpčný povrch.

5.4 Optimalizácia prípravy nanovlákieň z chitozánu a polyamidu

Pri optimalizácii prípravy nanovlákieň z chitozánu s prídavkom polyamidu sme postupovali na základe článku od autorov *Dotto G. a kol* [18]. Najprv sme sa pokúsili pripraviť chitozánové

vlákna, ktoré neobsahovali žiadny iný pomocný polymér. Následne sme k chitozánu pridávali aj polyamid a pokúsili sa o zvláknenie týchto roztokov. Ako rozpúšťadlo bola v oboch prípadoch použitá kyselina mravčia.

5.4.1 Chitozánové nanovlákná

Pri príprave chitozánových nanovláknien sme sa pokúsili vyrobiť vlákna chitozánu bez prídavku iného polyméru metódou forcespinningu [18]. Postup k tejto príprave je uvedený v kapitole 4.8.1. Na obrázku nižšie (Obrázok 29) vidíme pripravený roztok chitozánu a kyseliny mravčej. Tento roztok bol priveľmi viskóznym a ťažko sa odoberal pipetou.

Pokúsili sme sa tiež pôvodný roztok (Obrázok 29) zakonzentrovat' chitozánom (0,75 g) a pri ďalšom pokuse zasa zriediť kyselinou mravčou (3,70 ml).



Obrázok 29: Roztok chitozánu rozpusteného v kyseline mravčej

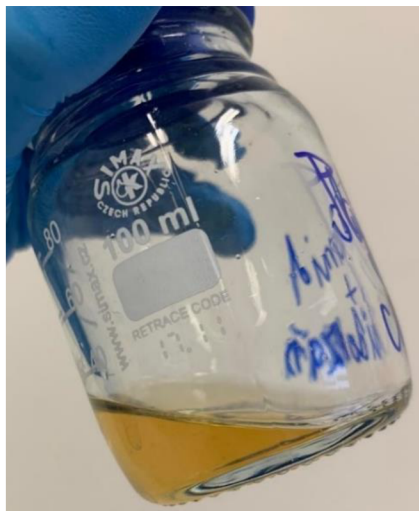


Obrázok 30: Pokus o zvláknenie čistého chitozánu v kyseline mravčej

Všetky pokusy o zvláknenie chitozánu boli však neúspešné. Netvorili sa žiadne vlákna. Pri prikvapávaní roztoku na rotor prístroja sme pozorovali iba odlietávajúce kvapky roztoku (Obrázok 30).

5.4.2 Chitozán – polyamid nanovlákná

G.L. Dotto a kol. v článku uvádzajú tiež možnosti ako pripraviť nanovlákná chitozánu v kombinácii s polyamidom pomocou forcesspinningu. Ako rozpúšťadlo bola aj v tomto prípade použitá kyselina mravčia [18]. Na obrázku (Obrázok 31) vidíme pripravený roztok podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.2.



Obrázok 31: Roztok chitozánu s polyamidom rozpustené v kyseline mravčej

Postup uvedený v článku, podľa ktorého sme nanovlákná pripravovali, bol mierne pozmenený [18]. Spočiatku sme sa pokúsili o zvlákňovanie 0,5 g chitozánu a 0,75 g polyamidu v 10,25 ml kyseliny mravčej. Toto zvlákňovanie bolo rovnako neúspešné ako zvlákňovanie čistého chitozánu. Znova došlo k odlietavaniu kvapiek roztoku ako vidíme aj na obrázku vyššie (Obrázok 30). Preto sme roztok zakoncentrovali polyamidom. Boli pridané ešte 2 g polyamidu. Výsledný pomer bol teda 0,5 g chitozánu a 2,75 g polyamidu spolu s 10,25 ml kyseliny mravčej.



Obrázok 32: Vlákna chitozánu s polyamidom

Na obrázku (Obrázok 32) môžeme pozorovať pripravené nanovlákná. Celkový prikvapkávaný objem bol 15 ml. Podarilo sa nám pripraviť nanovlákná chitozánu v kombinácii s polyamidom, ale vlákna boli veľmi jemné. Pri odoberaní vlákien z kolektora sa vlákna trhali, zlepovali a nebolo s nimi možné ďalej pracovať. Tento postup bude teda ešte potrebné upraviť a vylepšiť.

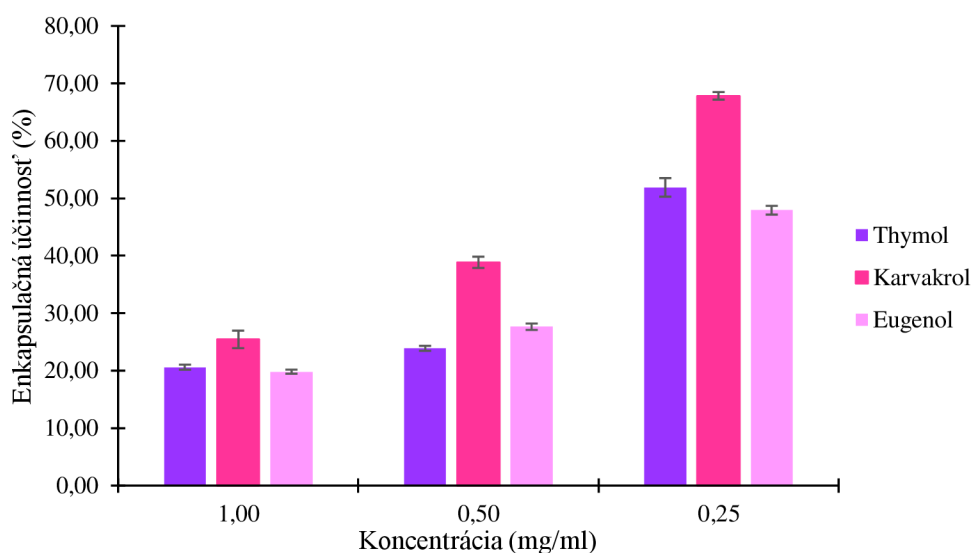
Príprava nanovlákien z chitozánu pomocou forcespinningu je komplikovaná. Môže závisieť od mnohých parametrov ako napríklad stupeň deacetylácie chitozánu, jeho molekulová hmotnosť, kryštalinita, viskoelastické vlastnosti roztoku, teplota a ďalšie [81]. Článok, z ktorého sme čerpali uvádzal neúplne informácie a boli potrebné menšie úpravy. Pripravené nanovlákná však stále nemali ideálnu povahu pre naše aplikácie. Preto, bude v budúcnosti potrebná ďalšia optimalizácia a použitie iného pomeru chemikálií pre úspešné zvláknenie chitozánu pomocou forcespinningu [18]. Ďalšou možnosťou ako pripraviť vlákna chitozánu by mohlo byť použitie inej zvlákňovacej metódy či iného rozpúšťadla. *Ohkawa K. a kol.* úspešne pripravili nanovlákná chitozánu bez prídavku pomocných polymérov metódou elektrosinningu. Ako rozpúšťadlo bola v tomto prípade použitá kyselina triflouroctová v kombinácii s dichlórmetánom [82].

5.5 Charakterizácia nanočastíc

Na základe postupu v kapitole 4.9. boli pripravené funkcionalizované lipozómy a taktiež prázdne lipozómy. Bola sledovaná enkapsulačná účinnosť aktívnych látok do lipozómov, ďalej veľkosť pripravených lipozómov a ich stabilita.

5.5.1 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti aktívnych látok do lipozómov

Podľa postupu v kapitole 4.10.1 bola stanovená enkapsulačná účinnosť aktívnych látok. Naším cieľom bolo pomocou enkapsulácie do nanovlákien a nanočastíc zabezpečiť vyššiu stabilitu látok, zamedziť predčasnej degradácii látok či zlepšiť penetráciu do pokožky a tiež antioxidačnú aktivitu látok [2].



Obrázok 33: Enkapsulačná účinnosť aktívnych látok

Enkapsulačná účinnosť aktívnych látok bola stanovená u troch rôznych koncentrácií: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 0,25 mg/ml. Z grafu (Obrázok 33) vidíme, že tymol, karvakrol aj eugenol vykazujú

najlepšiu enkapsulačnú účinnosť pri najnižšej testovanej koncentrácii, a to 0,25 mg/ml. Preto bola táto koncentrácia zvolená aj pre meranie postupného uvoľňovania karvakrolu z lipozómov (kapitola 5.6.2) a tiež pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity lipozómov s enkapsulovaným karvakrolom (kapitola 5.7.3.2). So stúpajúcou koncentraciou látok, enkapsulačná účinnosť teda klesala. Tento trend je pravdepodobne dôsledkom hydrofobicity látok. Látky majú tendenciu zachytávať sa na stenách kadičiek či na sonde sonifikátora. Najvyššiu enkapsulačnú účinnosť z pomedzi všetkých látok vykazoval karvakrol, a to u všetkých testovaných koncentrácií. Množstvo enkapsulovaného karvakrolu pri 0,25 mg/ml bolo $67,83 \pm 0,66 \%$. Najnižšiu enkapsulačnú účinnosť pri 0,25 mg/ml mal eugenol, ktorá činila $47,92 \pm 0,75 \%$. V prípade tymolu bolo enkapsulovaných $51,90 \pm 1,61 \%$.

Pri meraní postupného uvoľňovania aktívnych látok z lipozómov a pri stanovení antimikrobiálnych vlastností lipozómov, bola použitá koncentrácia tymolu a eugenolu 1 mg/ml. Pri tejto koncentrácii bolo u tymolu enkapsulovaných $20,60 \pm 0,44 \%$ a u eugenolu $19,82 \pm 0,36 \%$. Ak sa pozrieme na enkapsulované množstvo látky, pri koncentrácii 0,25 mg/ml a koncentrácii 1 mg/ml a vzájomne ich porovnáme, zistíme, že vyššiu koncentráciu účinnej látky obsahujú lipozómy s pôvodnou pridanou koncentraciou 1 mg/ml. Taktiež pre určenie antimikrobiálnej aktivity lipozómov s eugenolom by nižšia koncentrácia aktívnych látok nebola dostatočná (kapitola 5.7.1.3).

5.5.2 Stanovenie veľkosti lipozómov

Metódou dynamického rozptylu svetla a podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10.2 bola stanovená veľkosť lipozómov a index polydisperzity (PdI). K meraniu bol využitý prístroj ZetaSizer. V Tabuľke 2 je uvedené porovnanie veľkosti jednotlivých lipozómov s enkapsulovanými aktívnymi látkami o rôznej koncentrácii a tiež veľkosť prázdnych lipozómov. V tejto tabuľke tiež nájdeme porovnanie hodnôt PdI.

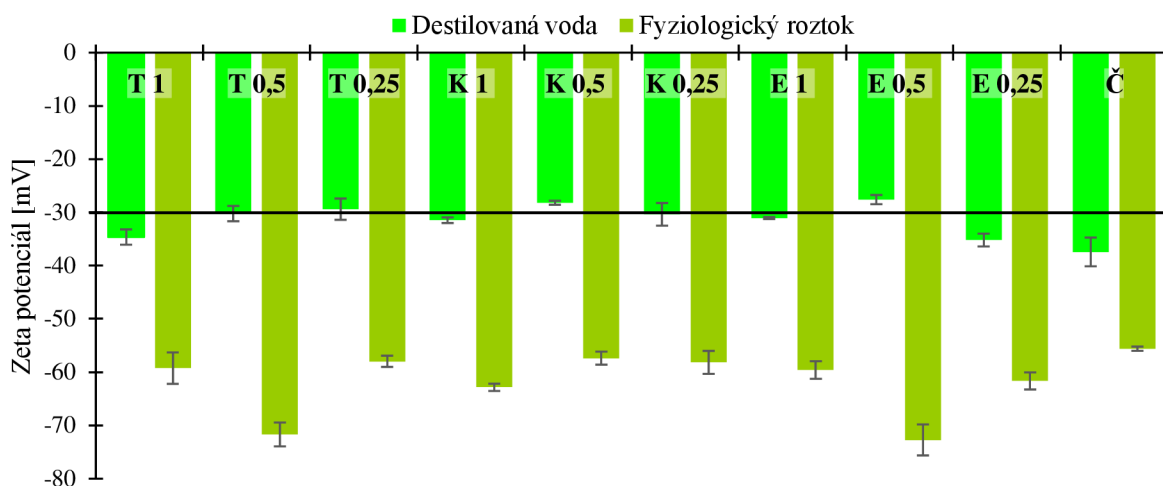
Tabuľka 2: Veľkosť lipozómov a index polydisperzity

Aktívna látka	Koncentrácia aktívnej látky (mg)	Veľkosť (nm)	PdI (-)
Tymol	1,00	$194,13 \pm 1,28$	$0,20 \pm 0,02$
	0,50	$184,50 \pm 6,46$	$0,18 \pm 0,02$
	0,25	$206,03 \pm 1,77$	$0,19 \pm 0,01$
Karvakrol	1,00	$184,50 \pm 1,81$	$0,21 \pm 0,03$
	0,50	$205,30 \pm 2,95$	$0,21 \pm 0,01$
	0,25	$187,47 \pm 1,27$	$0,20 \pm 0,02$
Eugenol	1,00	$243,07 \pm 7,83$	$0,25 \pm 0,01$
	0,50	$187,73 \pm 0,37$	$0,21 \pm 0,01$
	0,25	$199,37 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,01$
Prázdne lipozómy	-	$170,90 \pm 1,63$	$0,16 \pm 0,01$

V tabuľke vidíme, že veľkosť lipozómov sa po prídavku aktívnej látky vždy zväčšila oproti prázdny lipozómom. Lipozómy s veľkosťou $243,07 \pm 7,83$ nm boli preukázané ako najväčšie a obsahovali 1 mg/ml eugenolu. Ako najmenšie lipozómy boli vyhodnotené prázdne lipozómy s veľkosťou $170,90 \pm 1,63$ nm. Index polydisperzity sa pohybuje v rozmedzí 0,16 – 0,25 a môžeme teda konštatovať, že ide o uniformné systémy.

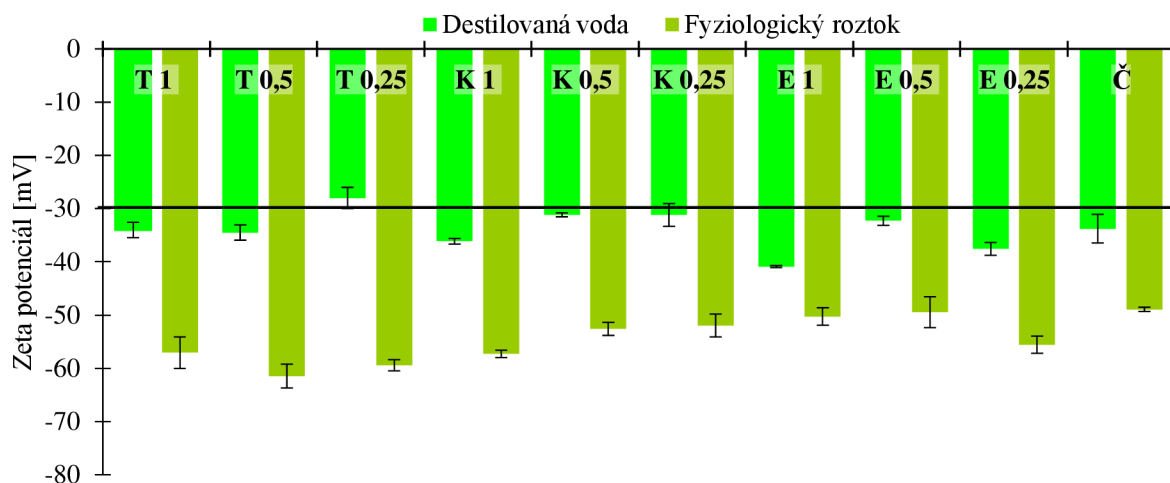
5.5.3 Stanovenie stability lipozómov

Stabilitu lipozómov sme stanovili pomocou prístroja ZetaSizer, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10.3. Lipozómy boli rozsuspendované vždy v dvoch prostredia, a to fyziologický roztok a destilovaná voda. Zeta potenciál u jednotlivých vzoriek bol meraný vždy v čase 0, po 1 týždni a po 1 mesiaci, pričom vzorky boli ponechané pri laboratórnej teplote.



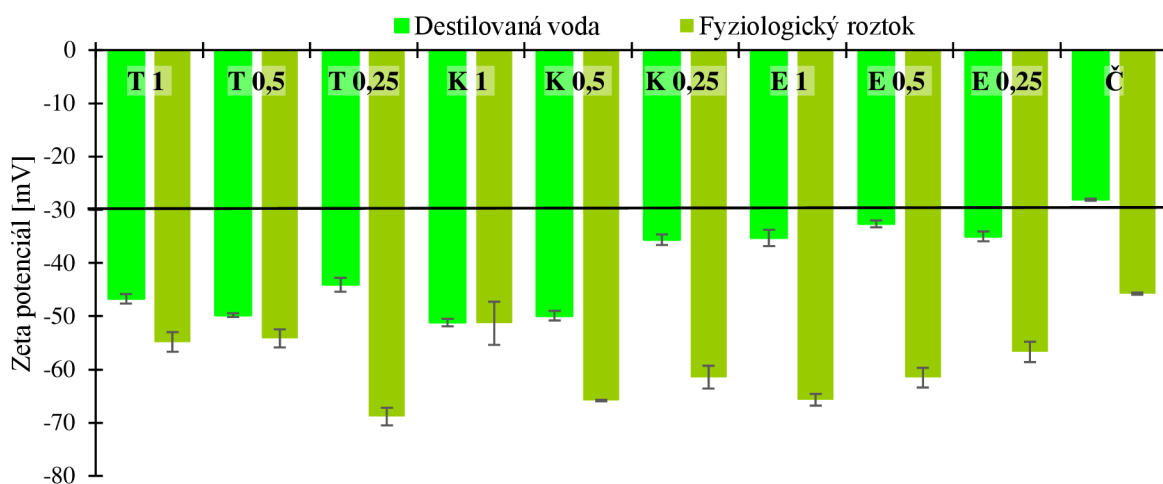
Obrázok 34: Graf stability lipozómov v čase 0 (*T* – tymol; *K* – karvakrol; *E* – eugenol; *Č* – čisté; 1 – koncentrácia 1 mg/ml; 0,5 – koncentrácia 0,5 mg/ml; 0,25 – koncentrácia 0,25 mg/ml)

V grafe (Obrázok 34) vidíme hodnoty Zeta potenciálu všetkých aktívnych látok v troch koncentráciách a tiež čistých lipozómov, hneď po ich príprave. Ak sa častice nachádzajú v rozmedzí Zeta potenciálu -30 až $+30$ mV, ide o nestabilné častice [30]. Pripravené lipozómy sa vo väčšine prípadov vyskytujú mimo tento rozsah hodnôt. Môžeme teda konštatovať, že v oboch prostrediach, destilovaná voda a fyziologický roztok, vykazovali pripravené lipozómy stabilitu. Ak porovnávame oba prostredia, vyššiu stabilitu majú lipozómy rozsuspendované vo fyziologickom roztoku. Zeta potenciál závisí na povrchovom náboji a iónovej sile. V izoelektrickom bode, kedy je náboj častice neutrálny, je vzorka najmenej stabilná. Destilovaná voda neobsahuje žiadne ióny, kdežto fyziologický roztok disociuje na ióny kvôli NaCl. Z tohto dôvodu je aj stabilita lipozómov následne vyššia v prípade fyziologického roztoku [83]. V destilovanej vode vykazovali najvyššiu stabilitu prázdne lipozómy. U lipozómov vo fyziologickom roztoku je stabilita vysoká, pričom najvyššiu stabilitu mali lipozómy s enkapsulovaným eugenolom, o koncentracii 0,5 mg/ml. Naopak najnižšiu stabilitu v destilovanej vode mali častice, ktoré obsahovali 0,5 mg/ml eugenolu a vo fyziologickom roztoku to boli prázdne lipozómy.



Obrázok 35. Graf stability lipozómov po 1 týždni (T – tymol; K – karvakrol; E – eugenol; Č – čisté; 1 – koncentrácia 1 mg/ml; 0,5 – koncentrácia 0,5 mg/ml; 0,25 – koncentrácia 0,25 mg/ml)

V grafe (Obrázok 35) môžeme pozorovať pokles stability u väčšiny sledovaných lipozómov oproti meraniu hneď po príprave. V niektorých prípadoch však došlo k nárastu stability najmä u častíc v destilovanej vode. Lipozómy môžeme však aj naďalej považovať za stabilné.



Obrázok 36: Graf stability lipozómov po 1 mesiaci (T – tymol; K – karvakrol; E – eugenol; Č – čisté; 1 – koncentrácia 1 mg/ml; 0,5 – koncentrácia 0,5 mg/ml; 0,25 – koncentrácia 0,25 mg/ml)

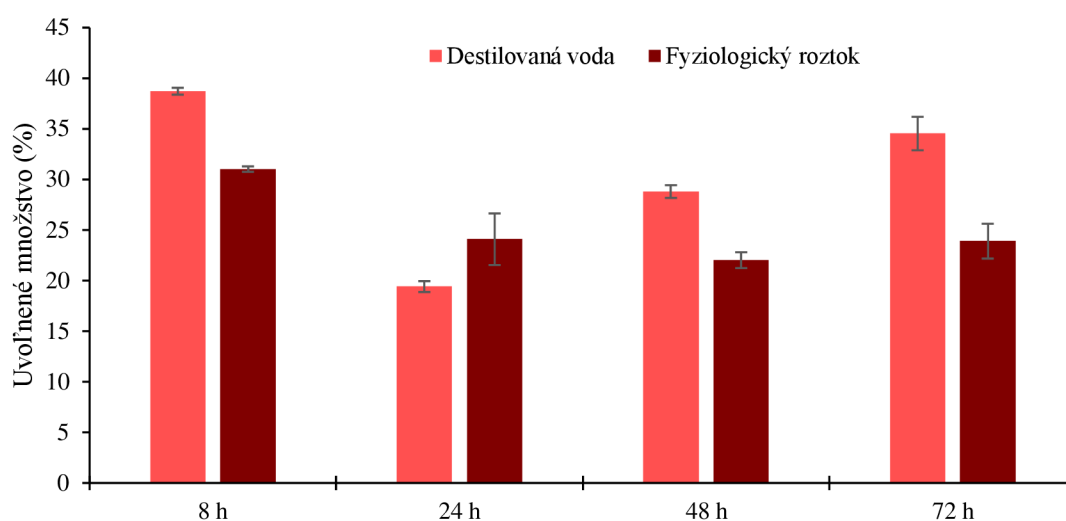
Graf (Obrázok 36) zobrazuje stabilitu lipozómov s aktívnymi látkami. V destilovanej vode došlo k zvýšeniu stability lipozómov oproti meraniu hneď po príprave. Jedinou výnimkou sú čisté lipozómy, kedy došlo k poklesu stability. Vo fyziologickom roztoku sme zaznamenali vo väčšine prípadov mierny pokles stability, no stále ide o mimoriadne stabilné lipozómy. Aj v tomto prípade vidíme výraznejší pokles stability u čistých lipozómov. Môžeme teda konštatovať, že prídavok aktívnych látok mal pozitívny vplyv na stabilitu lipozómov. Ak porovnáme stabilitu lipozómov v oboch prostredia, môžeme vidieť, že vyššiu stabilitu majú častice vo fyziologickom roztoku.

5.6 Postupné uvoľňovanie účinných látok z nanočastíc

Nanočastice boli pripravené na základe postupu v kapitole 4.9. Uvoľnené množstvo aktívnych látok z lipozómov bolo stanovené podľa postupu v kapitole 4.11. V grafoch nižšie (Obrázok 37, Obrázok 38 a Obrázok 39) je znázornené porovnanie uvoľneného množstva látok do dvoch prostredí; destilovaná voda a fyziologický roztok pri 25°C. Prostredie destilovanej vody modeluje laboratórne podmienky a fyziologický roztok sa zasa najviac približuje prostrediu na povrchu pokožky. Sledovali sme uvoľňovanie po 8, 24, 48 a 72 hodinách.

5.6.1 Postupné uvoľňovanie tymolu z nanočastíc

Boli pripravené lipozómy s enkapsulovaným tymolom o koncentracii 1 mg/ml, na základe postupu v kapitole 4.9. Táto koncentrácia bola pre stanovenie postupného uvoľňovania z častíc vybraná z dôvodu, ktorý je podrobnejšie popísaný v kapitole 5.5.1.

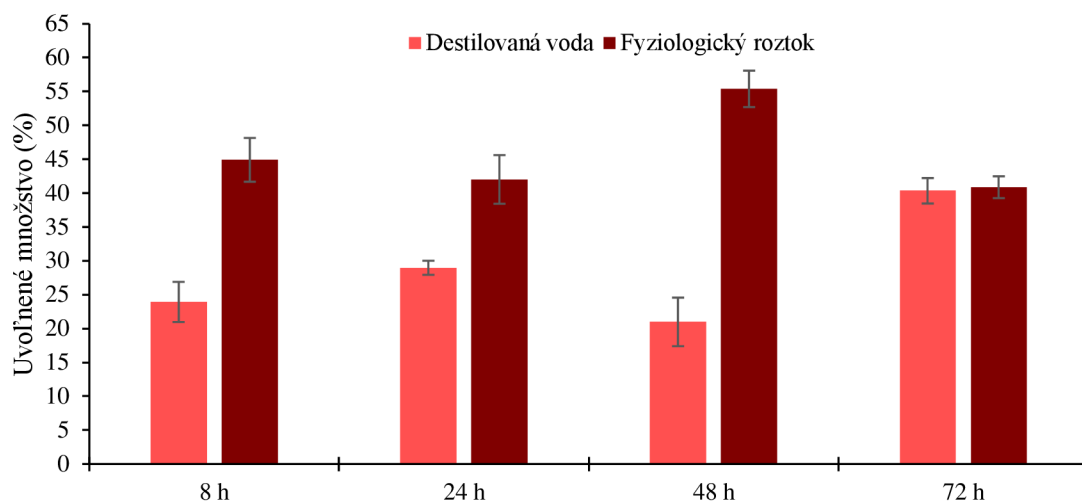


Obrázok 37: Uvoľnené množstvo tymolu z lipozómov do destilovanej vody a fyziologického roztoku

Z grafu (Obrázok 37) vidíme, že najvyššie množstvo tymolu sa uvoľnilo v prostredí destilovanej vody po 8 hodinách. Uvoľnené množstvo činí $38,71 \pm 0,34 \%$ z celkového pridaného množstva tymolu. Hodnoty po 24 hodinách klesli, no po 48 a 72 hodinách sa znova postupne zvyšovali. Do fyziologického roztoku sa uvoľnilo najväčšie množstvo taktiež po 8 hodinách, a to $31,02 \pm 0,27 \%$. Pri porovnaní oboch prostredí zistujeme, že vo väčšine prípadov, sa vyššie množstvo tymolu uvoľňovalo do destilovanej vody. Môžeme teda konštatovať, že vo fyziologickom roztoku sú lipozómy s enkapsulovaným tymolom stabilnejšie. Fakt, že uvoľnené množstvo postupom času stúpa a následne klesá si vysvetľujeme postupnou degradáciou uvoľneného tymolu. Opätovný nárast môže byť spôsobený postupným uvoľnením tymolu z rozpadajúcich sa lipozómov. Taktiež mohlo v prípade uvoľňovania po 72 hodinách do destilovanej vody dôjsť k nárazovému uvoľneniu tymolu.

5.6.2 Postupné uvoľňovanie karvakrolu z nanočastíc

Do lipozómov bolo enkapsulovaných 0,25 mg/ml karvakrolu podľa postupu v kapitole 4.9. Táto koncentrácia bola vybraná, pretože tu bola pozorovaná najvyššia enkapsulačná účinnosť karvakrolu spomedzi testovaných koncentracii (kapitola 5.5.1).

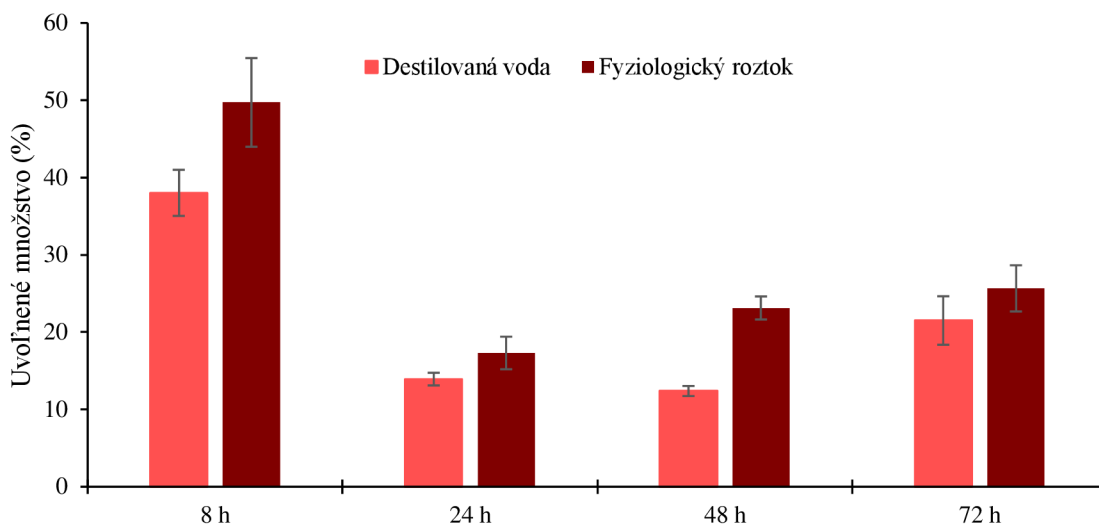


Obrázok 38: Uvoľnené množstvo karvakrolu z lipozómov do destilovanej vody a fyziologického roztoku

Priebeh postupného uvoľňovanie karvakrolu vidíme v grafe vyššie (Obrázok 38). Najvyššie množstvo karvakrolu bolo uvoľnené po 48 hodinách do fyziologického roztoku, a to $55,39 \pm 2,39\%$. Vzhľadom k tomu, že množstvo uvoľnenej látky prudko stúplo, mohlo dôjsť k nárazovému uvoľneniu karvakrolu pri odštiepení malého kúska lipozómu. V prípade destilovanej vody bolo zaznamenané najvyššie množstvo uvoľneného karvakrolu po 72 hodinách, a to $40,34 \pm 1,88 \%$. Vo všetkých meraných časoch, došlo k uvoľneniu vyššieho množstva karvakrolu do fyziologického roztoku ako do destilovanej vody. Fakt, že sa do fyziologického roztoku dokáže uvoľniť viac látky, môže byť spôsobený osmotickým stresom. Vplyvom rozdielnej koncentrácie prostredia, ktoré obklopuje lipozómy a koncentrácie vo vnútri lipozómu, sa tvoria póry v membráne lipozómov a látka tak môže lepšie prenikať do prostredia. Tento rozdiel je pravdepodobne vyšší u fyziologického roztoku ako u destilovanej vody [84].

5.6.3 Postupné uvoľňovanie eugenolu z nanočastíc

V prípade eugenolu bolo enkapsulovaných 1 mg/ml podľa postupu v kapitole 4.9 a bolo otestované postupné uvoľňovanie eugenolu z lipozómov. Táto koncentrácia bola zvolená na základe orientačných experimentov. Taktiež pre otestovanie antimikrobiálnej aktivity lipozómov funkcionalizovaných eugenolom by nižšia koncentrácia eugenolu, nebola dostatočná (kapitola 5.7.1.3).



Obrázok 39: Uvoľnené množstvo eugenolu z lipozómov do destilovanej vody a fyziologického roztoku

Porovnaním hodnôt uvoľneného množstva v grafe (Obrázok 39) zistíme, že najviac eugenolu sa uvoľnilo po 8 hodinách do fyziologického roztoku. Uvoľnené množstvo činí $47,02 \pm 8,44$ mg/ml. U destilovanej vody sa rovnako najväčšie percento uvoľnilo po 8 hodinách, a to $38,02 \pm 2,98$ mg/ml. Uvoľňovanie eugenolu po 24 hodinách prudko kleslo a potom sa znova mierne zvyšovalo, no nedosahovalo už tak vysokých hodnôt. Predpokladáme, že došlo k výraznej degradácii uvoľneného eugenolu, ktorá môže byť spôsobená napríklad svetlom [79].

Ak porovnáme všetky aktívne látky, najväčšie percentá uvoľneného množstva sme získali u karvakrolu, pričom vyššie množstva boli uvoľnené do fyziologického roztoku (Obrázok 38). Konkrétne sa najviac karvakrolu uvoľnilo po 48 hodinách, do fyziologického roztoku, a to $55,39 \pm 2,39$ %.

5.7 Antimikrobiálne testy

Na základe postupov, ktoré sú zhrnuté v kapitole 4.12 bola otestovaná antimikrobiálna aktivita samotných aktívnych látok, ďalej funkcionalizovaných nanovláčien a taktiež funkcionalizovaných nanočastíc. Vo všetkých prípadoch bola využívaná bujónová dilučná metóda. Grampozitívne baktérie vybrané pre toto testovanie boli *Cutibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis*. Z gramnegatívnych baktérii bola ako zástupca vybraná *Escherichia coli*. Následne boli vykonané aj resazurínové testy viability mikrobiálnych buniek. *S. epidermidis* a *C. acnes* sú prirodzenou súčasťou mikrobiómu pokožky, no pri premnožení spôsobujú kožné ochorenia, ako napríklad *acne vulgaris* alebo sa pri narušení kože môžu dostávať do krvného riečiska [38; 41]. *E. coli* môže tiež spôsobovať infekcie u ľudí so zníženou imunitou [43]. Cieľom bolo preto zistiť, či pripravené nanovláčienka, nanočastice a samotné účinné látky majú antimikrobiálny efekt voči týmto baktériám.

5.7.1 Antimikrobiálny účinok aktívnych látok

Ako prvé sme otestovali antimikrobiálnu aktivitu účinných látok a tiež samotného rozpúšťadla o určitej koncentrácii. Všetky látky boli rozsuspendované v DMSO a boli pripravené ich koncentračné rady. Pomocou bujónovej dilučnej metódy bola hľadaná minimálna inhibičná

koncentrácia látok (MIC₈₀). Ide o koncentráciu, ktorá inhibuje rast mikroorganizmov z viac ako 80 % [78]. Postup tohto stanovenia je uvedený v kapitole 4.12.1.1. Resazurínový test bol prevedený podľa postupu v kapitole 4.12.2.

Resazurínový test je založený na meraní viability buniek, na základe ich metabolickej aktivity. Zatiaľ čo bujónová dilučná metóda meria zákal. Ten môže byť ovplyvnený bunkami, ktoré sú intaktné, ale už nie sú živé. Preto môže dôjsť k určitým rozdielom vo výsledkoch týchto dvoch testov.

5.7.1.1 DMSO

Aby sme vylúčili vplyv rozpúšťadla na inhibičný účinok testovaných látok, boli pripravené tiež koncentračné rady dimethylsulfoxidu, teda DMSO. Toto rozpúšťadlo bolo použité z dôvodu, že aktívne látky, s ktorými pracujeme sú hydrofóbne, no v DMSO ich nie je problém rozpustiť. Účinok DMSO na testované mikroorganizmy môžeme pozorovať v tabuľke nižšie (Tabuľka 3).

Tabuľka 3: Vplyv rozpúšťadla na mikroorganizmy ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

c (%)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
25,00	++	++	+
12,50	-	+	-
6,25	-	-	-
3,12	-	-	-
1,56	-	-	-
0,78	-	-	-
0,39	-	-	-
0,20	-	-	-

V prípade testovania antimikrobiálnej aktivity účinných látok bola použitá prvotná koncentrácia rozpúšťadla 10 %. Táto koncentrácia odpovedala koncentrácií 8,00 mg/ml aktívnej látky. Následne bolo DMSO spolu s látkou nariadené. V tabuľke vidíme, že pri koncentrácií 12,50 % má DMSO inhibičný účinok menej ako 0 % u *C. acnes* a tiež u *E. coli*. Na inhibičný účinok aktívnych látok koncentrácia DMSO 10 % nemá teda žiadny vplyv. V prípade *S. epidermidis* 12,50 % DMSO vykazuje inhibičný účinok na (9,62 ± 6,30) %. Vzhľadom k tomu, že MIC₈₀ bola u všetkých látok nižšia ako 8,00 mg/ml (čo odpovedá 10 % DMSO), môžeme tvrdiť, že ani pri stanovení MIC₈₀ u *S. epidermidis* nemalo rozpúšťadlo žiaden vplyv na získané výsledky.

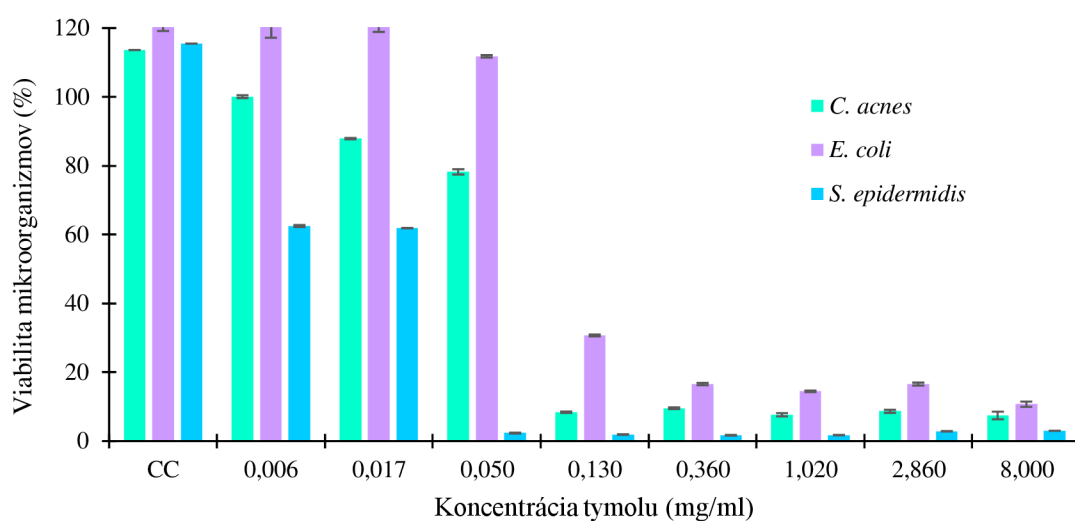
5.7.1.2 Tymol

V tabuľke (Tabuľka 4) je uvedená antimikrobiálna aktivita tymolu pre všetky testované mikroorganizmy stanovená bujónovou dilučnou metódou. Koncentrácia, pri ktorej bola inhibícia rastu viac ako 80% bola braná ako minimálna inhibičná koncentrácia [78]. Vyznačené hodnoty v tabuľke predstavujú MIC₈₀. V grafe (Obrázok 40) vidíme výsledky resazurínového testu.

Tabuľka 4: Antimikrobiálna aktivita tymolu ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

c (mg/ml)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
8,000	++++	++++	++++
2,860	++++	++++	++++
1,020	++++	++++	++++
0,360	++++	++++	++++
0,130	++++	++++	++++
0,050	+++	++++	+
0,017	++	+++	+
0,006	+	+++	-

Ako môžeme vidieť, MIC₈₀ tymolu pre *C. acnes* bola stanovená na 0,130 mg/ml. V tabuľke tiež môžeme vyčítať, že v prípade baktérie *S. epidermidis* bola MIC₈₀ stanovená na 0,050 mg/ml. Pri nižších testovaných koncentráciách ako je MIC₈₀ bola tiež preukázaná vysoká inhibičná účinnosť tymolu na *S. epidermidis*. U *E. coli* sa MIC₈₀ nachádza pri koncentrácií tymolu 0,130 mg/ml. Pri koncentrácií 0,006 mg/ml a nižšej už nemal tymol na rast *E. coli* žiadny vplyv.



Obrázok 40: Viabilita mikrobiálnych buniek po pôsobení tymolu (CC = kontrola buniek)

V grafe (Obrázok 40) vidíme výsledky resazurínového testu. Bola vypočítaná viabilita mikrobiálnych buniek pri všetkých testovaných koncentráciách. U všetkých mikroorganizmov môžeme pozorovať výraznejší nárast viability buniek pri koncentrácií nižšej ako je MIC₈₀ stanovená dilučnou metódou. Najnižšiu viabilitu pri použití tymolu pozorujeme u *S. epidermidis*. V rozmedzí testovanej koncentračnej rady viabilita *S. epidermidis* nepresiahla ani 65 %. Výsledky resazurínového testu korelujú s výsledkami bujónovej dilučnej metódy (Tabuľka 3).

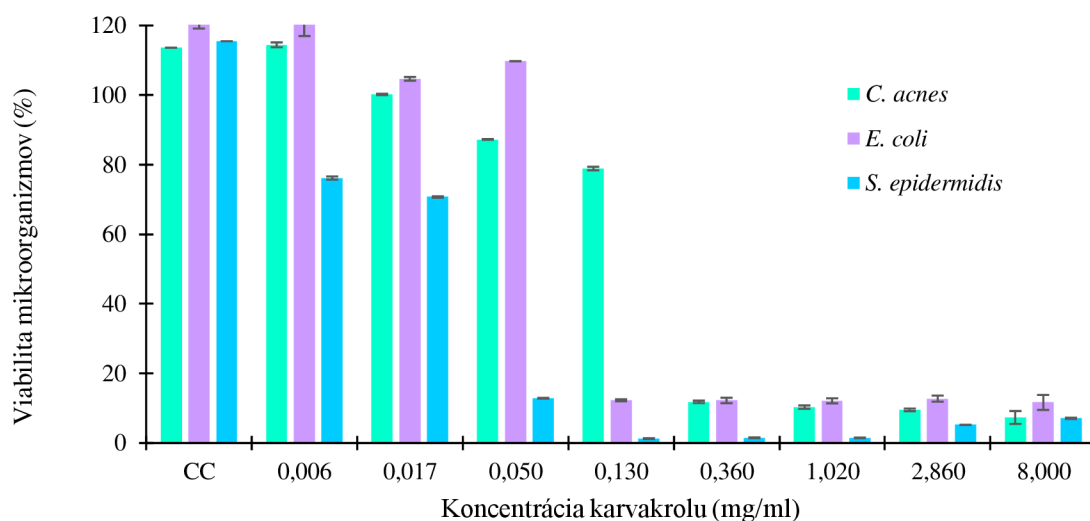
5.7.1.3 Karvakrol

V tabuľke (Tabuľka 5) môžeme nájsť porovnanie antimikrobiálnej aktivity karvakrolu voči testovaným mikroorganizmom. Boli pripravené koncentračné rady karvakrolu a zistená MIC₈₀ [78]. V grafe (Obrázok 41) ďalej nájdeme zobrazenie viability buniek pomocou resazurínového testu.

Tabuľka 5: Antimikrobiálna aktivita karvakrolu ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

c (mg/ml)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
8,000	++++	++++	++++
2,860	++++	++++	++++
1,020	++++	++++	++++
0,360	++++	++++	++++
0,130	+++	++++	++++
0,050	++	++++	+++
0,017	+	++	+
0,006	+	++	+

Vo vyhotovenej tabuľke môžeme vidieť, že MIC₈₀ u karvakrolu pre *C. acnes* bola stanovená na 0,360 mg/ml. Ďalej pre baktériu *S. epidermidis* táto hodnota činí 0,050 mg/ml. Inhibícia rastu z viac ako 80 % karvakrolom u *E. coli* nastáva pri koncentrácií 0,130 mg/ml.



Obrázok 41: Viability mikrobiálnych buniek po pôsobení karvakrolu (CC = kontrola buniek)

K výraznému nárastu buniek *E. coli* dochádza až u koncentrácie 0,050 mg/ml. V prípade *C. acnes* dochádza k zvýšeniu viability u koncentrácie karvakrolu 0,130 mg/ml a u baktérie *S. epidermidis* je to koncentrácia 0,017 g/ml. Aj napriek tomu, že resazurínový test a bujónová dilučná metóda sú založené na inom princípe merania, výsledky uvedené v tabuľke (Tabuľka 4) korelujú s grafom viability buniek zobrazeným vyššie (Obrázok 41).

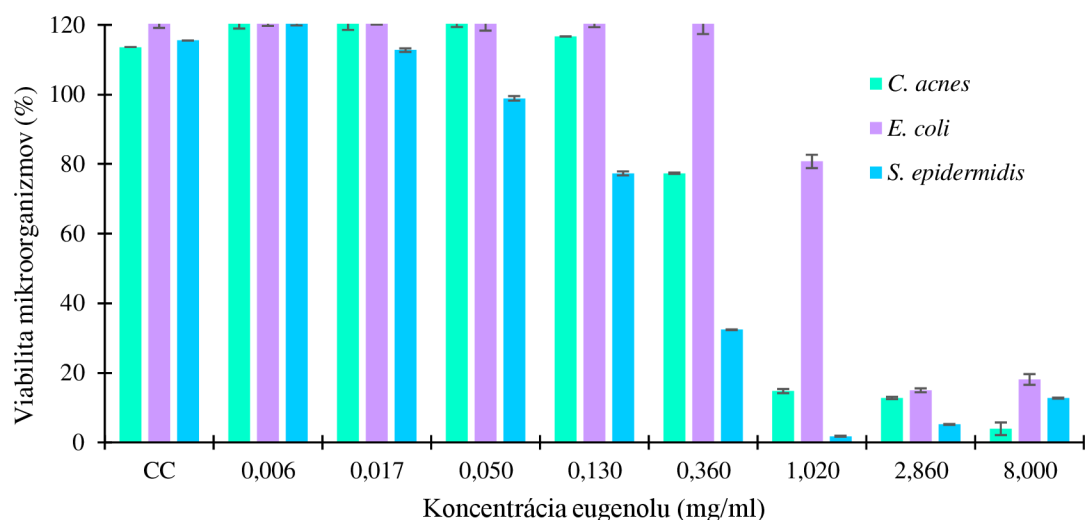
5.7.1.4 Eugenol

Tabuľka uvedená nižšie (Tabuľka 6) zobrazuje koncentračnú radu eugenolu, ktorá bola otestovaná voči 3 baktériám. Výsledky rezazurínového testu vidíme v grafe (Obrázok 42).

Tabuľka 6: Antimikrobiálna aktivita eugenolu ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

c (mg/ml)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
8,000	++++	++++	++++
2,860	++++	++++	++++
1,020	++++	++++	+++
0,360	+++	+++	-
0,130	+	++	-
0,050	-	+	-
0,017	-	+	-
0,006	-	-	-

V prípade eugenolu sú hodnoty MIC₈₀ vyššie ako tomu bolo u zvyšných dvoch testovaných látok. Pre baktériu *C. acnes* bola táto koncentrácia stanovená na 1,02 mg/ml. Rast *S. epidermidis* je možné z viac ako 80 % inhibovať eugenolom o koncentracii 1,02 mg/ml. U *E. coli* hodnota MIC₈₀ dosahuje až 2,86 mg/ml.



Obrázok 42: Viabilita mikrobiálnych buniek po pôsobení eugenolu (CC = kontrola buniek)

Z grafu (Obrázok 42), ktorý zobrazuje viabilitu buniek pri vystavení eugenolu, môžeme vidieť, že namerané hodnoty sa zhodujú s hodnotami uvedenými v tabuľke vyššie (Tabuľka 6). U *C. acnes* sme zaznamenali výraznejší nárast viability pri koncentracii eugenolu 0,36 mg/ml, u *E. coli* pri koncentracii 1,020 mg/ml a u *S. epidermidis* je to koncentrácia 0,36 g/ml.

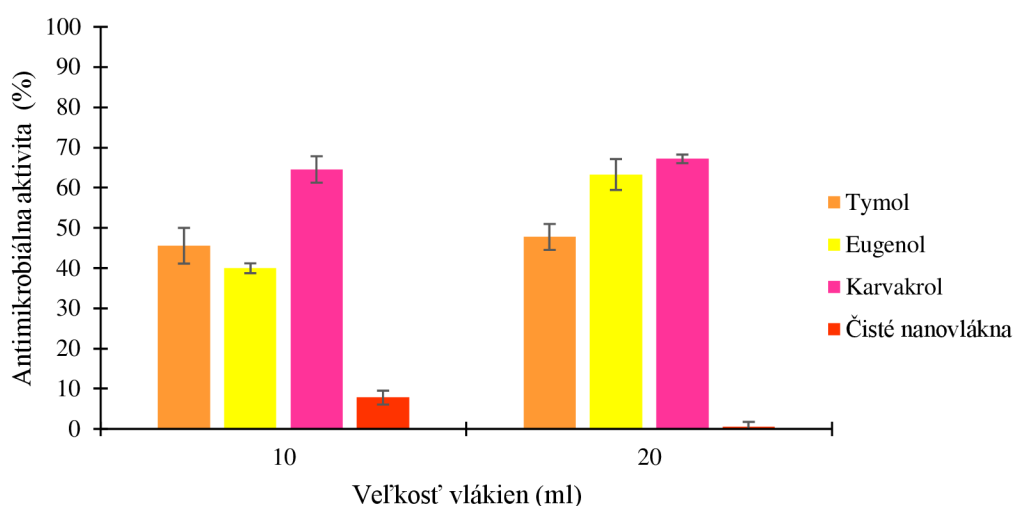
Pri porovnaní všetkých aktívnych látok zistíme, že tymol a karvakrol vykazujú voči testovaným mikroorganizmom podobne vysokú antimikrobiálnu aktivitu. Eugenol sa však líši výraznejšie. Na inhibíciu rastu mikroorganizmov bolo potrebné použiť vyššie koncentrácie aktívnej látky. Preto môžeme konštatovať, že eugenol má najnižší antimikrobiálny účinok spomedzi týchto

troch aktívnych látok. *Olasupo N.A. a kol.* zistili, že tymol a karvakrol vykazujú voči *E. coli* približne rovnakú antimikrobiálnu aktivitu, no v prípade eugenolu je na inhibíciu rastu tejto baktérie potrebná vyššia koncentrácia [85].

Všetky otestované aktívne látky boli do určitej koncentrácie preukázané ako účinné antimikrobiálne látky. Preto by mohli byť použité v kozmetických výrobkoch ako konzervanty a zároveň tiež k liečbe kožných ochorení, ako napríklad akné. Je však potrebné zabezpečiť, aby tieto látky pôsobili iba v mieste potreby a neovplyvňovali aj okolitý kožný mikrobióm. Pre tento účel by boli potrebné rozsiahlejšie testy.

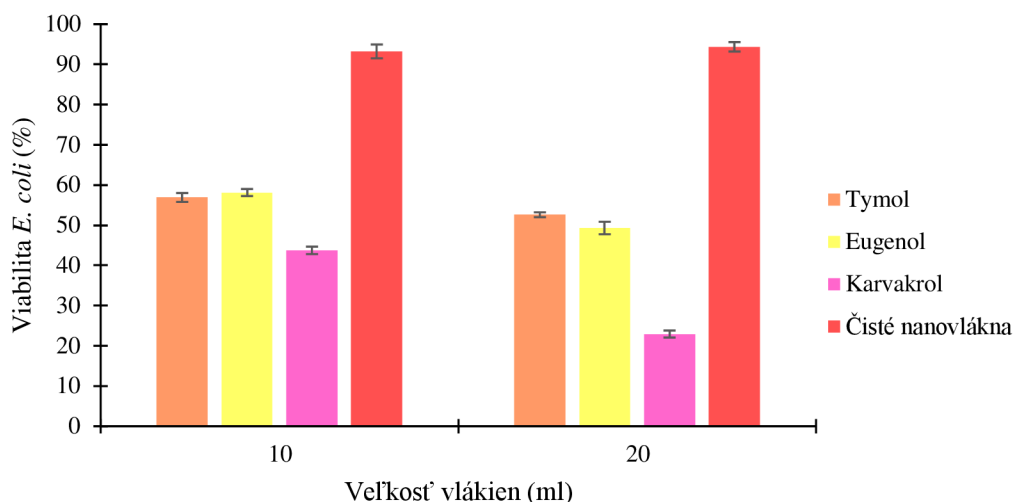
5.7.2 Antimikrobiálna aktivita PHB nanovlákién

Nanovlákná boli pripravené metódou forspinningu zo 4 % roztoku PHB na základe postupu v kapitole 4.6. Antimikrobiálna aktivita funkcionalizovaných nanovlákién a tiež čistých vlákién bola otestovaná podľa postupu v kapitole 4.12.1.2. Boli otestované nanovlákná o veľkosti 10 ml aj 20 ml, vždy v triplikátoch. Do každého vlákná bolo pridaných 10 % aktívnej látky z pevného podielu PHB. K tomuto stanoveniu bola využitá bujónová dilučná metóda v 24 – jamkovej mikrotitračnej doštičke. Resazurínový test bol uskutočnený podľa postupu popísaného v kapitole 4.12.2.



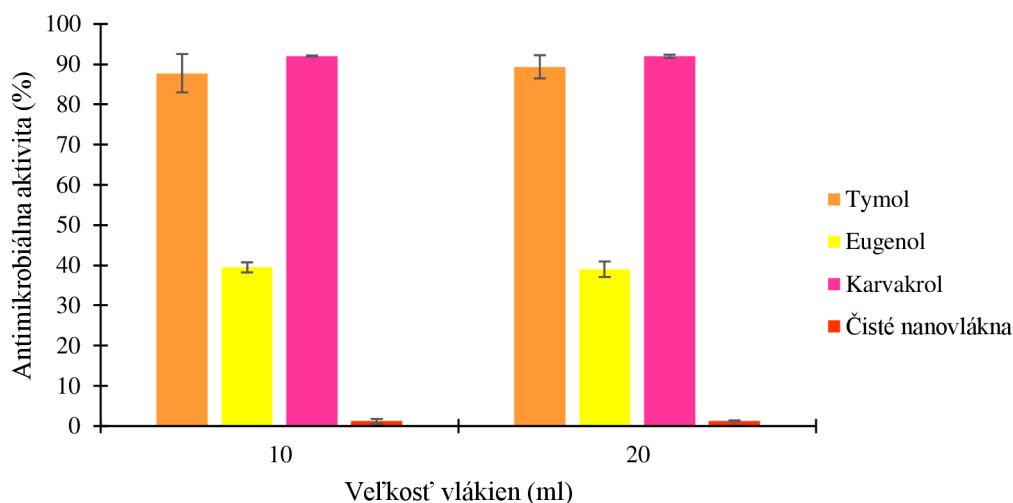
Obrázok 43: Antimikrobiálna aktivita PHB nanovlákién s enkapsulovanými aktívnymi látkami voči baktérii *E. coli*

V grafe (Obrázok 43) vidíme antimikrobiálny účinok všetkých testovaných aktívnych látok enkapsulovaných do nanovlákién a taktiež účinok nanovlákién bez prídavku účinnej látky. Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu voči *E.coli* vykazujú nanovlákná funkcionalizované karvakrolom, ktoré boli pripravené z 20 ml PHB, a to $67,17 \pm 1,06$ %. Naopak najnižší účinok mali vlákná o objeme 10 ml s enkapsulovaným eugenolom, a to $39,97 \pm 1,22$ %. Môžeme pozorovať, že čisté nanovlákná nemajú vplyv na inhibičný účinok samotných aktívnych látok, pretože nemajú skoro žiaden antimikrobiálny účinok.



Obrázok 44: Viabilita baktérie *E. coli* po pôsobení PHB nanovlákiem s enkapsulovanými aktívnymi látkami

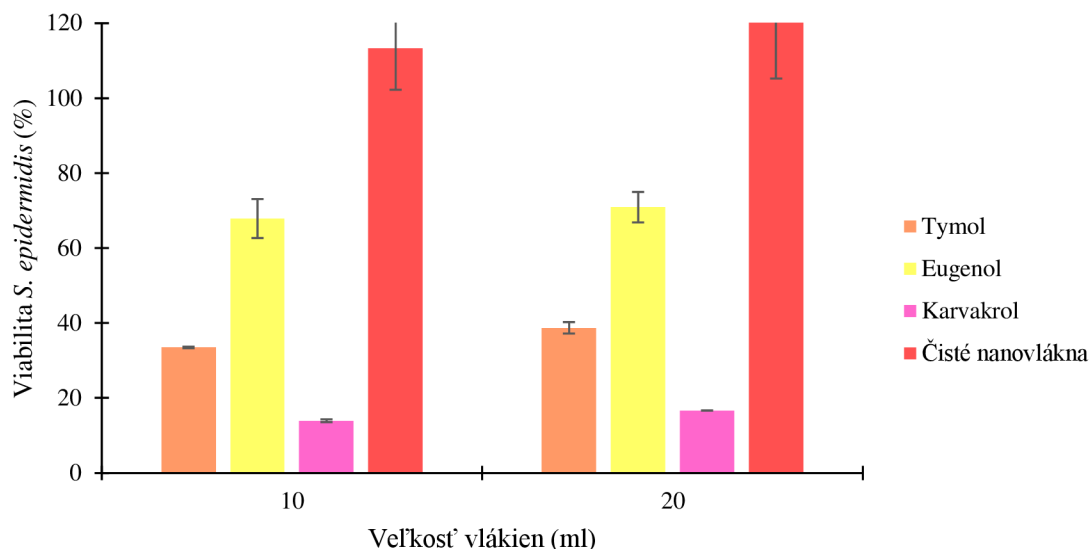
Graf (Obrázok 44) zobrazuje výsledky resazurínového testu. Test je založený na meraní metabolickej aktivity buniek. Ako vidíme, tieto výsledky korelujú s dátami získanými pomocou bujónovej dilučnej metódy (Obrázok 43). K menším odchýlkam môže dochádzať z dôvodu, že bujónová dilučná metóda je založená na odlišnom princípe merania. U tejto metódy je meraný zákal spôsobený prítomnosťou mikroorganizmov. V niektorých prípadoch ale môže dôjsť k tomu, že baktérie zostávajú intaktné, no už nie sú živé.



Obrázok 45: Antimikrobiálna aktivita PHB nanovlákiem s enkapsulovanými aktívnymi látkami voči baktérii *S. epidermidis*

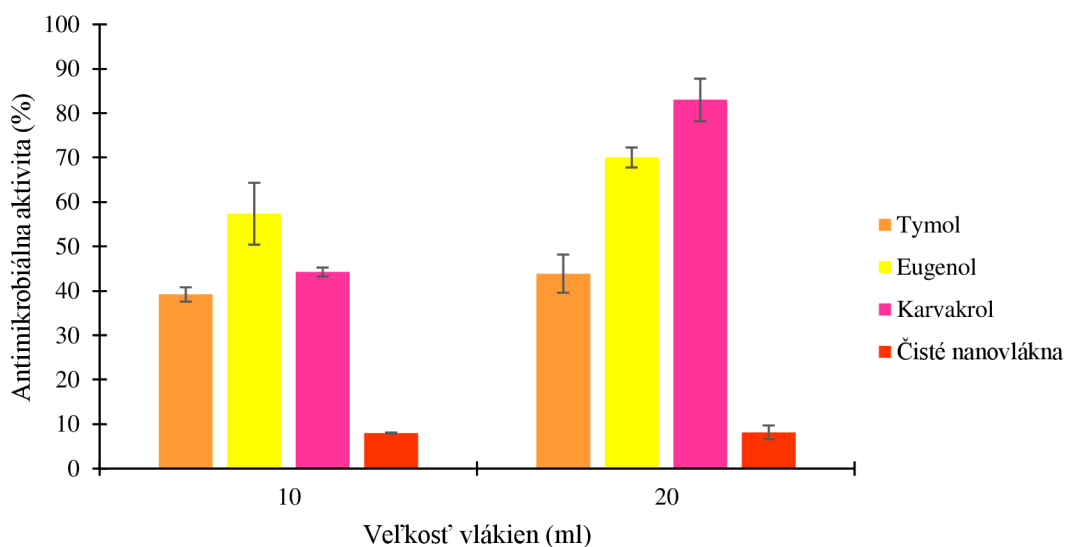
Na obrázku vyššie (Obrázok 45) vidíme antimikrobiálnu aktivitu enkapsulovaných látok do nanovlákiem a tiež čistých vlákien voči *S. epidermidis*. Tymol a karvakrol v nanovláknach vykazujú voči tejto baktérii vysokú antimikrobiálnu aktivitu. Najvyššiu hodnotu sme zaznamenali u enkapsulovaného karvakrolu do 10 ml nanovlákiem, a to $92,03 \pm 0,12 \%$. V prípade eugenolu je však antimikrobiálna aktivita nižšia. Ak porovnáme medzi sebou nanovlákná s aktívnymi látkami pripravené z 10 ml PHB s nanovláknami o objeme PHB 20 ml,

zistíme, že ich antimikrobiálny účinok je porovnateľne vysoký. Na grafe tiež pozorujeme, že čisté nanovlákná nemajú vplyv na účinok aktívnych látok.



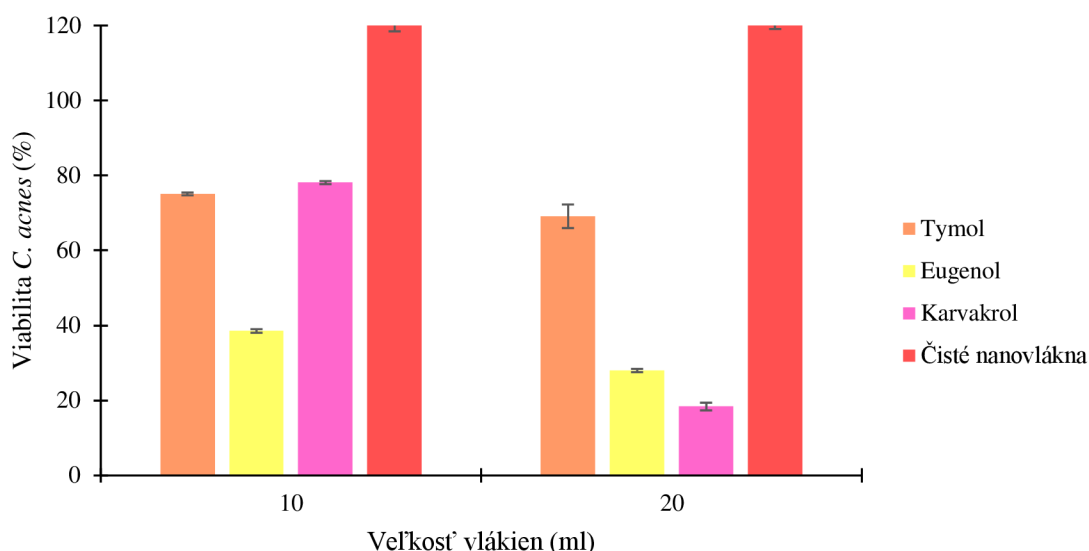
Obrázok 46: Viabilita baktérie *S. epidermidis* po pôsobení PHB nanovlákiem s enkapsulovanými aktívnymi látkami

Hodnoty viability stanovené resazurínovým testom u *S. epidermidis* sú uvedené v grafe vyššie (Obrázok 46). Pri porovnaní s grafom, ktorý bol zostavený na základe merania zákalu dilučnou metódou (Obrázok 45) môžeme vidieť, že došlo k určitým rozdielom oproti výsledkom resazurínového testu, a to hlavne u thymolu a nanovlákiem bez aktívnych látok. To môže byť spôsobené intaktnosťou buniek, ktoré sa vyskytovali v jamôčkach pri meraní zákalu, no už neboli živé. Kdežto u resazurínového testu meriame metabolickú aktivitu a tej sú schopné len živé bunky.



Obrázok 47: Antimikrobiálna aktivita PHB nanovlákiem s enkapsulovanými aktívnymi látkami voči baktérii *C. acnes*

Graf (Obrázok 47) zobrazuje antimikrobiálnu aktivitu funkcionalizovaných nanovláknien voči baktérii *C. acnes*. Nanovlákná pripravené z 20 ml PHB vykazujú vyšší antimikrobiálny účinok ako 10 ml nanovlákná, a to najmä u karvakrolu. Ako sme si overili v kapitole 5.3.2 z vláknien s pridaným objemom PHB 20 ml sa dokáže uvoľniť vyššie množstvo karvakrolu ako z 10 ml nanovláknien. Je to pravdepodobne spôsobené väčším adsorpčným povrchom vláknien a tiež väčším povrchom, ktorý môže reagovať s prostredím. Najvyššia zaznamenaná antimikrobiálna aktivita karvakrolu voči *C. acnes* predstavuje $82,99 \pm 4,80 \%$.



Obrázok 48: Viabilita baktérie *C. acnes* po pôsobení PHB nanovláknien s enkapsulovanými aktívnymi látkami

Viabilita buniek zobrazená v grafe vyššie (Obrázok 48) potvrdzuje výsledky získané bujónovou dilučnou metódou. K menším odchýlkam došlo v dôsledku toho, že resazurínový test a dilučná metóda sú založené na odlišnom princípe merania. Vysoká viabilita u čistých nanovláknien môže byť spôsobená tým, že PHB podporuje rast baktérií. Mikroorganizmy dokážu využívať PHB ako zdroj uhlíka a energie [86].

Na základe týchto zistení môžeme konštatovať, že takto pripravené PHB nanovlákná s enkapsulovanými antimikrobiálnymi látkami vykazujú vysokú antimikrobiálnu aktivitu. Mohli by byť teda použité pri výrobe pleťových masiek pre liečbu akné a iných ochorení kože. Ďalšou možnosťou je ich použitie v náplastiach na akné, ktoré urýchľujú hojenie, že znižujú riziko šírenia infekcie.

5.7.3 Antimikrobiálna aktivita lipozómov

Lipozómy boli pripravené na základe postupu v kapitole 4.9. Antimikrobiálna aktivita bola otestovaná podľa postupu v kapitole 4.12.1.3. Testované aktívne látky vykazovali najlepšiu enkapsulačnú účinnosť do lipozómov pri koncentracii 0,25 mg/ml. Preto sme u karvakrolu túto koncentráciu použili aj k otestovaniu antimikrobiálnej aktivity lipozómov. U tymolu boli však použité lipozómy o koncentracii aktívnej látky 1 mg/ml, ako v predchádzajúcich experimentoch. U eugenolu sme pri testovaní antimikrobiálnej aktivity samotnej látky zistili (kapitola 5.7.1.4), že koncentrácia 0,25 mg/ml by nebola dostatočná pre inhibíciu rastu

použitých baktérií. Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity lipozómov s eugenolom bola preto použitá koncentrácia 1 mg/ml. Antimikrobiálna aktivita bola zameraná po 24 hodinách a tiež po 48 hodinách inkubácie.

5.7.3.1 Lipozómy s enkapsulovaným tymolom

V tabuľke (Tabuľka 7) vidíme antimikrobiálny účinok lipozómov, do ktorých bol enkapsulovaný tymol. Do prvej jamôčky bolo pridané množstvo lipozómov s koncentráciou tymolu 1 mg/ml, ktoré predstavuje 100 % z celkového pridaného objemu. Toto množstvo častíc bolo následne s každou ďalšou jamôčkou nariadené dvakrát.

Tabuľka 7: Antimikrobiálny účinok lipozómov s enkapsulovaným tymolom ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

Množstvo častíc (obj. %)	Čas inkubácie (h)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
100,00	24	++	++++	++++
50,00		+	++	++
25,00		-	++	+
12,50		-	+	-
6,25		-	-	-
3,13		-	-	-
1,56		-	-	-
100,00		48	+	++
50,00	-		++	++
25,00	-		++	-
12,50	-		-	-
6,25	-		-	-
3,13	-		-	-
1,56	-		-	-

Po 24 – hodinovej inkubácii bol u *S. epidermidis* a tiež *E. coli* zaznamenaný vysoký antimikrobiálny účinok lipozómov s tymolom pri prídavku 100% z celkového množstva lipozómov. Konkrétne bol tento účinok u *S. epidermidis* $99,50 \pm 2,50$ % a u *E. coli* $96,56 \pm 0,62$ %. Pri baktérii *C. acnes* už antimikrobiálna aktivita nedosahovala tak vysokých hodnôt ($39,07 \pm 5,20$ %). Vo všetkých prípadoch následne dochádzalo k zníženiu antimikrobiálnej aktivity s klesajúcim zastúpením lipozómov v jamôčke.

Predĺžená inkubácia doštičiek na 48 hodín vo väčšine prípadov spôsobila zníženie antimikrobiálnej aktivity lipozómov s enkapsulovaným tymolom. Iba v prípade baktérie *E. coli* pri 100% množstve častíc môžeme pozorovať vysoký antimikrobiálny účinok, a to $92,06 \pm 3,89$ %. Rovnako pri najvyššom zastúpení častíc (100 %) je u *S. epidermidis* aktivita tymolu v lipozómoch už menšia ako 50 % ($44,89 \pm 5,43$ %) a u *C. acnes* je antimikrobiálna aktivita už len $13,46 \pm 2,51$ %.

Môžeme vidieť, že pri zvýšení času inkubácie došlo k zníženiu antimikrobiálneho účinku lipozómov s enkapsulovaným tymolom. Mohlo k tomu dôjsť z dôvodu, že tymol postupom času vplyvom svetla degraduje, ako sme si to overili v kapitole 5.5.

5.7.3.2 Lipozómy s enkapsulovaným karvakrolom

V tabuľke (Tabuľka 8) je uvedená antimikrobiálna aktivita karvakrolu po 24 hodinách a 48 hodinách inkubácie. Do lipozómov bola enkapsulovaná koncentrácia karvakrolu 0,25 mg/ml.

Tabuľka 8: Antimikrobiálny účinok lipozómov s enkapsulovaným karvakrolom ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

Množstvo častíc (obj. %)	Čas inkubácie (h)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
100,00	24	-	+	+
50,00		-	-	-
25,00		-	-	-
12,50		-	-	-
6,25		-	-	-
3,13		-	-	-
1,56		-	-	-
100,00		48	-	+++
50,00	-		++	-
25,00	-		-	-
12,50	-		-	-
6,25	-		-	-
3,13	-		-	-
1,56	-		-	-

Z tabuľky (Tabuľka 8) môžeme vidieť, že lipozómy s enkapsulovaným karvakrolom nemali na baktériu *C. acnes* žiadny antimikrobiálny vplyv. Koncentrácia karvakrolu 0,25 mg/ml v lipozómoch nebola pravdepodobne dostatočná na inhibíciu rastu tejto baktérie. U baktérie *S. epidermidis* a tiež *E. coli* vidíme po 24 – hodinovej inkubácii určitý antimikrobiálny účinok, no nepresiahol ani 30 %. Antimikrobiálna aktivita pri 100% množstve častíc voči *S. epidermidis* činila $11,70 \pm 0,81$ % a voči baktérii *E. coli* $17,58 \pm 0,71$ %.

V prípade 48 – hodinovej inkubácie môžeme pozorovať zvýšenie antimikrobiálnej aktivity voči *S. epidermidis*. Koncentrácia karvakrolu 0,25 mg/ml inhibovala rast tejto baktérie s viac ako 50% účinnosťou ($68,11 \pm 3,00$ %).

5.7.3.3 Lipozómy s enkapsulovaným eugenolom

V tabuľke (Tabuľka 9) je popísaný antimikrobiálny účinok lipozómov s enkapsulovaným eugenolom na testované mikroorganizmy. Eugenol bol do lipozómov enkapsulovaný o koncentrácii 1 mg/ml.

Tabuľka 9: Antimikrobiálny účinok lipozómov s enkapsulovaným eugenolom ([++++] 100 – 80%; [+++] 79 – 50%; [++] 49 – 30%; [+] 29 – 0%; [-] menej ako 0%)

Množstvo častíc (obj. %)	Čas inkubácie (h)	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
100,00	24	-	-	+
50,00		-	-	-
25,00		-	-	-
12,50		-	-	-
6,25		-	-	-
3,13		-	-	-
1,56		-	-	-
100,00		48	-	-
50,00	-		-	-
25,00	-		-	-
12,50	-		-	-
6,25	-		-	-
3,13	-		-	-
1,56	-		-	-

Ako môžeme vidieť enkapsulovaný eugenol do lipozómov nevykazuje žiadnu antimikrobiálnu aktivitu voči baktériám *S. epidermidis* a *C. acnes*. Veľmi nízka antimikrobiálna aktivita bola pozorovaná iba v prípade baktérie *E. coli* po 24 hodinách ($23,50 \pm 0,54$ %) a tiež po 48 hodinách ($17,30 \pm 0,69$ %). Tento výsledok bol vopred očakávaný, keďže koncentrácia eugenolu 1 mg/ml, nie je dostatočná pre inhibíciu rastu týchto baktérií (kapitola 5.6.1.3). K tomuto výsledku tiež prispel aj fakt, že pri tejto koncentrácii vykazuje eugenol nízku enkapsulačnú účinnosť do lipozómov (kapitola 5.4.1).

Pri porovnaní všetkých aktívnych látok môžeme vidieť, že najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu u lipozómov vykazuje enkapsulovaný tymol a naopak najhoršie výsledky boli dosiahnuté v prípade eugenolu. Bolo by preto vhodné podporiť antimikrobiálnu aktivitu týchto látok vytvorením synergií s inými aktívnymi látkami.

5.8 Možnosti aplikácie funkcionalizovaných nanomateriálov

V tejto práci boli otestované prírodné látky, ktoré vykazovali antioxidačné a antimikrobiálne účinky. Antioxidačné látky dokážu vychytávať voľné kyslíkové radikály a spomaliť tak proces starnutia kože, čo je v kozmetickom priemysle žiadúca vlastnosť [3]. Samotné aktívne látky by zároveň mohli pôsobiť ako konzervanty v kozmetike, vďaka ich antimikrobiálnym vlastnostiam. Pri enkapsulácii aktívnych látok do nanomateriálov by sme mohli zvýšiť ich stabilitu, zlepšiť penetráciu do pokožky, ochranu proti UV žiareniu a tiež celkovú kvalitu kozmetického produktu [2]. Funkcionalizované nanovlákná by mohli byť použité pri výrobe produktov na pleť či iné časti tela za účelom liečby kožných ochorení ako je akné, ekzém a iné. Ďalej by si mohli nájsť svoje využitie tiež v náplastiach na akné, kedy by dochádzalo k urýchleniu procesu hojenia tým, že by zabraňovali šíreniu infekcie. Zároveň sme zistili, že k uvoľňovaniu látok dochádza postupne, čo znamená, že by tieto produkty mohli pôsobiť v rozsahu niekoľko hodín. Nanočastice s enkapsulovanými antimikrobiálnymi látkami by mohli byť využívané napríklad ako konzervanty v kozmetických produktoch.

Ďalšou z možných aplikácií nanomateriálov je distribúcia liečiv. Otestovali sme, že pripravené lipozómy vykazujú vysokú stabilitu. Nanoenkapsuláciou liečiva by sme teda mohli zabrániť predčasnej degradácii látok a tiež nežiadúcim interakciám. Dosiahli by sme doručenie látky priamo na miesto určenia a teda zlepšenie požadovaného účinku [28].

6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca sa zaoberá prípravou a charakterizáciou funkcionalizovaných nanomateriálov. Ďalej sa zameriava na antimikrobiálne účinky samotných látok, ktoré boli enkapsulované do nanovlákien a nanočastíc, a taktiež na antimikrobiálnu aktivitu pripravených nanomateriálov. Cieľom tejto práce je vytvorenie produktov, ktoré by bolo možné použiť v kozmetickom priemysle, či už na liečbu rôznych kožných ochorení alebo ako konzervačné látky v kozmetike.

U samotných aktívnych látok bol otestovaný ich antioxidačný účinok a obsah polyfenolov. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu zo študovaných látok vykazoval eugenol, a to $359,72 \pm 7,59 \mu\text{g/g}$. Najvyšší obsah polyfenolov bol zistený taktiež u eugenolu ($4,12 \pm 0,24 \text{ mg/g}$).

Nanovlákná pripravené z PHB boli otestované z hľadiska postupného uvoľňovania aktívnych látok. Vo všeobecnosti bolo najväčšie množstvo aktívnej látky uvoľnené z nanovlákien obsahujúcich eugenol. Najvyššie zaznamenané množstvo uvoľneného eugenolu bolo v prípade nanovlákien pripravených z 20 ml PHB do fyziologického roztoku po 24 hodinách ($91,94 \pm 4,74 \%$). U nanovlákien funkcionalizovaných tymolom sme pozorovali najvyššiu hodnotu uvoľneného množstva po 24 hodinách u 20 ml nanovlákien do fyziologického roztoku ($75,47 \pm 3,34 \%$). Karvakrol sa v najvyššej miere dokázal uvoľniť z nanovlákien o objeme PHB 20 ml po 8 hodinách do destilovanej vody ($88,78 \pm 3,16 \%$). Ak porovnáme 10 ml nanovlákná a 20 ml nanovlákná, vyššie množstvo látky sa uvoľňovalo z nanovlákien pripravených z 20 ml PHB, kvôli väčšiemu adsorpčnému povrchu.

Boli tiež pripravené nanovlákná z chitozánu a polyamidu s kyselinou mravčou ako rozpúšťadlom. Takto syntetizované vlákna však nemali ideálnu povahu pre naše aplikácie. Túto metódu bude teda potrebné ešte ďalej optimalizovať, napríklad použitím iného pomeru chemikálií či inej metódy pre zvlákňovanie.

Funkcionalizované lipozómy, pripravené metódou sonifikácie, boli charakterizované pomocou merania ich enkapsulačnej účinnosti, veľkosti a stability. Najlepšiu enkapsulačnú účinnosť vykazovali lipozómy pri koncentrácii aktívnej látky $0,25 \text{ mg/ml}$. Veľkosť pripravených lipozómov sa zväčšila po prídavku aktívnej látky. Veľkosť prázdnych lipozómov sme stanovili na $170,90 \pm 1,63 \text{ nm}$. U lipozómov s enkapsulovanými aktívnymi látkami sa ich veľkosť pohybovala v rozmedzí od $184,50 \pm 6,46 \text{ nm}$ až $243,07 \pm 7,83 \text{ nm}$. Index polydisperzity dosahoval u funkcionalizovaných lipozómov hodnoty v rozmedzí od $0,18 \pm 0,02$ až $0,25 \pm 0,01$. Takto pripravené lipozómy môžeme teda považovať za uniformné. Lipozómy tiež vykazovali vysokú stabilitu hneď po príprave, a to najmä v prostredí fyziologického roztoku. Predpokladáme, že vyššia stabilita u fyziologického roztoku je spôsobená prítomnosťou iónov v dôsledku obsahu NaCl. Destilovaná voda neobsahuje žiadne ióny a častice s neutrálnym povrchovým nábojom vykazujú nižšiu stabilitu [83]. Po 1 týždni a tiež 1 mesiaci boli lipozómy charakterizované ako naďalej stabilné.

Následne bolo merané aj postupné uvoľňovanie z nanočastíc, kedy sme zaznamenali najvyššie uvoľnené množstvo aktívnej látky u karvakrolu, a to do fyziologického roztoku po 48 hodinách ($55,39 \pm 2,39\%$). V prípade thymolu sa najviac látky uvoľnilo už po 8 hodinách do destilovanej

vody ($38,71 \pm 0,34 \%$). U eugenolu došlo k uvoľneniu najvyššieho množstva po 8 hodinách do fyziologického roztoku, konkrétne $47,02 \pm 8,44$ mg/ml.

Ďalším cieľom tejto práce bolo otestovanie antimikrobiálnej aktivity samotných látok a funkcionalizovaných nanomateriálov. U tymolu sme stanovili MIC pre *C. acnes* a *E. coli* na $0,130$ mg/ml. V prípade *S. epidermidis* táto hodnota činí $0,050$ mg/ml. U karvakrolu boli tieto hodnoty pre *S. epidermidis* a *E. coli* rovnaké ako u tymolu. Líši sa však MIC karvakrolu pre baktériu *C. acnes*, ktorá predstavuje $0,36$ mg/ml. Eugenol vykazoval nižšiu antimikrobiálnu aktivitu, pretože MIC pre *C. acnes* a *S. epidermidis* predstavovala $1,020$ mg/ml a pre *E. coli* to bola koncentrácia až $2,860$ mg/ml.

V prípade antimikrobiálnej aktivity nanovlákien dosahovali najväčší účinok nanovlákná funkcionalizované karvakrolom voči všetkým testovaným baktériám. Najvyššia hodnota zaznamenaná pri enkapsulovanom karvakrole bola u 10 ml nanovlákien voči *S. epidermidis* ($92,03 \pm 0,12 \%$). Vo všeobecnosti sme však pozorovali vyššiu aktivitu u nanovlákien pripravených z 20 ml roztoku PHB než u 10 ml vlákien. To môže byť dôsledkom väčšieho adsorpčného povrchu vlákien a tiež väčšieho povrchu, ktorý môže reagovať s prostredím.

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná tiež u lipozómov s aktívnymi látkami, ktoré obsahovali 1 mg/ml tymolu a eugenolu, a $0,25$ mg/ml karvakrolu. U lipozómov s enkapsulovaným tymolom bola najvyššia antimikrobiálna aktivita viditeľná po 24 – hodinovej inkubácii voči *S. epidermidis* ($99,50 \pm 2,50 \%$). Po predĺžení času inkubácie na 48 hodín došlo v prípade tymolu k poklesu antimikrobiálnej aktivity. Lipozómy s karvakrolom dosiahli najvyšší zaznamenaný účinok až po 48 hodinách ($68,11 \pm 3,00 \%$), a to voči baktérii *S. epidermidis*. Najnižší antimikrobiálny účinok vykazoval enkapsulovaný eugenol, kedy sme mohli pozorovať inhibíciu rastu iba u baktérii *E. coli*. Po 24 hodinách inkubácie bol účinok eugenolu stanovený na $23,50 \pm 0,54 \%$. Koncentrácia eugenolu 1 mg/ml nebola dostatočná pre inhibíciu rastu baktérie *C. acnes* ani *S. epidermidis*.

U čistých aktívnych látok, nanovlákien a tiež nanočastíc bol vykonaný aj resazurínový test, ktorý vo väčšine prípadov potvrdil výsledky dosiahnuté bujónovou dilučnou metódou. Menšie odchýlky môžu byť spôsobené tým, že tieto dve metódy sú založené na odlišnom princípe merania.

V budúcnosti by bolo možné zamerať sa na využitie pripravených materiálov pri príprave kombinovaných nanomateriálov so synergistickým účinkom. Bolo by možné vytvoriť synergie funkcionalizovaných nanovlákien v spojení s nanočasticami alebo tiež synergistický účinok samotných aktívnych látok. Predpokladáme ich potenciálne využitie v kozmetickom priemysle. U funkcionalizovaných nanovlákien to môžu byť napríklad pleťové masky s antimikrobiálnym a antioxidačným účinkom alebo náplasti na akné, ktoré by urýchl'ovali hojenie. Nanočastice s enkapsulovanými aktívnymi látkami môžu byť použité ako konzervanty v kozmetických produktoch.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ROODBAR SHOJAEI, Taha, Abdollah HAJALILOU, Meisam TABATABAEI, Hossein MOBLI a Mortaza AGHBASHLO. Characterization and Evaluation of Nanofiber Materials. Handbook of Nanofibers [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 491-522 [cit. 2023-05-19]. ISBN 978-3-319-53654-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-53655-2_15
- [2] OLIVEIRA, Cristiana, Cristina COELHO, José TEIXEIRA, Pedro FERREIRA-SANTOS a Claudia BOTELHO. Nanocarriers as Active Ingredients Enhancers in the Cosmetic Industry—The European and North America Regulation Challenges. Molecules [online]. 2022, 27(5) [cit. 2023-02-02]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27051669
- [3] RICHARDS, Louisa a Joan PAUL. What to know about antioxidants for skin. Medical News Today [online]. [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/antioxidants-for-skin>
- [4] RIBEIRO, Ana, Marilene ESTANQUEIRO, M. OLIVEIRA a José SOUSA LOBO. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. Cosmetics [online]. 2015, 2(2), 48-65 [cit. 2022-09-15]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics2020048
- [5] Nanotechnology [online]. National Institute for Occupational Safety and Health, 2020 [cit. 2022-06-05]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/default.html>
- [6] NUNES, Carlos a Petra PHILIPPS-WIEMANN. Formulation of enzymes. Enzymes in Human and Animal Nutrition [online]. Elsevier, 2018, 429-440 [cit. 2022-09-15]. ISBN 9780128054192. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805419-2.00022-8
- [7] SISTA, Deepthi. New Perspective of Nano Fibers: Synthesis and Applications. Nanofibers - Synthesis, Properties and Applications [online]. IntechOpen, 2021 [cit. 2023-02-01]. ISBN 978-1-83968-425-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.97460
- [8] PADRON, Simon, Arturo FUENTES, Dumitru CARUNTU a Karen LOZANO. Experimental study of nanofiber production through forcespinning. Journal of Applied Physics [online]. 2013, 113(2) [cit. 2022-09-18]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.4769886
- [9] SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™. Materials Today [online]. 2010, 13(11), 12-14 [cit. 2022-12-19]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(10)70199-1
- [10] AGUBRA, Victor, Luis ZUNIGA, David LA GARZA, Luis GALLEGOS, Madhab POKHREL a Mataz ALCOUTLABI. Forcespinning: A new method for the mass production of Sn/C composite nanofiber anodes for lithium ion batteries. Solid State Ionics [online]. 2016, 286, 72-82 [cit. 2022-09-18]. ISSN 01672738. Dostupné z: doi:10.1016/j.ssi.2015.12.020
- [11] OBREGON, Nancy, Victor AGUBRA, Madhab POKHREL et al. Effect of Polymer Concentration, Rotational Speed, and Solvent Mixture on Fiber Formation Using

- Forcespinning*®. *Fibers* [online]. 2016, 4(4) [cit. 2022-12-22]. ISSN 2079-6439. Dostupné z: doi:10.3390/fib4020020
- [12] LEENA, M., K.S. YOHA, J.A. MOSES a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Nanofibers in Food Applications. *Innovative Food Processing Technologies* [online]. Elsevier, 2021, 634-650 [cit. 2022-09-18]. ISBN 9780128157824. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22952-1
- [13] JOSE VARGHESE, R., El SAKHO, Sundararajan PARANI, Sabu THOMAS, Oluwatobi OLUWAFEMI a Jihuai WU. Introduction to nanomaterials: synthesis and applications. *Nanomaterials for Solar Cell Applications* [online]. Elsevier, 2019, 75-95 [cit. 2022-09-18]. ISBN 9780128133378. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813337-8.00003-5
- [14] ZHAO, Ying, Yihui QIU, Huanhuan WANG, Yu CHEN, Shaohua JIN a Shuseng CHEN. Preparation of Nanofibers with Renewable Polymers and Their Application in Wound Dressing: synthesis and applications. *International Journal of Polymer Science* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 1-17 [cit. 2022-06-05]. ISBN 9780128133378. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1063/1.4769886
- [15] FAKI, Rabia, Oguz GURSOY a Yusuf YILMAZ. Effect of Electrospinning Process on Total Antioxidant Activity of Electrospun Nanofibers Containing *Grape Seed Extract*. *Open Chemistry* [online]. 2019, 17(1), 912-918 [cit. 2022-12-22]. ISSN 2391-5420. Dostupné z: doi:10.1515/chem-2019-0098
- [16] SUN, K. a Z. LI. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by *electrospinning*. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, 5(4), 342-361 [cit. 2022-09-18]. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.34
- [17] MILETIĆ, Aleksandra, Branimir PAVLIĆ, Ivan RISTIĆ, Zoran ZEKOVIĆ a Branka PILIĆ. Encapsulation of Fatty Oils into Electrospun Nanofibers for Cosmetic Products with Antioxidant Activity. *Applied Sciences* [online]. 2019, 9(15) [cit. 2023-02-03]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9152955
- [18] DOTTO, G.L., J.M.N. SANTOS, E.H. TANABE, D.A. BERTUOL, E.L. FOLETTO, E.C. LIMA a F.A. PAVAN. Chitosan/polyamide nanofibers prepared by Forcespinning® technology: A new adsorbent to remove anionic dyes from aqueous solutions. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2017, 144, 120-129 [cit. 2022-12-19]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2017.01.004
- [19] MAHAPATRO, Anil a Dinesh SINGH. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2011, 9(1) [cit. 2022-12-22]. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/1477-3155-9-55
- [20] NAGHIBZADEH, Majid, Saman FIROOZI a Mahdi ADABI. Application of electrospun gelatin nanofibers in tissue engineering. *Biointerface Research in Applied Chemistry* [online]. [cit. 2022-06-05]. ISSN 2069-5837. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/325619044_Application_of_electrospun_gelatin_nanofibers_in_tissue_engineering

- [21] KOMMAREDDY, Sushma, Dinesh SHENOY a Mansoor AMIJI. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization [online]. [cit. 2022-12-22]. ISSN Nanotechnologies for the Life Sciences. Dostupné z: doi:10.1002/9783527610419.ntls0011
- [22] KOCH, Moritz a Karl FORCHHAMMER. Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. Microbial Physiology [online]. 2021, 31(2), 67-77 [cit. 2022-12-21]. ISSN 2673-1665. Dostupné z: doi:10.1159/000515617
- [23] CORREIA, Daniela, Clarisse RIBEIRO, José FERREIRA, Gabriela BOTELHO, José RIBELLES, Senentxu LANCEROS-MÉNDEZ a Vitor SENCADAS. Influence of electrospinning parameters on poly(hydroxybutyrate) electrospun membranes fiber size and distribution. Polymer Engineering & Science [online]. 2014, 54(7), 1608-1617 [cit. 2022-05-31]. ISSN 00323888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.23704
- [24] CARTER, Nicklaus, Isabelle GRANT, Marley DEWEY, Mary BOURQUE a David NEIVANDT. Production and Characterization of Cellulose Nanofiber Slurries and Sheets for Biomedical Applications. Frontiers in Nanotechnology [online]. 2021, 3 [cit. 2023-02-01]. ISSN 2673-3013. Dostupné z: doi:10.3389/fnano.2021.729743
- [25] ACHARYA, Somen a Anita CHAUDHARY. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. Brazilian Journal of Microbiology [online]. 2012, 43(3), 844-856 [cit. 2022-12-22]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822012000300001
- [26] IBRAHIM, Hassan a Anke KLINGNER. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. Polymer Testing [online]. 2020, 90 [cit. 2022-06-03]. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106647
- [27] KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry [online]. 2019, 12(7), 908-931 [cit. 2022-12-22]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [28] SÁNCHEZ, Arturo, Susana MEJÍA a Jahir OROZCO. Recent Advances in Polymeric Nanoparticle-Encapsulated Drugs against Intracellular Infections. Molecules [online]. 2020, 25(16) [cit. 2023-02-02]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163760
- [29] PREETHI, R., Sayantani DUTTA, J.A. MOSES a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Green nanomaterials and nanotechnology for the food industry. Green Functionalized Nanomaterials for Environmental Applications [online]. Elsevier, 2022, 215-256 [cit. 2022-12-22]. ISBN 9780128231371. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823137-1.00008-7
- [30] TENCHOV, Rumiana, Robert BIRD, Allison CURTZE a Qiongqiong ZHOU. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. ACS Nano [online]. 2021, 15(11), 16982-17015 [cit. 2022-12-22]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.1c04996
- [31] LAI, Patrick, Weiam DAEAR, Raimar LÖBENBERG a Elmar PRENNER. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine,

- chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, 118, 154-163 [cit. 2023-02-02]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.03.017
- [32] DUBEY, Kumar. VARIOUS PREPARATION TECHNIQUE OF *POLYMERIC NANOPARTICLE* [online]. [cit. 2022-12-23]. Dostupné z: <https://www.pharmatutor.org/articles/various-preparation-technique-polymeric-nanoparticle#:~:text=Polymer%20nanoparticles%20have%20attracted%20the%20interest%20of%20researcher,of%20monomers%20or%20the%20dispersion%20of%20pre-form%20polymers.>
- [33] LOMBARDO, Domenico a Mikhail A. KISELEV. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics* [online]. 2022, 14(3) [cit. 2023-04-15]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14030543
- [34] BOXBERGER, Manon, Valérie CENIZO, Nadim CASSIR a Bernard LA SCOLA. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome* [online]. 2021, 9(1) [cit. 2022-09-15]. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-021-01062-5
- [35] DORNELL, Jonathan. The Skin Microbiome. *Technology Networks* [online] [online]. [cit. 2022-09-15]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/the-skin-microbiome-356627>
- [36] CASTELLANOS LORDUY, H.J., H.C. PÉREZ CELY, E.J. CASADIEGO RINCÓN, S.C. HENAO RIVEROS a C.L. COLORADO. Cutibacterium acnes tetracycline resistance profile in patients with acne vulgaris, in a Colombian dermatologic center. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* [online]. 2021, 112(10), 873-880 [cit. 2022-06-05]. ISSN 15782190. Dostupné z: doi:10.1016/j.adengl.2021.09.003
- [37] UNTERFRAUNER, Ines, Karl WIESER, Sabrina CATANZARO, Ilker UÇKAY a Samy BOUAICHA. Acne cream reduces the deep Cutibacterium acnes tissue load before elective open shoulder surgery: a randomized controlled pilot trial. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* [online]. 2022, 31(5), 897-905 [cit. 2022-06-05]. ISSN 10582746. Dostupné z: doi:10.1016/j.jse.2022.01.115
- [38] GREAVES, Malcolm W. Skin disease. *Encyclopedia Britannica* [online]. [cit. 2022-09-15]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/human-skin-disease>
- [39] TRACEY, A. a G. CHANDRASHEKHAR. Staphylococcus Aureus. *StatPearls* [online]. StatPearls Publishing [cit. 2022-06-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- [40] ABURJAI, Talal, Feda NATSHEH, Antonella SMERIGLIO, Rosamaria PENNISI, Maria SCIORTINO a Giuseppina MANDALARI. Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research* [online]. 2003, 17(9), 987-1000 [cit. 2022-06-02]. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.5829/idosi.abr.2015.9.5.9610

- [41] LEE, Ezra a Fatima ANJUM. Staphylococcus Epidermis. StatPearls [online]. StatPearls Publishing [cit. 2022-06-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/>
- [42] LI, Dan, Pei LI, Xiaoyan YU, Xuefei ZHANG, Qinglan GUO, Xiaogang XU, Mingguai WANG a Minghua WANG. Molecular Characteristics of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections During 2010–2015 in Tertiary Hospital, Shanghai, China. Infection and Drug Resistance [online]. 2021, 14, 2079-2086 [cit. 2022-09-15]. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S305281
- [43] KAPER, James, James NATARO, Harry MOBLEY, Xuefei ZHANG, Qinglan GUO, Xiaogang XU, Mingguai WANG a Minghua WANG. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology [online]. 2004, 2(2), 123-140 [cit. 2022-06-17]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro818
- [44] GRICE, Elizabeth, Julia SEGRE, Julia SEGRE a Bernard LA SCOLA. The skin microbiome. Nature Reviews Microbiology [online]. 2011, 9(4), 244-253 [cit. 2022-06-05]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2537
- [45] DOLENC-VOLJČ, M., Z. LI, Alexandru GRUMEZESCU, Bogdan VASILE a Ecaterina ANDRONESCU. Diseases Caused by Malassezia Species in Human Beings. The Microbiology of *Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* [online]. Elsevier, 2017, 5(4), 77-91 [cit. 2022-05-31]. ISBN 9780128110799. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811079-9.00005-7
- [46] OKAMOTO, Kazuaki, Shoji KANAYAMA, Fumiaki IKEDA et al. Broad spectrum in vitro microbicidal activity of benzoyl peroxide against microorganisms related to cutaneous diseases. *The Journal of Dermatology* [online]. 2021, 48(4), 551-555 [cit. 2022-06-02]. ISSN 0385-2407. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/B978-0-323-35868-2.00077-3
- [47] Antimicrobial Activity. *Clinical Microbiology* [online]. [cit. 2022-06-05]. ISSN 2327-5073. Dostupné z: <https://www.walshmedicalmedia.com/scholarly/antimicrobial-activity-journals-articles-ppts-list-3252.html>
- [48] Antimikrobiálne látky. In: Encyclopaedia Beliana [online]. [cit. 2023-02-06]. ISBN 978-80-89524-30-3. Dostupné z: <https://beliana.sav.sk/heslo/antimikrobialne-latky>
- [49] VAN DER SCHYFF, Veronica, Lenka SUCHÁNKOVÁ, Katerina KADEMOGLOU, Lisa MELYMUK a Jana KLÁNOVÁ. Parabens and antimicrobial compounds in conventional and “green” personal care products. *Chemosphere* [online]. 2022, 297 [cit. 2022-09-15]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134019
- [50] PEDERSEN, S., F. MARRA, S. NICOLI, P. SANTI a Jana KLÁNOVÁ. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2007, 29(5), 361-367 [cit. 2022-09-15]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2007.00388.x
- [51] GROBEL, Hana a Sarah MURPHY. Acne Vulgaris and Acne Rosacea. *Integrative Medicine* [online]. Elsevier, 2018, 759-7705 [cit. 2022-06-02]. ISBN 9780323358682. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35868-2.00077-3

- [52] ARSHAD, Muhammad a Syeda BATOOL. Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety. Food Additives [online]. InTech, 2017 [cit. 2022-09-15]. ISBN 978-953-51-3489-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.70197
- [53] MUSARRA-PIZZO, Maria, Giovanna GINESTRA, Antonella SMERIGLIO, Rosamaria PENNISI, Maria SCIORTINO a Giuseppina MANDALARI. The Antimicrobial and Antiviral Activity of Polyphenols from Almond (*Prunus dulcis* L.) Skin. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10) [cit. 2022-09-15]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11102355
- [54] SALEHI, Bahare, Abhay MISHRA, Ila SHUKLA et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research* [online]. 2018, 32(9), 1688-1706 [cit. 2022-11-28]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6109
- [55] NAGOOR MEERAN, Mohamed, Hayate JAVED, Hasan AL TAE, Sheikh AZIMULLAH a Shreesh OJHA. Pharmacological Properties and *Molecular* Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, 8 [cit. 2022-12-19]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00380
- [56] Thyme Plant Pods. In: Click and grow [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://eu.clickandgrow.com/products/grow-thyme-indoors>
- [57] SHARIFI-RAD, Mehdi, Elena VARONI, Marcello IRITI et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* [online]. 2018, 32(9), 1675-1687 [cit. 2022-11-28]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6103
- [58] SHEKARCHI, M, M KHANAVI, N ADIB, M AMRI a H HAJIMEHDIPOOR. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2010, 6(23) [cit. 2022-11-28]. ISSN 0973-1296. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6103
- [59] SUNTRES, Zacharias, John COCCIMIGLIO a Misagh ALIPOUR. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, 55(3), 304-318 [cit. 2022-12-19]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.3390/ph13070153
- [60] Structures of thymol and carvacrol [online]. In: . [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-thymol-and-carvacrol_fig1_47371068
- [61] Oregano. In: HerbaZest [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.herbazest.com/herbs/oregano>
- [62] STAN, Diana, Ana-Maria ENCIU, Andreea MATEESCU, Andreea ION, Ariana BREZEANU, Dana STAN a Cristiana TANASE. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2021, 12 [cit. 2022-09-15]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.723233

- [63] ADAMCZAK, Artur, Marcin OZAROWSKI a Tomasz KARPIŃSKI. Curcumin, a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity. *Pharmaceuticals* [online]. 2020, 13(7) [cit. 2022-12-19]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph13070153
- [64] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. Lékařská mikrobiologie. 2. Praha: TRITON, 2021. ISBN 978-80-7553-900-7.
- [65] Curcumin Structure PD. In: Sheila Kealey [online]. [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: <http://www.sheilakealey.com/2017/01/25/healthy-or-hype-turmeric/curcumin-structure-pd/>
- [66] Kurkuma [online]. In: . [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.vseokoreni.cz/koreni/kurkuma>
- [67] MARCHESE, Anna, Ramona BARBIERI, Erika COPPO et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2017, 43(6), 668-689 [cit. 2023-03-12]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2017.1295225
- [68] SHARMA, Ajay, Garima BHARDWAJ, Harvinder Singh SOHAL a Apurba GOHAIN. Eugenol. *Nutraceuticals and Health Care* [online]. Elsevier, 2022, 177-198 [cit. 2023-03-12]. ISBN 9780323897792. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89779-2.00007-7
- [69] In: VETOFISH [online]. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://www.vetofish.com/definition/eugenol>
- [70] Cloves. In: HealthBenefits times [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.healthbenefitstimes.com/cloves/>
- [71] USHARANI, G., G. SRINIVASAN, S. SIVASAKTHI a P. SARANRAJ. Antimicrobial Activity of Spirulina platensis Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Advances in Biological Research* 9 [online]. IDOSI Publications, 292-298 [cit. 2022-06-02]. ISSN 1992-0067. Dostupné z: doi:10.1111/1346-8138.15739
- [72] ALSHUNIABER, Mohammad, Rajapandiyan KRISHNAMOORTHY a Wahida ALQHTANI. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from Spirulina against food-borne bacterial pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2021, 28(1), 459-464 [cit. 2022-09-18]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2021.09.046
- [73] ABDEL-MONEIM, Abdel-Moneim, Mohamed EL-SAADONY, Abdelrazeq SHEHATA, Ahmed SAAD, Sami ALDHUMRI, Sahar OUDA a Noura MESALAM. Antioxidant and antimicrobial activities of Spirulina platensis extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected pathogenic bacteria and fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2022, 29(2), 1197-1209 [cit. 2022-06-21]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2021.09.046
- [74] Spirullina. In: Cookist [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.cookist.com/spirulina/>
- [75] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*

- [online]. 2016, 6(2), 71-79 [cit. 2022-12-19]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [76] ANDREWS, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2001, 48(1), 5-16 [cit. 2022-12-20]. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5
- [77] KUETE, V., O. KARAOSMANOĞLU a H. SIVAS. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* [online]. Elsevier, 2017, 271-297 [cit. 2023-03-07]. ISBN 9780128092866. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8
- [78] ESPINEL-INGROFF, Ana, Lynn STEELE-MOORE a John N. GALGIANI. Evaluation of 80% inhibition standards for the determination of fluconazole minimum inhibitory concentrations in three laboratories. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 1994, 20(2), 81-86 [cit. 2023-05-17]. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/0732-8893(94)90096-5
- [79] LIU, Beibei, Bing CHEN, Jing ZHANG, Ping WANG a Gang FENG. The environmental fate of thymol, a novel botanical pesticide, in tropical agricultural soil and water [online]. 2017, 99(2), 223-232 [cit. 2023-05-18]. ISSN 0277-2248. Dostupné z: doi:10.1080/02772248.2016.1198907
- [80] SCHOELLER, Jean, Fabian ITEL, Karin WUERTZ-KOZAK, Giuseppino FORTUNATO a René M. ROSSI. PH-Responsive Electrospun Nanofibers and Their Applications. *Polymer Reviews* [online]. 2022, 62(2), 351-399 [cit. 2023-05-19]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2021.1939372
- [81] DE FARIAS, Bruna Silva, Tito Roberto SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR a Luiz Antonio DE ALMEIDA PINTO. Chitosan-functionalized nanofibers: A comprehensive review on challenges and prospects for food applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, 123, 210-220 [cit. 2023-05-20]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.042
- [82] OHKAWA, Kousaku, Dongil CHA, Hakyong KIM, Ayako NISHIDA a Hiroyuki YAMAMOTO. Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. 2004, 25(18), 1600-1605 [cit. 2023-05-18]. ISSN 1022-1336. Dostupné z: doi:10.1002/marc.200400253
- [83] Zeta potential theory. *Electrokinetic Effects - Malvern Zetasizer Nano series User Manual* [online]. [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: <https://www.manualslib.com/manual/1225799/Malvern-Zetasizer-Nano-Series.html?page=231#manual>
- [84] LIVIU, Ixaru Gr. a Popescu DUMITRU. A mathematical investigation on the active substance pulsatory release from a solution-charged liposome. *Biosystems* [online]. 2019, 179, 48-54 [cit. 2023-05-19]. ISSN 03032647. Dostupné z: doi:10.1016/j.biosystems.2019.03.001
- [85] OLASUPO, N.A., D.J. FITZGERALD, M.J. GASSON a A. NARBAD. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*

serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2003, 37(6), 448-451 [cit. 2023-05-19]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x

- [86] TRAKUNJAE, Chanaporn, Antika BOONDAENG, Waraporn APIWATANAPIWAT, Akihiko KOSUGI, Takamitsu ARAI, Kumar SUDESH a Pilanee VAITHANOMSAT. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare *actinomycetes Rhodococcus sp. strain* BSRT1-1 using response surface methodology. *Scientific Reports* [online]. 2021, 11(1) [cit. 2023-05-18]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-81386-2

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS ⁺	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BC	Bakteriálna celulóza
BHI	Brain Heart Infusion Broth
DLS	Dynamický rozptyl svetla
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FS	Forcespinning
LB	Lysogeny Broth
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia
NČ	Nanočastice
NV	Nanovláčna
PdI	Index polydisperzity
PEO	Polyetylénoxid
PHB	Polyhydroxybutyrát
PVA	Polyvinylalkohol
THF	Tetrahydrofurán
UV	Ultrafialové žiarenie