



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝVOJ PŘÍRODNÍCH KOSMETICKÝCH EMULZÍ S ENKAPSULOVANÝMI AKTIVNÍMI LÁTKAMI

DEVELOPMENT OF NATURAL COSMETICS EMULSIONS WITH ENCAPSULATED ACTIVE SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Edita Chrápavá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1929/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Edita Chrápavá**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Vývoj přírodních kosmetických emulzí s enkapsulovanými aktivními látkami

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše zaměřená na přírodní kosmetické přípravky a jejich hlavní složky se zvláštním zřetelem na typy emulgátorů a aktivní látky
2. Experimentální část:
 - příprava kosmetických základů s různými typy přírodních emulgátorů
 - příprava přírodních extraktů a jejich charakterizace
 - enkapsulace extraktů do nanočástic; stanovení enkapsulační účinnosti a charakterizace částic (DLS)
 - příprava kosmetických přípravků s aktivní složkou a pigmenty; testování stability emulzí
 - testování biologických účinků připravených emulzí, zejména antimikrobiálního a antioxidačního efektu
3. Vyhodnocení výsledků, diskuse a návrh vhodné formulace pro praktické využití

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Edita Chrápavá
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Během posledních let se zvýšil zájem společnosti o spotřební produkty, které nějakým způsobem napomáhají vyšší ekologické udržitelnosti, ať už se jedná o snížení emisí při velkovýrobě, snadnější odbourání chemikálií v odpadních vodách, nebo nezávadnost produktů a ingrediencí, z nichž jsou produkty vyrobeny. Tohle téma zasáhlo ve velkém i kosmetický průmysl a byly tak donuceny se začít přizpůsobovat nejen menší značky přírodní kosmetiky, ale i velké firmy. Důsledkem se stal větší důraz na výzkum přírodních látek pro kosmetiku a vývoj přírodních alternativ syntetických složek. Zároveň se také objevuje zvýšený zájem společnosti o účinky hub východní medicíny ve spojitosti s prospěšnými účinky jak na fyzické, tak psychické zdraví.

Tato práce se zabývá spojením uvedených dvou témat, a to analýzou rostlinných extraktů a extraktů medicínálních hub a testováním jejich potenciálního kosmetického využití. Následně pak byl navržen kosmetický přípravek vyrobený ze složek přírodního původu s enkapsulovanými extrakty z těchto přírodních ingrediencí jako aktivními látkami.

ABSTRACT

In recent years, there is an increase of consumer interest in products, which in some way help a more favourable ecological sustainability, whether it is a reduction of emissions during mass production, easier breakdown of chemicals in wastewater, or harmlessness of products and ingredients from which products are made. This topic also affected the cosmetic industry in a big way, and they were thus forced to start adapting not only smaller brands of natural cosmetics, but also large companies. As a result, bigger companies started to pay more attention to research of natural substances for cosmetics and the development of natural alternatives to synthetic ingredients. At the same time, there is also increasing interest in the effects of Eastern medicine mushrooms and their beneficial effects on both physical and mental health.

This thesis focuses on the connection of these two topics, the analysis of plant extracts and extracts of medicinal mushrooms on one side and their potential cosmetic use on the other. Subsequently, a cosmetic product was designed made from ingredients of natural origin with encapsulated extracts from these natural ingredients as active substances.

KLÍČOVÁ SLOVA

kosmetika, emulze, aktivní látka, liposomy

KEY WORDS

cosmetics, emulsion, active ingredient, liposome

CHRÁPAVÁ, Edita. Vývoj přírodních kosmetických emulzí s enkapsulovanými aktivními látkami. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156956>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the bachelor thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
student's signature

PODĚKOVANÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotu, odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michaelle Kubalové za vstřícnost a rady, které mi byly poskytnuty během zpracovávání této diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Kůže	9
2.1.1	Složení kůže	9
2.2	Kosmetický přípravek	11
2.3	Kosmetický přípravek a kůže	11
2.4	Přírodní kosmetika	14
2.5	Srovnání přírodní kosmetiky s konvenční kosmetikou	15
2.6	Emulze	15
2.6.1	Emulgátor	17
2.7	Typy kosmetických ingrediencí	21
2.7.1	Rozpouštědlo	21
2.7.2	Humektant	22
2.7.3	Emolient	22
2.7.4	Aktivní látka	22
2.7.5	Emulgátor	22
2.7.6	Konzervant	22
2.8	Charakteristika hub	23
2.8.1	Vyšší houby	23
2.8.2	Medicínální houby	24
2.8.3	Nižší houby	30
2.9	Vybraní zástupci rostlin	31
2.9.1	Hřebíček (<i>Syzygium aromaticum</i>)	31
2.10	Aktivní látky v extraktech	32
2.10.1	Antioxidanty	32
2.10.2	Lipofilní aktivní látky	35
2.11	Analytické metody	37
2.11.1	Spektrofotometrie	37
2.11.2	HPLC	37
2.11.3	Dynamický rozptyl světla	37
2.12	Antimikrobiální aktivita	38
2.13	Enkapsulace	38
2.13.1	Liposomy	38
3	CÍL PRÁCE	40

4	PRAKTICKÁ ČÁST	41
4.1	Použité chemikálie pro analýzy	41
4.2	Použité kosmetické suroviny na přípravu krému.....	41
4.3	Použité přístroje a laboratorní pomůcky	41
4.4	Použité vzorky.....	42
4.5	Použité mikroorganismy	42
4.6	Příprava vodných extraktů.....	42
4.7	Příprava ethanolových extraktů.....	42
4.8	Spektrofotometrické analýzy	42
4.8.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	42
4.8.2	Stanovení antioxidační aktivity	43
4.8.3	Stanovení celkového množství flavonoidů	44
4.9	Stanovení obsahu lipofilních látek pomocí HPLC.....	45
4.9.1	Postup a parametry stanovení HPLC	45
4.9.2	Stanovení obsahu eugenolu v extraktech hřebíčku pomocí HPLC	45
4.10	Antimikrobiální testy	46
4.10.1	Kultivace mikroorganismů a antimikrobiální test.....	46
4.10.2	Resazurinový test viability kultury	47
4.11	Enkapsulace aktivních látek do nanočástic.....	47
4.11.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	48
4.12	Charakterizace liposomů pomocí metody DLS	48
4.13	Kompozice a příprava krému.....	49
4.13.1	Postup přípravy krému	50
4.14	Antimikrobiální test připravených krémů.....	50
4.15	Stanovení antioxidační aktivity připravených krémů.....	50
4.16	Cyklický stabilitní test.....	50
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	52
5.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek v extraktech	52
5.2	Stanovení celkové antioxidační aktivity v extraktech	53
5.3	Stanovení celkového množství flavonoidů v extraktech.....	55
5.4	Analýza lipofilních látek v extraktech	56
5.4.1	Stanovení eugenolu v extraktech hřebíčku	57
5.5	Antimikrobiální testy jednotlivých extraktů.....	58

5.5.1	Antimikrobiální testy na bakterii <i>Staphylococcus epidermidis</i>	58
5.5.2	Antimikrobiální testy na bakterii <i>Escherichia coli</i>	66
5.5.3	Souhrnné výsledky antimikrobiálních testů jednotlivých extraktů.....	71
5.6	Enkapsulační účinnost	73
5.7	Analýza částic pomocí DLS	74
5.8	Antioxidační účinnost připravených krémů	76
5.9	Antimikrobiální testy připravených krémů	76
5.9.1	Antimikrobiální testy krémů na bakterii <i>Staphylococcus epidermidis</i>	77
5.9.2	Antimikrobiální testy krémů na bakterii <i>Escherichia coli</i>	80
5.10	Cyklický stabilitní test.....	84
5.10.1	Cyklický test v uzavřeném obalu	84
5.10.2	Cyklický test v otevřeném obalu.....	85
6	ZÁVĚR.....	87
7	CITOVANÁ LITERATURA.....	89
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	101
9	PŘÍLOHA 1	102

1 ÚVOD

Již od pradávna si lidé všímali svého vzhledu a snažili se ho vylepšit mnoha různými způsoby. Jejich vzhled byl vždy důležitým prvkem neverbální komunikace a vyjádření pocitů a obav. Odhaduje se, že první vývoj kosmetiky a hygieny začal již 15 000 let před naším letopočtem, kdy se již lidé vyjadřovali kresbami na stěny jeskyní a na svá těla. První takzvané kosmetické produkty byly navrženy pravěkými lidmi zejména pro praktické použití jako je ochrana před chladem, vlhkostí, hmyzem nebo sluncem. Ve starověkém Řecku platilo pravidlo, že zdravé je jen to, co je krásné. Ideálem krásy byla bohyně Afrodité a byla to antika, kdy byl rozvoj kosmetiky největší. Není divu, že slovo „kosmetika“ se vyvinulo z „kosmeo“, což znamená „zkrášluji se“, a pochází z tohoto období řecké historie [1].

Ve středověku si ženy na naznačení své vznešenosti a bohatství bělily svou pokožku. Následně dochází také k rozvoji parfumérství, vzhledem k domněnce škodlivosti vody a koupelí. Postupně se dále rozvíjel kosmetický průmysl a v 19. století se více rozvíjely přední obory jako chemie a biologie. Víze krásy se měnila v každém období historie a z každého období jsme si něco zachovali až do dneška. V poslední době se kosmetický průmysl velmi rychle rozvíjí a trh je plný nových kosmetických produktů a ingrediencí, které mají za sebou řadu odborných výzkumů a jejichž hlavní účel zůstal nezměněný. Stále používáme kosmetické produkty s cílem cítit se lépe, zlepšit kvalitu pokožky a kůži chránit [2].

Během posledních pár let se kosmetický průmysl začal vracet zpět k více přírodním alternativám kosmetiky a zákazníci čím dál více naléhají na kosmetické firmy, aby upřednostnily vývoj tzn. zelenějších produktů s aktivními látkami a extrakty získanými z přírody, které neobsahují toxické chemické látky nebo jiné ne zcela bezpečné ingredience. V souvislosti s touto změnou situace na trhu, výrobci přicházejí s náhradou některých tradičních přísad pocházejících z petrochemických zdrojů novými složkami s příznivějšími vlastnostmi k pokožce. V dnešní době je trh s kosmetikou tak obrovský, že si každý může najít vyhovující produkt. Přestože termín přírodní kosmetika, „green beauty“ nebo „clean cosmetics“ má na kosmetickém trhu velmi silný marketing, stále neexistuje přesná definice toho, co tento termín vlastně znamená, neboť není regulován a každá firma si může vytvořit vlastní definici a podmínky. Přírodní kosmetika tedy ještě pořád nemá na trhu přesně vymezenou definici, ale neustále se hledají nové, inovativní látky extrahované z ingrediencí přírodního původu, či metody a technologie, jak nejlépe využít potenciál právě přírodních extraktů rostlinného nebo mikrobiálního původu. Například medicínální houby z východní medicíny jsou hojně využívány pro vysoký obsah prospěšných látek na podporu mentálního zdraví. Látky v nich obsažené by ale mohly být velice dobře využitelné i jako aktiva v kosmetických produktech. Extrakty z medicínálních hub by tak mohly být budoucností aktivních látek na běžné denní použití.

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou několika přírodních extraktů rostlin a lékařských hub a následným navržením přírodního pleťového krému s těmito extrakty, včetně otestování jejich účinků na pleť.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Kůže je největším a nejuniverzálnějším orgánem lidského těla a má životně důležitou funkci. Zabírá asi 20 % tělesné hmotnosti a obsahuje vodu, bílkoviny, lipidové látky, sacharidy a širokou škálu prvků jako Cl, Mg, Na, Ca, K atd. Skládá se z několika vrstev, z nichž každá má odlišné vlastnosti a funkce. Základem kůže jsou buňky, keratinocyty, které jsou navzájem spojeny silnými mechanickými interakcemi a adhezí buňka-buňka. Podle toho, jak hluboko jsou buňky v kůži umístěny, se prostředí trochu liší. Kůže se skládá ze 3 hlavních vrstev – z *epidermis*, *dermis* a *subcutis*, neboli podkožního vaziva (Obr.1) [3].

Složení kůže zahrnuje také kožní adnexa, anatomické struktury spojené s kůží jako jsou mazové žlázy, potní žlázy apod., které mají vlastní konkrétní funkci. Velikost plochy kůže je kolem 0,25 m², u dospělého člověka může dosahovat až 2 m². Čím je člověk starší, tím více se zvětšuje plocha pokožky v důsledku tvorby vrásek, ochabování kůže a různých nerovností. Nejdůležitější funkcí naší kůže je, že působí jako primární bariéra našeho těla [4].

Ztráta jedné třetiny kůže může být velmi nebezpečná a může být také příčinou smrti. Hmotnost kůže je asi 1/5 hmotnosti celého těla. Tloušťka kůže je cca 0,5–6,0 mm v závislosti na partii těla. Celkově je pleť velmi nerovnoměrná. Důležitou funkcí kůže je poskytování ochranné bariéry proti mechanickému, fyzickému nebo tepelnému poranění nebo nebezpečným látkám. Zabraňuje také ztrátě vlhkosti, snižuje škodlivé účinky UV záření, působí jako smyslový orgán a pomáhá s regulací teploty [5].

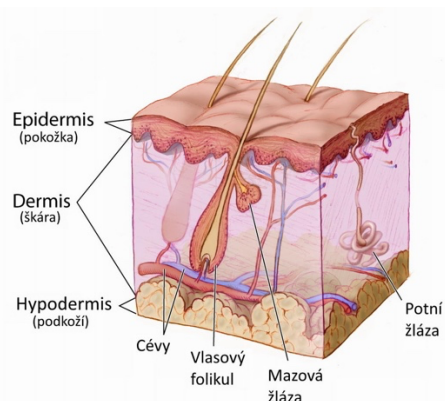
2.1.1 Složení kůže

2.1.1.1 *Subcutis*

Nejhlubší vrstva kůže *subcutis*, neboli podkožní vazivo, je tvořena fibroblasty, tukovými buňkami a makrofágy. Procházejí jí cévy a nervy a působí jako izolační vrstva. Pomáhá také regulovat tělesnou teplotu a poskytuje pokožce odpružení a podporu [6].

2.1.1.2 *Dermis*

Dermis je vrstva mezi podkožím vazivem a *epidermis* a primárně se skládá z hustých pojivových tkání, jako je kolagen a elastin. Obsahuje krevní cévy, nervová zakončení, vlasové folikuly, potní žlázy a mazové žlázy. Je zodpovědná za poskytování pevnosti a pružnosti pokožce a také za uložení různých smyslových receptorů pro dotek, teplotu a bolest [7].



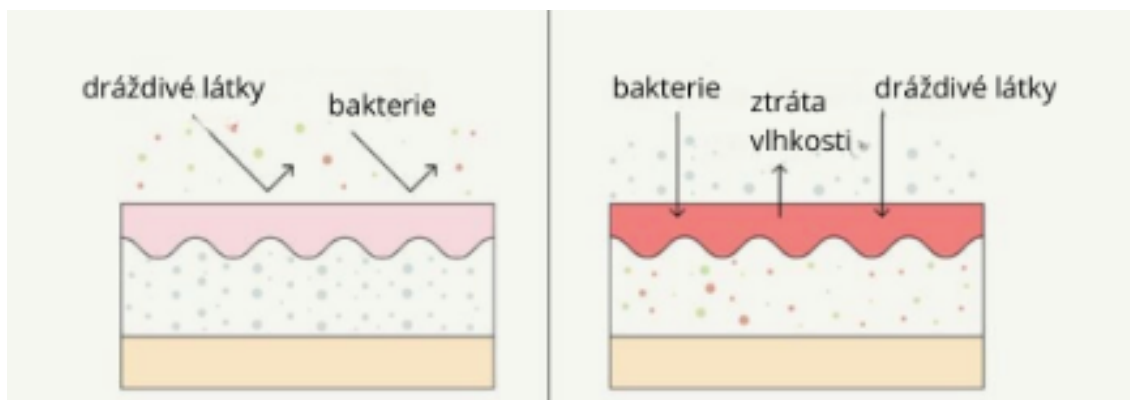
Obrázek 1: Stavba kůže

2.1.1.3 Epidermis

Epidermis je rozdělena do dvou dílčích vrstev, *stratum corneum* a *stratum cellulare*. Jde o svrchní vrstvu kůže, která se skládá především z epiteliálních buněk, keratinocytů produkujících keratin zajišťující strukturální integritu jednotlivých vrstev a neustále se obnovuje. Buňky ve vrstvě *epidermis*, keratinocyty, se neustále obnovují produkcí nových buněk v bazální vrstvě. Některé buňky se dělí a zůstávají v bazální vrstvě a některé z bazální vrstvy vyklouzávají, aby nastartovaly celý proces keratinizace. Buňky se přesouvají do vrchní části kůže a jakmile dosáhnou zrnité vrstvy, začnou ztrácet své orgány a přeměňují se na keratinizované buňky. Tyto buňky dříve nebo později vyschnou a odlupují se. Doba od narození buňky v bazální vrstvě do doby, kdy se odlupuje z kůže, je přibližně jeden měsíc, ale může se lišit podle věku člověka [8].

Stratum corneum je nejvzdálenější vrstva *epidermis* a označuje konečnou fázi vývoje keratinocytů. Tato vrstva se skládá z nejstarších buněk, které se dříve nebo později vyloučí a budou nahrazeny novějšími buňkami z nižších epidermálních vrstev (Obr.1). Tato vrstva obsahuje 50 % skleroproteinů, 20 % lipidů, 23 % ve vodě rozpustných složek a 7 – 10 % vody. Lipidické a ve vodě rozpustné složky, většinou aminokyseliny, močovina a polysacharidy, společně vytvářejí tzv. „Natural Moisturizing Factor“ (NMF) [9].

Hlavní funkcí *stratum corneum* je ochrana před nežádoucími látkami a nadměrnými ztrátami vody. Pokud je kožní bariéra neporušená, je kůže schopna se bránit před nežádoucími vlivy (Obr.2). Vlhkost v kůži je charakterizována transepidermální ztrátou vody (TEWL). TEWL je množství vody, které se pasivně odpařuje kůží vlivem vnějšího prostředí v důsledku gradientu tlaku par na obou stranách kožní bariéry. Za normálních podmínek je ztráta vody kůží 0,3 mg z 1 m² za hodinu při 30 °C [10].



Obrázek 2: Schéma funkce kožní bariéry. Vlevo zdravá kožní bariéra, vpravo poškozená kožní bariéra.

Stratum cellulare je vrstva kůže, která se skládá z intracelulární hmoty a mezibuněčné hmoty. Intracelulární hmota je tvořena vodou, proteiny a intracelulárními lipidy. Mezibuněčná hmota je tvořena lipofilními sloučeninami, jako jsou mastné kyseliny, ceramidy, cholesterol a fosfolipidy. V epidermální vrstvě kůže jsou také některé specializované buňky, například Langerhansovy buňky a dotykově orientované Merkelovy buňky [11].

Dalším typem specializovaných buněk jsou melanocyty, které produkují a obsahují pigment zvaný melanin, který kůži chrání před působením UV záření a určuje její barvu. Dále se v této vrstvě vyskytují endokrinní potní žlázy, které produkují pot především pro termoregulaci a apokrinní potní žlázy vylučují hustší pot s vůní, která je spojena s tělesným pachem. Dále kůže obsahuje mazové žlázy, které pomáhají udržet pokožku hydratovanou a chrání ji před patogeny [12].

2.2 Kosmetický přípravek

Kosmetický přípravek je látka nebo prostředek určený pro styk se zevními částmi lidského těla. Jeho cílem je zlepšovat vzhled pokožky nebo jiné části těla, měnit ho, čistit nebo chránit [8].

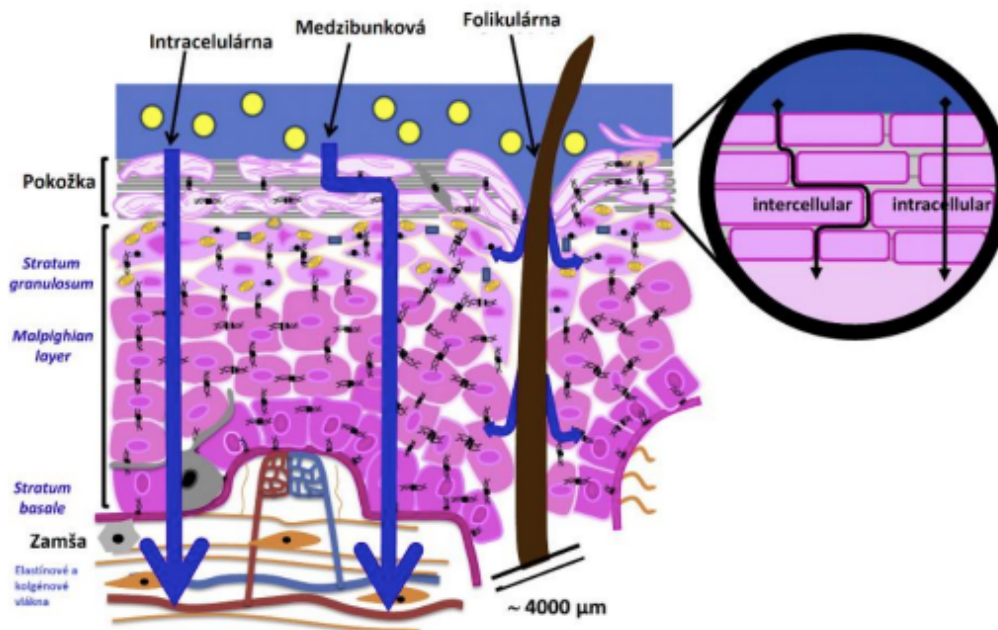
Každý kosmetický přípravek musí být naprosto bezpečný a správně a čitelně označený. Musí mít uvedenou dobu minimální trvanlivosti, což je období, po které si přípravek udrží zmiňovanou bezpečnost, dále složení INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) v sestupném pořadí podle koncentrace do >1% a barviva označená indexovým číslem Colour Index (CI) [13].

2.3 Kosmetický přípravek a kůže

Při používání kosmetického přípravku je očekáváno dostavení určitého výsledku. Tyto výsledky závisí na složení kosmetického přípravku, jeho charakteru, účinnosti

kosmetických složek v určitých hloubkách pokožky a vztahu vlastností kůže a kosmetického přípravku. Vlastnosti kůže, které mohou průnik ovlivnit jsou např.: zdravotní stav kůže, složení jednotlivých vrstev, které se u každého jedince mírně liší, lokalita kůže a hydratace a teplota kožního povrchu. U kosmetického přípravku pak jde hlavně o fyzikálně-chemické vlastnosti kůže a disperzní formu dané složky. Mnohem lépe se tak vstřebávají složky, které se složením podobají právě složení mezibuněčné hmoty.

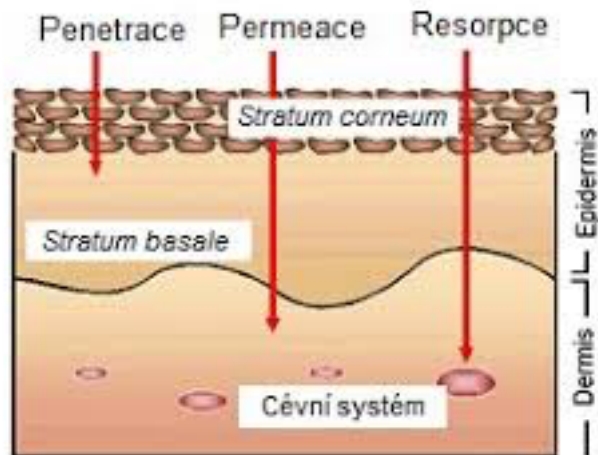
Prostup látek pokožkou může být různý. Obecně existují dva typy cest, kterými se může složka při aplikaci dostat pod povrch kůže: transepidermální a transfolikulární (Obr.3). Transfolikulárně pronikají látky přes folikuly [14].



Obrázek 3: Schéma průniku látek do kůže

Transepidermální cesty jsou následně dvě, a to intercelulární a intracelulární. Intracelulárně pronikají látky přes buňky a intercelulárně pronikají mezerami mezi jednotlivými buňkami. Schopnost jednotlivých složek pronikat kůží se ale liší v závislosti na vlastnostech dané látky [15].

Jak již bylo řečeno, různé druhy kosmetických přísad se mohou dostat do různých hloubek pokožky. Podle schopnosti složky pronikat kůží rozlišujeme penetraci, permeaci, adsorpci a absorpci. Adsorpci pronikají například složky jako silikonové deriváty nebo parafinové uhlovodíky. Tyto látky vlastně do pokožky nepronikají, ale zůstávají na povrchu kůže, kde tvoří ochranný film. Tenzidy a některé druhy olejů se do kůže dostávají penetrací, přičemž tento způsob průniku do kůže umožňuje látkám prostoupit přes vrchní vrstvu epidermis stratum corneum. Dalším způsobem průniku do kůže je permeace, která umožňuje průnik do hlubší vrstvy [16].



Obrázek 4 Cesty průniku látek do kůže

Díky permeaci pronikají například kosmetické látky na výživu a regeneraci až do vrstvy *dermis*. Jedná se například o CoQ, retinol a oleje s vyšším obsahem kyslíku. Nejhlouběji jsou látky schopné pronikat do kůže pomocí absorpce. Pronikají hluboko do *dermis* a jsou to obvykle látky na podporu aktivity fibrocytů. Obecně platí, že aktivní složky péče o pleť, jako jsou výživové složky, mají obvykle schopnost dostat se hlouběji do pokožky, zatímco ochranné složky, jako jsou silikony, parafinové oleje a jejich deriváty zůstávají více na povrchu (Obr.4).

Jak již bylo zmíněno, čím větší je podobnost látky k mezibuněčné hmotě, tím lépe látka proniká. Z toho vyplývá, že celkově mají olejové složky mnohem větší šanci proniknout do pokožky ve srovnání se sloučeninami na vodní bázi, protože složky na bázi oleje mohou jednoduše projít intracelulární maticí nebo folikulární cestou [17].

Na druhou stranu aktivní látky jako retinoidy, koenzymy nebo oleje s vyšším obsahem kyslíku pronikají hlouběji do pokožky, kde mohou například podporovat přeměnu kožních buněk. Jakmile se účinná látka dostane do kontaktu s *dermis*, dostane se do živých krevních cév a strukturální tkáň, jako je kolagen a elastin. To dává kosmetické složce šanci, aby pleť nějakým způsobem vylepšila a zkvalitnila [18].

Dalším faktorem, na kterém také záleží průnik kůží, je velikost molekul. Rozměr molekul je dán v Daltonech [Da] a také rozhoduje o tom, která složka v produktu bude pronikat hlouběji do pokožky, a která by měla pouze kondicionovat povrch pokožky. Příkladem může být různá velikost molekul kyseliny hyaluronové [19].

Týká se to především produktů péče o pleť. Pokud jde o make-up, i když na trhu existují produkty, které kombinují péči o pleť a make-up, hlavním cílem není aktivní péče, ale optické zlepšení pleti. Složky v tomto dekorativním produktu nepronikají do pokožky, pokud neobsahují některé aktivní složky. Hlavním účelem make-upu je vytvořit na pleti film, který vydrží [19].

2.4 Přírodní kosmetika

Za přírodní označujeme to, co se nachází v přírodě, ať už na souši, v půdě nebo v oceánech, nebo se získává přímo z rostlin, minerálů, zvířat nebo mikrobiálního světa [20].

Přírodní složka je pak chemická sloučenina, která pochází z rostlinné, minerální, živočišné nebo mikrobiální říše a získává se procesy fyzikální extrakce, ale bez jakékoli transformace složek. To je případ například běžně využívaných rostlinných olejů v kosmetice. Od přírodní složky se dále liší výraz složka tzv. přírodního původu, která již transformací prochází. V případě přírodní kosmetiky by tato transformace měla respektovat principy ekologické zelené chemie, která využívá minimum energie a rozpouštědel a vytváří minimum odpadu [21].

Složka se obvykle nazývá „chemická“, když je získána syntézou. Ke kontrole čistoty přísady se používají procesy analýzy. V případě přírodní složky, která neprochází žádnou přeměnou, je možná větší variabilita jejích vlastností jako je složení, barva nebo vůně. V kosmetickém průmyslu využíváme chemii k výrobě aktivních molekul, jejichž zdroje v přirozeném stavu jsou vyčerpány nebo se v přírodě nacházejí v malých množstvích, jako je vanilin nebo vitamin C. Tyto syntetické složky mohou být rostlinného, minerálního nebo fosilního původu (odvozené z ropy a jejích derivátů), avšak prošly větší chemickou přeměnou než složky čistě přírodního původu. Použití těchto chemicky transformovaných složek také umožňuje zachovat biologickou rozmanitost tím, že se přírodní molekula chemicky duplikuje. To je často případ složek používaných ve vůních [21].

Přírodní kosmetický produkt je tedy vyrobený primárně ze složek, které nějakým způsobem pocházejí z přírody. Formulace přírodní kosmetiky se zakládá na používání organických a udržitelných složek a často se vyhýbají syntetickým chemikáliím, umělým vůním a možným dráždivým přísadám, které lze nalézt v běžné, konvenční kosmetice [22].

Cílem přírodní kosmetiky je poskytnout péči o pokožku, vlasy apod. a zároveň minimalizovat negativní dopad jak na uživatele, tak na životní prostředí. Mezi nejběžněji používané přírodní kosmetické přísady patří esenciální oleje, rostlinné extrakty a přírodní másla. Hlavním společným znakem přírodního produktu je obsah minimálně 95 % složek přírodního původu. Na základě nejednotnosti termínu lze ale jen některé produkty certifikovat jako organické nebo přírodní, což pro zákazníka může být matoucí a obtížné z hlediska porozumění certifikátům a jejich rozdílům. S tím se také následně pojí problém tzv. „green washing“, kdy firmy využívají marketingové praktiky k propagaci svých produktů ve výrazně přírodnějším a ekologičtějším světle, než ve skutečnosti jsou [23].

2.5 Srovnání přírodní kosmetiky s konvenční kosmetikou

Na rozdíl od přírodních složek a složek přírodního původu, jsou tzv. složky „chemické“, získávány chemickou syntézou. Ke kontrole čistoty složky se používají procesy analýzy a v případě přírodní složky, která neprochází žádnou přeměnou, je možná větší variabilita jejích vlastností jako je složení, vůně či barvy [24].

V kosmetickém průmyslu využíváme chemii k výrobě aktivních molekul, jejichž zdroje v přirozeném stavu byly vyčerpány nebo se v přírodě nacházejí ve velice malých množstvích. Využití těchto chemicky transformovaných složek ale také umožňuje zachovat biologickou rozmanitost. Tento postup umožňuje duplikování přírodních molekul místo toho, aby byly využívány. To je často případ složek používaných v parfémtech. Při porovnání jednotlivých stránek přírodní a konvenční kosmetiky bylo zjištěno několik výhod přírodní kosmetiky [21].

Přírodní kosmetika obsahuje méně syntetických chemikálií, vůní a konzervačních látek, které mohou být příliš agresivní pro lidskou kůži, a naopak obsahuje jemnější složky, u kterých je podráždění kůže méně pravděpodobné, takže jsou vhodnější i pro citlivou pokožku. Syntetické látky mohou také představovat potíže s odstraněním v odpadních vodách. Dalším bodem je větší ohleduplnost k životnímu prostředí u přírodní kosmetiky. Tím, že většina producentů přírodní kosmetiky využívá také udržitelné a ekologické zdroje a obalové materiály, snižuje se jejich dopad na životní prostředí. Většina těchto značek také neprovádí testy na zvířatech [23].

Dalším pozitivním faktorem je bohatost přírodních látek na živiny. Přírodní ingredience, jako jsou rostlinné oleje, extrakty z rostlin a hub poskytují vitamíny, adaptogeny nebo antioxidační látky. Z hlediska běžného uživatele má přírodní kosmetika také výhodu, že seznamy INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) ingrediencí jsou často velmi jasné a srozumitelné.

Negativními aspekty následně mohou být například alergie na některé přírodní složky jako jsou esenciální oleje, nebo latex, větší náchylnost k případné kontaminaci a tím menší doba trvanlivosti vlivem využití přírodních konzervantů. Dalším faktorem je rozdíl v účinnosti přírodních složek vlivem prostředí, ve kterém jsou vypěstovány. Klima, půdní podmínky a metody sklizně mohou mít na konečný produkt velký vliv. V neposlední řadě, pokud je kosmetika kvalitní, přírodní ingredience mohou být velmi nákladné a výsledný produkt poté mnohem dražší, než běžná konvenční kosmetika [25].

2.6 Emulze

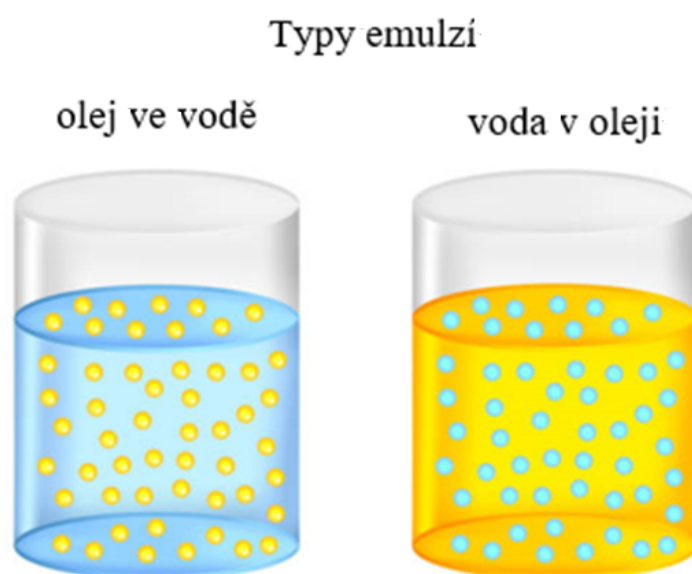
Většina kosmetických přípravků je ve formě emulzí. Emulze je heterogenní směs dvou částečně nemísitelných nebo nemísitelných kapalin, kde jedna z kapalin je přítomna ve formě malých kapiček jako dispergovaná fáze ve druhé kapalině, která vytváří kontinuální fázi. Ve většině případů se jedná o vodní fázi a olejovou fázi. V případě, že je voda ve formě malých kapiček, tedy dispergovanou fází, jedná se o emulzi typu voda v oleji (V/O), neboli „přímou“ emulzi. Když je tomu naopak, jedná se o emulzi typu

olej ve vodě neboli „reverzní“. Emulze tedy obsahují dvě fáze, přičemž hranice mezi nimi se nazývá „rozhraní“ (Obr.5) [26].

Systém emulze má tendenci mít zakalený vzhled, kvůli tomu, že mnoho fázových rozhraní rozptyluje světlo, když prochází emulzí. Systém se pak jeví jako bílý, když je veškeré světlo rovnoměrně rozptýleno. Pokud je emulze hodně zředěná, bude světlo s vyšší frekvencí rozptýleno více a emulze bude vypadat více do modra. Tento jev se nazývá „Tyndallův efekt“. Pokud je emulze naopak hodně koncentrovaná, barva bude zkreslená směrem k delším vlnovým délkám a bude se jevit více do žluté barvy [27]

Emulze lze také klasifikovat v závislosti na velikosti částic, které je tvoří. Můžeme je tedy rozdělit na makro, mikro a nanoemulze. Mikroemulze a nanoemulze s velikostí kapiček pod 100 nm se jeví jako průsvitné. Tato vlastnost je způsobena skutečností, že světelné vlny jsou kapičkami rozptylovány, a to pouze tehdy, pokud je jejich velikost větší než jedna čtvrtina vlnové délky dopadajícího světla. Vzhledem k tomu, že viditelné spektrum světla je složeno z vlnových délek mezi 390 a 750 nanometry, tak pokud jsou velikosti kapiček v emulzi menší velikosti než 100 nm, světlo může pronikat emulzí, aniž by bylo rozptýleno [28].

Z hlediska fyzikální chemie je emulze speciálním příkladem koloidního systému a dochází k přeskupování komponent, které se všechny snaží dostat do polohy s nejnižší potřebou energie, jak je to jen možné. Disperzní i spojitě fáze jsou ovlivněny vším, co s nimi přichází do styku [29].



Obrázek 5: Schéma rozdílu uspořádání emulze olej ve vodě a voda v oleji

V kosmetickém využití emulzí je velice důležitá jejich stabilita a nerozdělování fází v průběhu skladování. Jako stabilita emulze se označuje schopnost emulze odolat

změnam svých vlastností v průběhu času. Nestabilita emulzí se může projevit flokulací, koalescencí, sedimentací nebo tzn. Ostwaldovým zráním, což je proces přechodu menších kapiček v kapičky větších rozměrů v důsledku vyššího tlaku. K flokulaci dochází v případě, když mezi kapičkami působí přitažlivá síla a tvoří se vločky. Ke koalescenci dochází v případě, že do sebe kapičky narážejí a spojují se tak do větší kapky, takže průměrná velikost kapky se s časem zvyšuje [30].

Emulze mohou také podléhat krémování, kdy kapičky stoupají k povrchu emulze vlivem vztlaku nebo vlivem dostředivé síly vyvolané při použití odstředivky. Opačným jevem ke krémování je pak sedimentace a běžně se vyskytuje u emulzí voda v oleji. Sedimentace nastává v případě, když je dispergovaná fáze, tedy voda hustší než kontinuální olejová fáze a gravitační síly táhnou hustší kuličky ke dnu emulze. Oba tyto jevy se fyzikálně řídí Stokesovým zákonem [31].

Řešením nestability emulzí je pak vhodné povrchově aktivní činidlo, které může zvýšit kinetickou stabilitu emulze tak, že se velikost kapiček s časem významně nemění. Pokud se velikost a rozptyl kapiček v čase nemění, říká se, že je emulze stabilní. Proces destabilizace s použitím emulgátoru může trvat i několik let, takže pokud je potřeba proces urychlit v důsledku nutnosti otestování během vývoje, nejčastěji se využívají tepelné metody destabilizace, kdy dochází k prudkému zvýšení teploty. Tyhle metody se využívají i k simulaci reálných podmínek pro produkt, například u opalovacích krému ponechaných volně na slunci [32].

2.6.1 Emulgátor

Emulgátory jsou látky, které spadají do skupiny povrchově aktivních látek. Povrchově aktivní sloučeniny jsou typicky amfifilní, takže obsahují polární i nepolární část. Díky tomu dokáží smíchat dvě nebo více za normálních podmínek nemísitelných kapalin tím, že snižují povrchové napětí mezi kapalinami, a to umožňuje vytvářet stabilní emulzi. Následně pak udržují emulzi stabilní po dobu skladování, prodlužují dobu trvanlivosti a zlepšují její texturu. Ty emulgátory, které mají větší afinitu k vodě, budou obecně tvořit emulze olej ve vodě, zatímco emulgátory, které mají větší afinitu k oleji, budou podporovat vznik V/O emulze. Kontinuální fází tedy bude ta fáze, ke které má emulgátor větší afinitu [33].

Volba emulgátoru závisí na konkrétní aplikaci, požadovaných vlastnostech a kompatibilitě emulgátoru s ostatními složkami. Různé emulgátory mají různé vlastnosti a funkce, díky čemuž jsou vhodné pro různá průmyslová odvětví a produkty.

Emulgátory můžeme podle elektrického náboje rozdělit na kationtové, aniontové a amfifilní.

Kationtové emulgátory nesou kladný náboj a často se používají ve formulacích, kde jsou potřeba kladně nabitě molekuly, jako jsou vlasové kondicionéry a aviváže. Mohou tak pomoci při rozčesávání vlasů, protože prostřednictvím elektrostatické přitažlivosti přilnou k negativně nabitému povrchu, který vlas nese. Také se ze stejného důvodu používají hlavně v kosmetice, která má za úkol na pokožce zůstat delší dobu, jako jsou

opalovací krémy, právě kvůli zápornému náboji pokožky. Ve vyšších koncentracích ale mohou pokožku dráždit, a proto se nevyužívají v produktech péče o pleť, které se z pokožky nesmývají vůbec [34].

Aniontové emulgátory naopak nesou záporný elektrický náboj a často se používají v široké řadě aplikací, včetně mnoha čisticích prostředků, mýdel a detergentů. Jsou účinné při rozptylování a odstraňování nečistot a mastnoty, protože mohou interagovat s kladně nabitými částicemi a oleji. Oba typy emulgátorů, aniontové i kationtové, jsou citlivé na to, co se děje ve vodní fázi (pokud je emulze O/V) a fungují nejlépe s relativně jednoduchým složením této fáze, než s fází s vysokým obsahem aditiv [35].

Amfoterní emulgátory pak zůstávají často první volbou pro většinu aplikací v kosmetice díky své flexibilitě, nízké potenciální chemické interakci s ostatními složkami a také kvůli tomu, že neobsahují žádný vnější elektrický náboj způsobený volnými ionty. Jejich hydrofilní hlava je nabitá kladně i záporně. Tímto způsobem mohou fungovat buď jako kationtové emulgátory nebo aniontové emulgátory v závislosti na pH [35].

2.6.1.1 Přírodní emulgátory

Přírodní emulgátory jsou emulgátory získané z přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, živočišné produkty nebo minerály. Používají se v různých průmyslových odvětvích, včetně potravinářství, kosmetiky a farmacie [21].

Fosfolipidy jsou sloučeniny s hydrofilní a lipofilní částí molekuly. Jsou základními složkami buněčné membrány a jsou organizovány ve dvou vrstvách. Jejich amfifilní charakter je zodpovědný za jejich emulgační vlastnosti. V kombinaci s jinými mastnými kyselinami a mastnými alkoholy jsou emulgační vlastnosti ještě lepší. Jsou dobrou volbou, pokud jde o stabilizaci přírodních receptur [36].

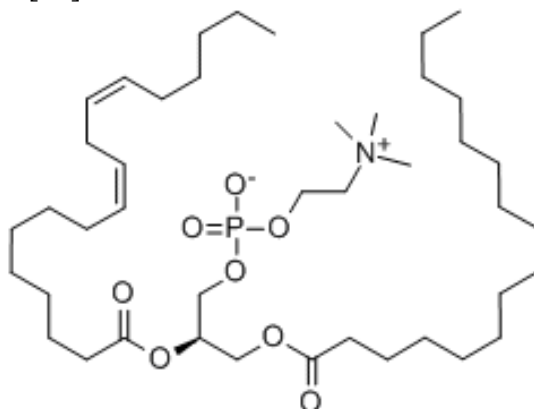
Přírodní emulgátory na bázi fosfolipidů jsou oblíbené u spotřebitelů, kteří preferují produkty s menším množstvím syntetických přísad. To, že pocházejí z přírodních zdrojů, jim umožňuje být v souladu s pravidly, kterým podléhá přírodní kosmetika.

Stabilita emulze se může lišit v závislosti na konkrétním použitém přírodním emulgátoru, formulaci a podmínkách, za kterých je emulze skladována. V mnoha případech mohou přírodní emulgátory při správném použití zajistit dobrou stabilitu emulze. Při upřednostnění přírodních emulgátorů před syntetickými je nutné zohlednit několik faktorů. Při použití přírodního emulgátoru je nezbytné správné vyvážení poměrů vody a oleje, zvolení správné emulgační techniky a správné teploty. Dále se výsledná emulze musí udržovat ve vhodném prostředí bez většího vystavování teplu a světlu. [37]

Lecitin

Lecitin je kaštanově hnědá látka s ořechovou vůní. Je jedním z nejdůležitějších přírodních emulgátorů. Skládá se z glycerolu, který váže až tři další molekuly, a to mastné kyseliny a kyselinu fosforečnou, která je vázána na glycerol (Obr.6). Díky hydrofobním mastným kyselinám je struktura lecitinu podobná lipidům. Kyselina fosforečná má pak připojenou

aminokyselinu, známou také jako cholin. Tento konec lecitinu, který má fosfát a aminoalkohol, je hydrofilní [38].

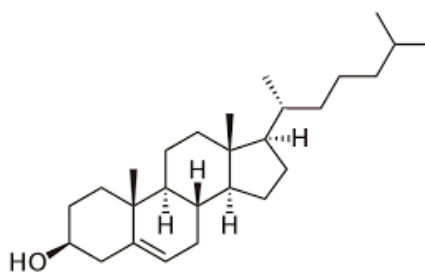


Obrázek 6: Struktura lecitinu

V kosmetice se nejčastěji využívá sójový lecitin, který se získává ze sójových bobů a působí regeneračně, optimalizuje funkčnost pokožky, regeneruje, zjemňuje a má protizánětlivé účinky. Lecitin je tak účinným emulgátorem, protože jeho hydrofilní část se rozpouští ve vodě, zatímco hydrofobní část se rozpouští v oleji. Jediné místo, kde se lecitin tedy v emulzi přirozeně nachází, je na okraji kapiček oleje. Jeho hydrofilní konec je natočen směrem k vodě, zatímco jeho hydrofobní konec k oleji. Vzhledem k hydrofilní a hydrofobní části molekuly je lecitin schopen dobře stabilizovat oba typy emulze, jak O/V, tak i V/O [39]

Cholesterol

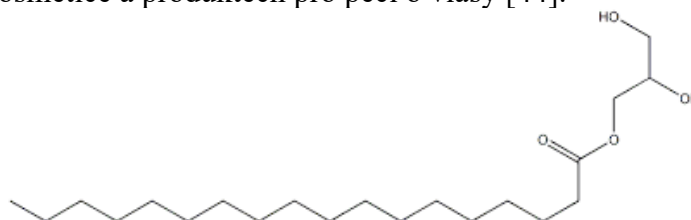
Cholesterol patří do skupiny sterolů a je pro metabolismus zcela zásadní látkou. Je důležitou součástí buněčných membrán a vzniká z něj řada významných látek jako steroidní hormony, žlučové kyseliny a vitamin D. Molekula cholesterolu vzniká v metabolismu prostřednictvím izoprenoidní dráhy kondenzací izoprenů a pozdějším vznikem skvalenu, který je přes lanosterol konvertován na cholesterol (Obr.7). Klíčovým enzymem této syntézy je HMG-CoA-reduktáza. [40].



Obrázek 7: Struktura cholesterolu

Glycerol monostearát

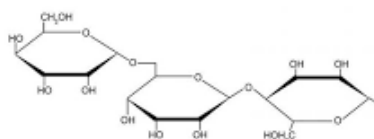
Glycerol monostearát, běžně známý jako GMS, je monoglycerid běžně používaný jako emulgátor v potravinách a méně často v kosmetice. Má vzhled bílého vločkovitého prášku bez zápachu a sladké chuti a je hygroskopický. Jedná se o glycerolester kyseliny stearové (Obr.11). GMS je potravinářská přísada používaná jako zahušťovací, emulgační, protispěková a konzervační látka a emulgační činidlo pro oleje, vosky a rozpouštědla. Používá se také v kosmetice a produktech pro péči o vlasy [44].



Obrázek 11: Struktura glycerolmono stearátu

Arabská guma

Arabská guma (Obr.12) je také známá jako guma z akácie, z jejíž mízy se získává. Rozpouští se ve vodě, působí jako emulgátor a zahušťovadlo ve vodných i olejových směsích. V pevném skupenství ji najdeme jako bílý prášek [45].



Obrázek 12: Struktura arabské gumy

2.7 Typy kosmetických ingrediencí

2.7.1 Rozpouštědlo

Nejčastější rozpouštědla v kosmetice jsou voda a ethanol, přičemž každé vykazuje určité výhody a nevýhody. Voda je organismu vlastní, je bez chuti, barvy a zápachu a má dobré čistící schopnosti. Negativní stránkou vody ovšem může být kondenzace, podpora růstu mikroorganismů a podpora nežádoucích chemických reakcí. Ethanol pokožku dobře čistí, má dezinfekční a adstringentní vlastnosti a inhibuje růst mikroorganismů. Při vyšších koncentracích může ale kůži zbytečně vysušovat a dráždit [46].

2.7.2 Humektant

Humektant neboli zvlhčovač je hygroskopická látka používaná k udržení vlhkosti. Používají se v mnoha produktech i v potravinářství a v kosmetice mohou být zvlhčovačla použita v topických dávkových formách ke zvýšení rozpustnosti aktivních složek, zvýšení schopnosti aktivních složek pronikat kůží nebo doby jejich aktivity [47].

Tato hydratační vlastnost může být také prospěšná k tomu, že působí proti dehydratační aktivní složce. Molekula často obsahuje několik hydrofilních skupin, nejčastěji hydroxylové, lze se však setkat i s aminy a karboxylovými skupinami [47].

Mezi nejčastěji používané humektanty patří zpravidla glykoly. Glycerin je jedním z nejoblíbenějších používaných zvlhčovadel, protože poskytuje požadovaný výsledek poměrně často a má nízkou cenu. Dále pak je vhodný butylenglykol, pentylenglycol a propylenglycol [48].

2.7.3 Emolient

Emolienty, neboli změkčovačla jsou promašťující látky přidávané do kosmetických přípravků z důvodu dodání lipidů. Zvyšují obsah vlhkosti v pokožce snížením hodnoty TEWL (měření transepidermální ztráty vody) a poskytují pokožce měkký, hladký a nemastný pocit. Jako emolienty se používají oleje a tuky [49].

2.7.4 Aktivní látka

Aktivní látkou v kosmetice je látka, která poskytuje specifický a prokázaný účinek a proniká do určité vrstvy v kůži. Tyto látky představují širokou kategorii složek včetně například kyselin, vitamínů, proteinů, peptidů a přírodních extraktů. Přírodní extrakty mohou poskytnout široké spektrum pozitivních účinků, např.: antioxidační, zklidňující, hydratační atd. Efektivita těchto extraktů následně záleží na typu, potenci extraktu, a hlavně jeho složení. Některé aktivní látky mohou za určitých podmínek vyvolat farmakologické nebo toxické účinky [50].

2.7.5 Emulgátor

Emulgátory jsou klíčovou látkou ve výrobě emulzí. Závisí na nich kvalita emulze i její stabilita. Více byly emulgátory a jejich funkce byly popsány v kapitole 2.6.1 v rámci problematiky emulzí.

2.7.6 Konzervant

Látka, která výsledný produkt zakonzervuje, je nezbytnou součástí každého kosmetického přípravku. Zaručuje bezpečnost a kvalitu kosmetiky po její maximální dobu skladování a je specifická pro každý produkt. Konzervant zabraňuje nežádoucímu růstu mikroorganismů a prodlužuje tak životnost produktu. Většina využívaných konzervantů v kosmetice je syntetická. Mezi přírodní konzervační látky se řadí extrakt ze semen grapefruitu, rozmarýnový extrakt, vitamín E, olej z čajovníku, nebo extrakt ze

zimolezu. Antimikrobiální aktivitu vykazují vesměs veškeré esenciální oleje, ovšem ne vždy dostatečnou [51].

2.8 Charakteristika hub

Houby jsou velmi početnou skupinou organismů. V současné době je popsáno kolem 130 000 druhů hub, ale předpokládá se, že jich je na světě téměř dvojnásobek. Houby mají velmi důležitou roli jak v přírodě, tak v životě lidí. Mezi základní úlohu v přírodě patří jejich schopnost rozkladu organické hmoty na anorganické sloučeniny. Podílejí se také na humifikaci, kdy se z částečně rozložené organické hmoty tvoří humusové látky. Spolu se zelenými rostlinami tak tvoří koloběh života na Zemi. Pokud jde o přímé využití hub člověkem, nižší houby, např. kvasinky a plísňe, se používají hojně v potravinářství a jiné druhy produkují enzymy, hormony, antibiotika, barviva nebo vitaminy [52].

Do nedávna byly houby vnímány jako vedlejší vývojová větev nižších rostlin a až na základě hlubšího výzkumu fylogenetického vývoje hub došlo ke zjištění, že houby vznikly samovolně. Tím pádem je tedy nutné houby jako takové považovat za samotnou říši Fungi vedle říše rostlin (Plantae) a živočichů (Animalia). Fungi jsou tedy eukaryotické heterotrofní organismy, jejich tělo má jednoduchou stavbu, mohou být jednobuněčné i mnohobuněčné. Pod pojmem houba si lze představit jak houbu s plodnicí, na kterou narazíme v lese, tak vláknité nebo jednobuněčné mikroskopické organismy.

Vláknité houby jsou plísňe a jednobuněčné mikromycety např.: kvasinky. Makromycetami pak nazýváme houby velké, například ty, které běžně konzumujeme.

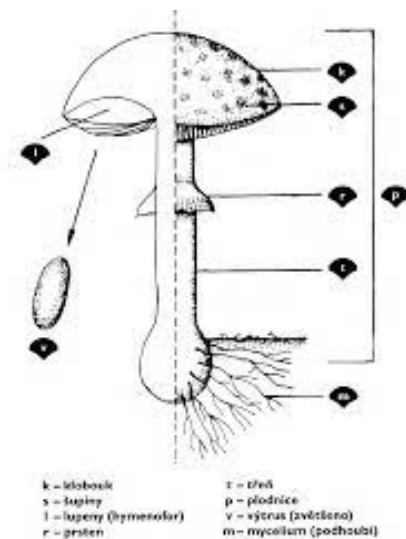
Studiem hub se zabývá mykologie. Obecně se houby liší od rostlin především způsobem života, výživy a rozmnožování. Z hlediska složení hub lze obecně říct, že jsou houby zdrojem minerálních látek, vitamínů, bioflavonoidů, bílkovin a vlákniny. Dále obsahují vonné látky, které jsou pro konzumenty nejcennější složkou hub, jelikož na nich závisí vůně a chuť jednotlivých druhů [53].

2.8.1 Vyšší houby

Na základě morfologických znaků vyšších hub jsou houby zařazovány do jednotlivých oddělení, např.: *Basidiomycota*, *Acosomycota*, *Zygomycota*. Tělo houby má jednoduchou stavbu. Je tvořeno stélkou, která je tvořena vláknitými buňkami mikroskopických rozměrů tzv. hyfami a u mikroskopických hub může být jednobuněčná. Houby přijímají živiny z prostředí ve formě organických látek. Tyto složky rozkládají vně své stélky tím, že do nejbližšího okolí vylučují hydrolytické enzymy, které tak štěpí substrát na menší části. Ty jsou pak absorbovány dovnitř stélky houby [54].

Hlavními zásobními látkami hub je glykogen a tuky. Transportními látkami jsou sacharidy, které se transportují stélkou ve formě cukerných alkoholů a disacharidu trehalózy. Hyfy jsou směřovány k živinám a jsou rozdělovány do dvou směrů. První vede k vytvoření vegetativního podhoubí neboli mycelia, které má podobu bílé vláknité

struktury. Hlavní funkcí je zajistit výměnu energie a potřebných látek. Mycelium může mít různou velikost, a to od několika desítek centimetrů až po desítky metrů čtverečních. Druhý směr růstu hyf je morfologicky odlišný, nese rozmnožovací orgány a vede k tvorbě plodnic. Vyšší houby tvoří různě velké plodnice (Obr.13), které tvoří klobouk a třeň. Plodnice je určena k rozmnožování pomocí výtrusů, je složena z hyfového pletiva a její součástí jsou výtrusorodé buňky jako vřečka, bazidie a konidie [55].



Obrázek 13: Schéma plodnice houby

Tvar plodnice je různý v závislosti na různém druhu houby a stejně tak i její velikost. Může dosahovat až několika decimetrů. Na třeni houby se může, ale nemusí vyskytovat prstenec. Vnitřek plodnice je tvořen dužinou, která může mít různou strukturu. Mezi typy dužin patří masitá, vodnatá, šťavnatá, suchá, vláknitá, kožovitá, tuhá a dřevnatá. Typ dužiny lze lehce rozpoznat příčným řezem plodnicí [56].

2.8.2 Medicinální houby

Nejstarší písemné zmínky o léčivých účincích hub pocházejí již z doby před 5000 lety z Indie a například staří Egypťané považovali houby za posvátné a věřili, že prodlužují život. Medicinální houby jsou kategorie hub, která má důležité zdravotní přínosy a vykazují široké spektrum farmakologických aktivit včetně antialergických, antibakteriálních, antifungálních, protizánětlivých, antioxidačních účinků. Bylo prokázáno, že tato kategorie vykazuje antivirový, cytotoxický, imunomodulační, antidepressivní, antihyperlipidemický, antidiabetický účinek a mnoho dalších [57].

Medicinální nebo také vitální houby, jak se často nazývají, obsahují bioaktivní sloučeniny, u kterých byly zkoumány jejich účinky a mechanismy v klinických studiích in vitro a in vivo [25].

V Asii byly používány k podpoře a udržování zdraví a imunity a léčbě nemocí již od starověku. Jejich využívání na Západě je však podstatně novějších dat. Léčivé houby byly ceněny pro svou kulinářskou a nutriční hodnotu, ale nyní jsou stále více ceněny

pro své léčivé vlastnosti. Rovněž se medicínální houby používají v oblasti onkologie, a to pro své imunomodulační a protinádorové účinky, které doplňují tradiční léčbu, zlepšují její účinek a snižují její vedlejší účinky [57].

Některé houby byly také v několika studiích testovány na protirakovinnou účinnost a vykazovaly schopnost potlačovat tumorigenezi a metastázy různých druhů onkologických onemocnění. Tyto aktivity lze přičíst mnoha bioaktivním metabolitům přítomným v myceliu a především v plodnici, jejichž biologický účinek se liší podle chemické povahy a jejichž distribuce se liší podle druhu houby [58].

2.8.2.1 Medicínální houby v kosmetice

Houby také obsahují mnoho bioaktivních sloučenin, jako jsou flavonoidy, fenolické sloučeniny, terpeny, polysacharidy a mastné kyseliny. Výtažky z hub díky své přítomnosti vykazují protirakovinné, protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Jak plodnice, tak mycelia mají uvedené vlastnosti a díky nim se používají v kosmetologii. Pro své antioxidační vlastnosti a schopnost absorbovat UV záření se přidávají do kosmetiky proti stárnutí. Výtažky z hub vykazují hydratační a zesvětlující účinek na pokožku, díky čemuž jsou užitečné také v kosmetickém průmyslu. Houby s protizánětlivými a antimikrobiálními účinky lze najít v přípravcích pro citlivou a problematickou pleť [59]. V jedné studii byly analyzované extrakty hodnoceny topickou aplikací extraktů na kůži v nízké koncentraci. Analyzované extrakty medicínálních hub jako *Reishi* a podobně jsou dobře známé suroviny s dlouhou historií použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, takže toxikologický profil extraktů nenaznačoval žádná rizika. Látky mají navíc číslo CAS a nepodléhají žádným omezením v kosmetickém průmyslu [60].

Některé medicínální houby obsahují různé specifické bioaktivní sloučeniny, jako je kyselina jablečná, kyselina fumarová, kyselina citrónová, erinacin, kyselina ganoderová a kyselina lucidenová, které mají schopnost chránit buňky před škodlivými účinky volných radikálů [61].

2.8.2.2 Vybraní zástupci medicínálních hub

Lesklokorka lesklá (*Ganoderma lucidum*)

Lesklokorka lesklá, *Reishi* neboli *Ganoderma lucidum* je orientální houba, která má dlouhou historii používání k podpoře zdraví a dlouhověkosti v Číně, Japonsku a dalších asijských zemích.



Obrázek 14: Lesklokorka lesklá

Jde o velkou, tmavou houbu s lesklým zevněškem a dřevitou texturou. Latinské slovo *lucidus* znamená „lesklý“ a odkazuje na lakovaný vzhled povrchu houby. Taxonomicky se *Reishi* řadí do basidiomycet. V Číně se tato houba nazývá lingzhi, zatímco v Japonsku je název pro čeled' *Ganodermataceae reishi* nebo *mannentake*. Mezi pěstovanými houbami je lesklokorka jedinečná v tom, že je její význam spíše farmaceutický než nutriční. Různé komerční produkty lesklokorky jsou dostupné v různých formách, jako jsou prášky, doplňky stravy a čaj. Ty jsou produkovány z různých částí houby, včetně mycelia, spor a plodového těla. Mezi specifické aplikace a její přisuzované zdravotní přínosy patří hlavně kontrola hladiny glukózy v krvi a modulace imunitního systému. V asijských zemích ji lékaři často doporučují jako doplněk na podporu imunitního systému při léčbě rakoviny. Laboratorní výzkum a preklinické studie navíc ukázaly slibné výsledky protinádorové aktivity [62].

Důkazy o její antikarcinogenní aktivitě ovšem nejsou dostačující, takže je prozatím využívána jen jako doplňková léčba. Houba má minimum vedlejších účinků, podle klinické studie bylo hlášeno jen několik případů menších vedlejších účinků spojených s léčbou houbou *Reishi*, a to nevolnosti a nespavost. Účinné aktivní látky obsažené v houbě se různí na základě mnoha faktorů. Mohou záviset na sklizni, stáří plodu, manipulaci při transportu a také skladování houby. Z mycelia, plodnic nebo spor mohou být extrahovány různé sloučeniny s různou biologickou aktivitou, z nichž některé bývají spojovány s možnými terapeutickými účinky. Kvalitně sklizené a skladované plodnice obsahují více než 100 vysoce oxidovaných a farmakologicky aktivních triterpenů, polysacharidy, cerebrosidy a fenolické látky. V houbě byly podle několika studií objeveny dva hlavní

typy triterpenoidů, kyselina ganoderová, která potlačuje růst HeLa buněk navozením buněčné smrti a kyselina lucidenová [63].

Triterpenoidy jsou velmi přínosné látky a přispívají ke snížení krevního tlaku a hladiny cholesterolu v krvi. Byla potvrzena také antimikrobiální aktivita proti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Salmonella typhimurium*. Antimikrobiální aktivita houby je způsobena přítomností polyfenolických kyselin, flavonoidů, chinonů a terpenů [64].

Pozitivní účinky *Reishi* již byly zaznamenány i v kosmetickém průmyslu. Výzkum *Reishi* z hlediska těchto vlastností a jejich potencionálního využití v kosmetice ukázal, že testované extrakty *Reishi* nezvyšovaly množství reaktivních forem kyslíku ve fibroblastech a keratinocytech. Přídavek houbových extraktů do mycích gelů snížil dráždivý účinek na pokožku a intracelulární produkci volných radikálů ve srovnání s kosmetickým základem. Navíc se ukázalo, že analyzované kosmetické přípravky měly pozitivní vliv na pH a hydrataci pokožky a také snižovaly hodnotu TEWL [60].

Extrakt z této houby má v kosmetice další významné účinky, protože vykazuje antioxidační, antiperoxidační, antibakteriální a protizánětlivou aktivitu. Díky vysoké koncentraci polysacharidů v sušině hub mohou být houbové extrakty cennou surovinou především pro čistící kosmetiku. Vzhledem k tomu, že jde o produkty, které spotřebitelé používají ve velkém množství, mnohokrát denně, je největší nevýhodou čistící kosmetiky tendence pokožku dráždit, což je vyvoláno povrchově aktivními látkami, které jsou v čistící kosmetice hlavními složkami. Povrchově aktivní látky mají schopnost interagovat s kožními proteiny, což vede k jejich denaturaci a vymývání z pokožky. Houbové polysacharidy, proteiny a sacharidy jako přírodní polymery mohou interagovat s micelami povrchově aktivních látek a způsobit zvýšení jejich stability a ve skutečnosti vést ke snížení dráždivého potenciálu [59].

Rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*, Chaga)

Rezavec šikmý, latinsky *Inonotus obliquus* je víceletá dřevokazná houba z čeledi kožovkovitých. Pochází původem ze Sibíře a severní oblasti Číny, kde se z ní už dlouho připravují odvary k terapiím a pro své výsledky získala přezdívku „Dar od boha“. Na Sibíři se z této houby používal horký výluh ve formě čaje proti tuberkulóze, bolestem břicha, chorobám jater a srdce. Za tímto účelem se houba sbírala pouze na podzim a na jaře, kdy údajně obsahuje nejvíce účinných látek [65].



Obrázek 15: Rezavec šikmý

Chaga, jak je také rezavec nazýván, se velmi hodí i pro zmírnění autoimunitních potíží, protože dokáže imunitní systém stimulovat a v případě potřeby také tlumit. Můžeme ji nalézat na kmenech bříz a dalších listnatých stromů. Rezavec způsobuje, že se v hostitelském stromu vyvine bílá srdcovitá hniloba a spory houby vstupují do stromu přes rány, zvláště pak přes špatně zahojené uřezané větve. Bílá hniloba se následně rozpadne a rozšíří se po jádrovém dřevě hostitele. Během infekčního cyklu tak dochází k pronikání bělového dřeva pouze kolem sterilní vnější hmoty mycelia. Houba následně dlouhodobě způsobuje rozpad uvnitř živého stromu, a to až po dobu 10 – 80 let. Během života stromu vytváří pouze sterilní myceliální hmoty. Sexuální fáze začíná poté, co je strom nebo některá část stromu zabita infekcí. Houba tak začne produkovat plodnice pod kůrou. Tyto plodnice nejdříve vypadají jako bělavá hmota, která v průběhu času zhnědne. Vzhledem k tomu, že pohlavní stadium probíhá téměř výhradně pod kůrou, jsou plodnice vidět jen zřídka. Tyto plodnice následně produkují bazidiospory, které rozšíří infekci na další zranitelné stromy. Dokonale vypadající houby můžeme nalézt v období od července do listopadu na mrtvých kmenech listnatých stromů v místech poranění. Postiženy bývají zejména břízy, často ale také další listnaté stromy jako buk, topol, dub nebo olše. Plodnice rezavce jsou jednoleté a dorůstají do délky i několika metrů. Mohou zabírat až polovinu obvodu kmene stromu, na kterém parazitují. Podhoubí rezavce má žlutohnědou barvu, která je patrná na lemu plodnic. Tím, že plodnice rostou výhradně pod kůrou stromů, tak způsobují její nadzvedávání a odpadávání [66].

Dokonalé plodnice jsou velmi křehké a póry jsou u mladých plodnic bílé až okrově žluté, u starších hnědé. Nedokonalé plodnice se vyskytují po celý rok a jsou víceleté. Mohou se dožívat až 20 let a bývají 10 až 35 centimetrů velké. Mají nepravidelný, polokulovitý tvar a jejich povrch má šedou až hnědozelenou barvu, později i šedozelenou až rezavě hnědou a je rozpraskaný [67].

Z hlediska zdravotních účinků je rezavec schopen pozitivně ovlivňovat funkci trávicího ústrojí a jater a registrovat patogeny, které likviduje. Z hlediska tradiční čínské medicíny Chaga charakterizuje sladká chuť a stimulace trávicího traktu. Díky stimulaci

trávicího traktu může dobře posloužit třeba při různých střevních potížích jako je zácpa, ale také u Crohnovy choroby nebo ulcerózní kolitidy. Její užívání může podpořit trávení. Mezi nejvýznamnější účinky patří právě ochrana a regenerace jater, podpora kardiovaskulárního systému, schopnost snížení cholesterolu, podpora a očista střev a její antioxidační schopnost. Působí také jako adaptogen, což se projevuje hlavně v odolnosti organismu vůči vnějšímu prostředí, odolnosti vůči stresovým situacím a ve zpomalování stárnutí buněk. Rovněž ji lze využít ve stomatologii k terapii parodontózy [68].

Složení plodnic je bohaté na aktivní látky. Na biologické aktivitě rezavce šikmého se podílí několik skupin látek. K hlavním obsahovým látkám patří fenolické sloučeniny jako polyfenoly, fenolické kyseliny jako kyseliny syringová, vanilová a trametonolová a chinony. Triterpeny jsou další významnou skupinou látek. Byl izolován inotodiol, což je protizánětlivý sterol, kyselina betulinová stejně jako příbuzný betulin. Betulin extrahovaný z Chaga získal využití právě v kosmetickém průmyslu pro své hojivé a protizánětlivé účinky. V pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že betulin z březové kůry snižoval obsah cholesterolu v krevním séru a byl s úspěchem použit u obézních pacientů [65].

Rezavec obsahuje poměrně velké množství polysacharidů. Nejvýznamnějším je polysacharid IOP („*Inonotus obliquus* polysaccharide“), který má lineární strukturu složenou z glukózy typu α -D v poloze 1 \rightarrow 6. Většina polysacharidů snižujících glukózu má (1 \rightarrow 6) glykosidickou vazbu a představuje nejúčinnější složku houby Chaga. U tohoto polysacharidu již byl prokázán vliv léčbu a prevenci nádorů, metabolických poruch a mnoha chronických onemocnění. Bylo popsáno, že polysacharidy rezavce (IOP) zvyšují imunitní odpověď a zmírňují oxidační stres během vývoje [69].

Díky svojí struktuře může IOP chránit střevní bariéru včetně zlepšení její propustnosti. V jedné studii bylo prokázáno, že má IOP silnou antioxidační aktivitu pro vychytávání volných radikálů in vitro a vivo [70].

V kosmetice má Chaga velmi rozmanité využití. Vyznačuje se schopností zklidňovat kožní onemocnění, jako je akné, alergické reakce, kousnutí hmyzem, vyrážky, dermatitida, lupénka, svědění, růžovka, ekzém. Byly také prokázány její antioxidační účinky, díky kterým pomáhá extrakt z rezavce redukovat a zesvětlovat pigmentové skvrny způsobené UV zářením. Antioxidanty také eliminují oxidační stres a tím zabraňují vzniku vrásek a akné. Hodnota ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je pro tuhle houbu nejvyšší mezi přírodními potravinami. Tento test pomáhá určit množství obsahu antioxidantů v potravinách, které pomáhají vytvořit životaschopnou obranu proti přílivu volných radikálů [71].

Dalším účinkem je také pružnost pokožky podporou produkce kyseliny betulinové, která je známá pro regeneraci pokožky. V závislosti na rozsahu poškozené pokožky může Chaga pomoci při obnově a regeneraci kožních buněk. V současné době je extrakt z rezavce obsažen hned v řadě kosmetických přípravků, právě pro jeho zklidňující vlastnosti [72].



Obrázek 16: Sérum s obsahem houby Chaga

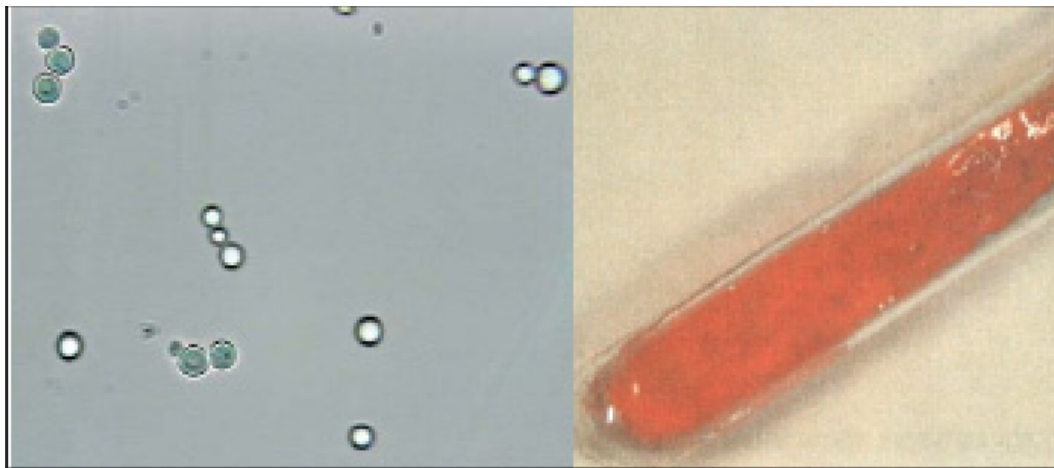


Obrázek 17: Sérum s obsahem Reishi a Chaga

2.8.3 Nižší houby

Rhodotorula toruloides

Rhodotorula toruloides je kvasinka, červená bazidiomyceta, izolovaná z dřevité drti jehličnanů, přirozeně akumuluje karotenoidy, neutrální lipidy a enzymy. Jednou z nejvýznamnějších charakteristik této kvasinky je to, že se jedná o olejnatý mikroorganismus, což znamená, že akumuluje lipidy až do více než 60 % své suché hmotnosti buněk a stejně tak i karotenoidy a enzymy, látky, které se dají následně dobře uplatnit v chemickém a farmaceutickém průmyslu [73][74].



Obrázek 18 *Rhodotorula toruloides*

Díky přirozené syntéze karotenoidů má červenorůžový fenotyp. Ve srovnání s olejnatými kvasinkami dokáže *R. toruloides* akumulovat vyšší obsah lipidů v buňce. Většinu lipidů tvoří triacylglyceroly s délkou řetězce C16~18, ale byly pomocí této kvasinky už vyrobeny i např. terpeny a neribozomální peptidy. Jedním ze zajímavých pokusů v rámci studie produkce lipidů je zavedení fosfotransacetylázy ke zvýšení zásoby acetyl-CoA, což vede právě ke zvýšené produkci lipidů [75].

Co se týče aplikace uvedené kvasinky v kosmetickém průmyslu, tak bylo zjištěno, že profil mastných kyselin *R. toruloides* by měl podobné složení jako profil mastných kyselin ve vrstvě *stratum corneum*. Když byl lipidový extrakt *R. toruloides* aplikován na keratinocyty, zvýšila se exprese filaggrinu. Filaggrin je generován proteolýzou profilaggrinu a degradován kaspázou, což vede k produkci přirozeného zvlhčujícího faktoru (NMF - natural moisturizing factor). Produkty degradace filaggrinu, jako je NMF, přispívají k obsahu vody ve *stratum corneum*, což je kritický faktor při hydrataci kůže [76].

Zejména lipidový extrakt získaný z *R. toruloides* má tedy potenciální výhody pro kosmetické aplikace. Lipidový extrakt vykazuje také antioxidační aktivitu, která je prospěšná pro ochranu pokožky před oxidačním stresem a poškozením životního prostředí. V kosmetických produktech by lipidový extrakt získaný z *R. toruloides* mohl být použit jako složka péče o pleť, která poskytuje hydrataci, podporuje funkci kožní bariéry, snižuje degradaci kolagenu a nabízí antioxidační výhody. Jeho potenciál jako „růžového oleje“ pro kosmetické aplikace naznačuje, že by mohl být začleněn do různých přípravků péče o pleť pro podporu zdraví a vzhledu pokožky [77].

2.9 Vybraní zástupci rostlin

2.9.1 Hřebíček (*Syzygium aromaticum*)

Hřebíček je sušený plod rostliny hřebíčkovce kořeného (Obr.18, 19). Původ této rostliny je na Moluckých ostrovech. Nejvíce jej známe z kuchyně, kde se používá ke koření sladkých potravin a masa. Má výrazné vonné aroma, za které je zodpovědná hlavní složka hřebíčkové silice, fenolická sloučenina eugenol (Obr.20). Díky této sloučenině má hřebíček lokálně-anestetické a antiseptické účinky a také se používá často v zubním lékařství, kde jej lze využít jako účinnou příměs do kloktadel. Hřebíčková silice pak tlumí citlivost i bolestivost zubního nervu [78]



Obrázek 19: Sušený hřebíček



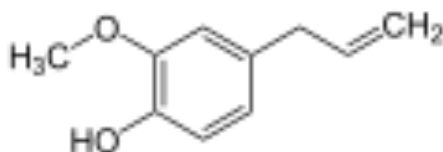
Obrázek 20: Květ hřebíčku

Může se také vyskytovat jako složka v protirevmatických mastech, nebo být použit k inhalaci a dezinfekci dýchacích cest či jako podpůrná léčba cukrovky 2. typu.

Jako součást učení ajurvédy bývá podáván v prášku na povzbuzení činnosti srdečního svalu [79].

Kromě eugenolu jsou hlavními chemickými složkami glykosidy, saponiny, flavonoidy, steroidy, třísloviny, alkaloidy a terpeny včetně významných jako isoeugenol, eugenol acetát, β -karyofylen a α -humulen. Chemické složky hřebíčku vykazují širokou škálu bioaktivit, jako jsou antioxidační, protinádorové, hypoglykemické, imunomodulační, analgetické, neuroprotektivní, protiobeztní a protivředové [80].

V hřebíčku se nachází řada živin, a to aminokyseliny, bílkoviny, mastné kyseliny a vitamíny. V kosmetice se využívá jako vonná silice do parfémů, díky svým antiseptickým vlastnostem se přidává do pleťových vod a extrakty mohou působit i jako vedlejší konzervant [81].



Obrázek 21: Struktura eugenolu

Podle jedné studie ethanolový extrakt hřebíčku vykázal pozitivní účinek na poškození jater způsobené léčbou paracetamolem prostřednictvím své vysoké antioxidační činnosti. Ve stejné studii byla také testována antimikrobiální účinnost extraktů in vitro na čtyřech bakteriálních druzích [82].

Extrakt hřebíčku prokázal účinnost proti multirezistentním druhům mikroorganismů s vysokým účinkem rodu Salmonella. Hřebíčkový esenciální olej získal široké uplatnění v parfémovém, kosmetickém a lékařském průmyslu [82].

Díky protizánětlivým prvkům hřebíčkového oleje je tento esenciální olej vysoce zklidňující a při místním použití pomáhá zklidnit podrážděnou pokožku, redukovat zarudnutí, pigmentaci a otoky. Při aplikaci na pokožku může podporovat prokrvení a zmírnit první známky stárnutí. Se svými silnými antimikrobiálními vlastnostmi je hřebíčkový olej často doporučován osobám s mastnou a smíšenou pleť [82].

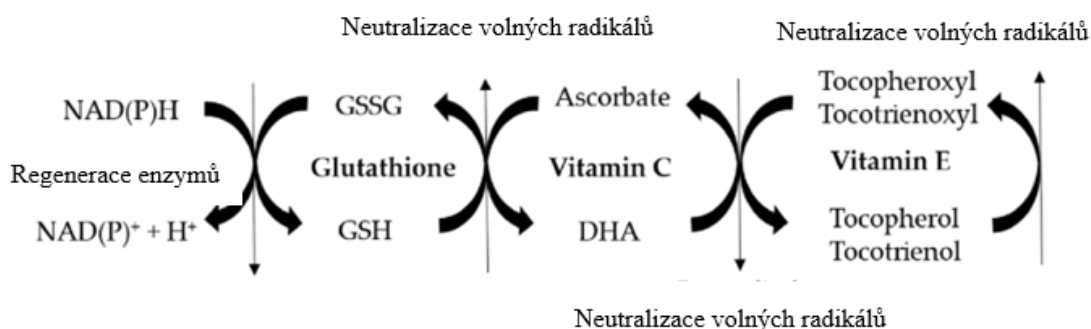
2.10 Aktivní látky v extraktech

2.10.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou chemické látky přirozeně se vyskytující v potravinách, zabraňují nebo snižují oxidační stres fyziologického systému. Naše tělo neustále produkuje volné radikály díky pravidelnému používání kyslíku, okolnímu znečištění a působení UV záření. Tyto volné radikály jsou zodpovědné za poškození buněk v těle a mohou způsobovat různé zdravotní problémy jako jsou srdeční choroby, cukrovka a rakovina [83].

Antioxidanty, které v podstatě neutralizují volné radikály pomáhají při prevenci a opravě poškození buněk způsobené těmito radikály. Rostliny a zvířata jsou bohatým zdrojem přirozeně produkujících antioxidantů. Alternativně mohou být antioxidanty také syntetizovány chemickými procesy a také mohou pocházet z různých druhů zemědělských odpadů. Na základě své rozpustnosti jsou antioxidanty rozděleny do dvou skupin, na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích [82].

Obecně mají antioxidanty rozpustné ve vodě funkce v buněčném cytosolu a krevní plazmě, to jsou například kyselina askorbová, glutation a kyselina močová. Kyselina askorbová je redoxní katalyzátor, který redukuje a neutralizuje reaktivní formy kyslíku (ROS), glutation má antioxidantní vlastnosti jako redukční činidlo a může být reverzibilně oxidován a redukován, zatímco α -tokoferol, karotenoid a ubiquinol jsou antioxidanty rozpustné v tucích a chrání buněčné membrány proti peroxidaci lipidů. Dále je můžeme rozdělit na základě jejich mechanismu účinku, a to na primární antioxidanty narušující řetězec a sekundární neboli preventivní antioxidanty. Antioxidanty mohou také působit jako prooxidanty, pokud nejsou přítomny na správném místě ve správné koncentraci při správný čas [82].



Obrázek 22: Schéma regenerace antioxidantů

Obecně antioxidanty fungují ve vzájemné shodě a vytvářejí určitou antioxidantní síť (Obr.22) jako v případě vitamínu C a E. Alfa-tokoferol je oxidován předáním elektronu reaktivním kyslíkovým formám, čímž dochází k jejich stabilizaci. To vede k tvorbě radikálu alfa-tokoferolu. Askorbát je pak oxidován a vytvoří dehydroaskorbát, což vede k regeneraci alfa-tokoferolu. Askorbát je poté regenerován selenoenzymem thioredoxin reduktázou. Tato síť tedy ukazuje, jak se antioxidantní látky navzájem regenerují, aby mohly působit dále jako antioxidanty [84].

2.10.1.1 Fenolické sloučeniny

Fenoly jsou organické těkavé sloučeniny, které obsahují OH skupinu vázanou na aromatickém jádru. Jsou to aromatické hydroxylované sloučeniny, které vykazují antioxidantní a biologickou aktivitu. Fenolické látky se vyskytují běžně v přirozené formě

jako produkty rostlin a živočichů nebo jako syntetické produkty. Velice bohaté na fenolické látky jsou například výtažky z rostlin a koření. Fenolické látky jsou sekundárními metabolity, řadí se mezi fytochemikálie, mají značný fyziologický a fytochemický význam v rostlinách a jsou velmi důležité v reprodukci a růstu rostlin a ochraně před predátory a patogeny [85].

Jsou také důležitou součástí lidské stravy, nejvíce se vyskytují v ovoci, zelenině a pro člověka jsou zdrojem potřebných antioxidantů. Například fenolické látky vyskytující se v koření jsou primárně zodpovědné za baktericidní a bakteriostatické účinky, jak již bylo zmíněno výše v kapitole 2.9.1. Obecně fenolické látky vykazují celou řadu fyziologických účinků včetně antialergických, antimikrobiálních, antioxidačních a antitrombotických [86].

Taktéž mají velké využití v potravinářském průmyslu, protože dokáží zpomalit oxidační degradaci lipidů a tím zajistit zlepšení nutriční hodnoty potravin. Významnými příklady fenolických látek jsou například eugenol nacházející se v hřebíčku, kapsaicin, který je součástí chilli papriček a zodpovědný za jejich pálivost, nebo třeba guajakol, který je součástí kávy a whisky [85].

Běžné potraviny, které jsou bohaté na polyfenoly zahrnují bobulovité ovoce, hrozny, granátová jablka nebo citrusy, ze zeleniny pak např. cibuli, petržel nebo špenát. Významným zdrojem je také zelený čaj [87].

Antioxidační a protizánětlivé vlastnosti polyfenolů by podle studií mohly mít preventivní a terapeutické účinky při léčbě kardiovaskulárních onemocnění či rakovině. Výsledky také ukazují, že antioxidační a protizánětlivé vlastnosti polyfenolů mohou potencionálně zabránit mnoha nemocem a pomáhat s jejich léčbou. Obecně se vychází z teorie tzv. biochemických scavengerů, která předpokládá, že tyto látky neutralizují volné radikály tím, že vytvářejí stabilní chemické komplexy a tím brání dalším reakcím radikálů v těle [85].

Pokud jde o využití a účinky v kosmetice, používají se opět pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, které pomohou chránit pokožku před poškozením způsobeným volnými radikály a UV zářením. Nejvýznamnějším polyfenolem hojně využívaným v kosmetice je resveratrol, který má až 60x vyšší antioxidační aktivitu než vitamín C [88].

Pro kosmetiku je nejčastěji izoluje z hroznového vína. Například francouzská značka Caudalie na této sloučenině postavila celou svoji historii [87].

2.10.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupina přírodních látek s charakteristickou fenolickou strukturou, jsou podskupinou fenolických látek. Nacházejí v ovoci, zelenině, obilí, kůře, kořenech, stoncích, květech, čaji nebo víně. Jsou to látky s nízkou molekulovou hmotností. Mnoho flavonoidů lze snadno rozpoznat jako květová barviva, ale jejich výskyt není omezen pouze na květy, nýbrž se nacházejí ve všech částech rostlin [89].

Flavonoidy mají řadu funkcí v rostlinách, zvířatech a bakteriích. Pokud jde o rostliny, jsou zodpovědné za barvu a vůni květů a plodů, fungují jako signální molekuly,

příčemž charakteristickým pachem přitahují hmyz k opylení a chrání před vnějšími stresy. Působí také částečně jako UV filtry a hrají roli v mrazuvzdornosti či odolnosti vůči suchu. Obecně přispívají k lepší aklimatizaci rostlin vůči vnějšímu prostředí [88].

Pokud jde o člověka a zdravotní hlediska, bylo prokázáno, že flavonoidy mají antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti, což z nich činí důležitou složku v nutričních, farmaceutických, medicínských a kosmetických aplikacích [90].

Právě v kosmetickém průmyslu hrají flavonoidy významnou roli vzhledem k antioxidačním vlastnostem. Díky nim chrání kůži před oxidativním stresem způsobeným volnými radikály ze znečištění či UV záření, které následně mohou vést k předčasnému stárnutí kůže či jejímu poškození. Mohou také přispívat ke snížení zarudnutí a kůži zklidňovat. Díky zesvětlujícím účinkům některých flavonoidů jsou často tyto aktivní látky vybírány do produktů proti hyperpigmentaci kůže, např.: kaempferol, quercetin a luteolin. Tyto konkrétní flavonoidy inhibují aktivitu enzymu tyrosinázy, který se částečně podílí na tvorbě melaninu. Inhibicí aktivity tyrosinázy mohou tyto flavonoidy pomoci snížit produkci melaninu, což vede ke světlejšímu tónu pleti [89].

2.10.2 Lipofilní aktivní látky

Lipofilní aktivní látky mohou být také látkami s antioxidační aktivitou, ale vykazují také jiné účinky jako ochranné nebo zklidňující.

2.10.2.1 Steroly

Steroly jsou organické sloučeniny jejichž molekula je odvozena od molekuly steranu nahrazením atomu vodíku v poloze 3 hydroxylovou skupinou. Jedná se tedy o alkohol steranu a jakékoli sloučeniny, které obsahují steranovou strukturu, další funkční skupiny nebo modifikované kruhové systémy odvozené od steranu se nazývají steroidy [91].

Steroly jsou tedy podskupinou steroidů. Přirozeně se vyskytují ve většině eukaryot, včetně rostlin, zvířat a hub, a mohou být produkovány i některými bakteriemi. Nejznámějším typem živočišného sterolu je cholesterol (Obr.7), který je životně důležitý pro strukturu buněčné membrány a funguje jako prekurzor vitaminů rozpustných v tucích a steroidních hormonů [90].

Rostlinné steroly obsažené především v olejích, ořechách a semenech jsou strukturou cholesterolu velmi podobné a jsou pro organismus velmi důležité [92].

Nazývají se fytosteroly a pomáhají snižovat hladinu cholesterolu v krvi tím, že omezí množství cholesterolu, který je schopen vstoupit do těla. Rostlinné steroly také podporují léčbu při srdečních chorobách, rakovině tlustého střeva, žaludku, obezitě, srdečním infarktu a mnoha dalších onemocněních [91].

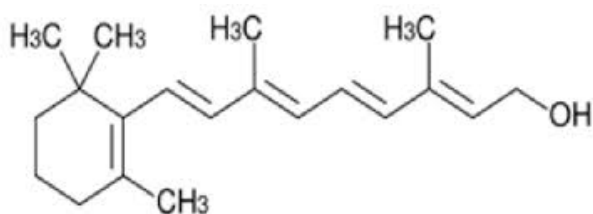
Fytosteroly se přirozeně vyskytují v rostlinách a stejně jako cholesterol jsou klíčovou strukturální složkou buněčných membrán.

Dalším významným steroidem je ergosterol, což je steroid nacházející se v buněčných membránách hub a prvoků, který plní mnoho stejných funkcí jako cholesterol v živočišných buňkách. Protože tyto organismy nemohou přežít bez ergosterolu, enzymy, které jej syntetizují, se staly zajímavými složkami pro studium léčiv. V lidské výživě je ergosterol provitaminovou formou vitamínu D2 a vystavením ultrafialovému záření se mění na vitamín D2 [93].

Campesterol, beta-sitosterol a stigmasterol jsou nejběžnější fytoosteroly rostlinného původu, které můžeme získat třeba z ořechů a semen, kde se přirozeně nacházejí. Pokud jde o jejich využití v kosmetice, steroly mají široké využití. Cholesterol je hojně využíván v přírodní kosmetice pro své emulgační vlastnosti. Fytoosteroly fungují výborně jako hydratační a zklidňující složky [94].

Tím, že jsou steroly velmi podobné kožním steroidům, významně přispívají k přirozené bariérové vrstvě pokožky. Steroly pomáhají pokožce udržet vlhkost a zanechávají na pokožce ochrannou, protizánětlivou, protisvěddivou a rekonstrukční bariéru [94].

Nejvýznamnějšími terpeny v kosmetickém průmyslu jsou již nějakou řadu let retinoidy v různých formách, například ve formě vitamínu A, retinolu.



Obrázek 23 Struktura retinolu

Vitamin A je první vitamin schválený organizací FDA jako aktivní látka proti vráskám, která dokáže měnit vzhled povrchu pokožky a má účinky proti stárnutí [95].

Vitamin A patří do skupiny látek rozpustných v tucích a patří do kategorie retinoidů. Kromě retinolu do této skupiny patří strukturálně příbuzné látky s biologickými vlastnostmi retinolu. Protože je biologická aktivita jednotlivých forem rozdílná, pro účely standardizace se udává v ekvivalentech retinolu. Vitamin A (Obr.23) a jeho deriváty patří mezi nejúčinnější látky zpomalující proces stárnutí. Retinoidy také regulují buněčnou apoptózu, diferenciaci a proliferaci. Protivráskové vlastnosti retinoidů jsou založeny na podpoře proliferace keratinocytů. Retinoidy také posilují ochrannou funkci epidermis, omezují transepidermální ztrátu vody a chrání kolagen před degradací [95].

Dalším významným retinoidem používaným v kosmetickém průmyslu je provitamin D3, známý také jako 7-dehydrocholesterol, který se při vystavení slunečnímu záření přeměňuje na vitamín D3. Posiluje funkci kožní bariéry, zvyšuje odolnost pokožky vůči agresorům z prostředí a podporuje přirozenou obnovu pokožky [96].

2.11 Analytické metody

2.11.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda, která se využívá pro měření vlastností vzorku. Využívá pohlcování světla různých vlnových délek. Při spektrofotometrii je roztok v kyvetě ozařován monochromatickým světlem a tohle světelné záření absorbují molekuly. Využívají se standartní kyvety s optickou dráhou 1 cm. Detektor měří zářivý tok, který roztok neabsorbuje. Zářivý tok zdrojem vysílaného záření je poté porovnán se zářivým tokem dopadajícím na detektor, přičemž část energie světelného záření je rozpuštěnou látkou a roztokem absorbována. Množství záření absorbovaného tímto způsobem je pak úměrné koncentraci látky v roztoku, optické dráze a molárnímu absorpčnímu koeficientu [97].

Pomocí spektrofotometrie tak můžeme stanovit celou řadu aktivních látek v extraktech a zjistit tak, které extrakty se hodí do finálního produktu.

2.11.2 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metoda sloužící k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku, nebo k izolaci a určení jednotlivých složek směsi. Rozdíl oproti běžné sloupcové chromatografii je v tom, že součástí HPLC aparatury je výkonné vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou menších rozměrů, ve které je stacionární fáze vázaná na částice o velmi malé velikosti, pouze několik mikrometrů. Díky tomuto uspořádání dosahuje HPLC vyšší účinnosti než jiné techniky separace látek a v kratším čase [98].

2.11.3 Dynamický rozptyl světla

Metoda DLS (dynamický rozptyl světla) patří mezi metody rozptylu světla. Je to metoda vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti. DLS je založena na Brownově pohybu částic. Částice těchto rozměrů se neustále pohybují Brownovým pohybem, který je způsoben narážením částic do molekul rozpouštědla. Větší částice se pak pohybují pomaleji a menší částice rychleji. Pokud dojde k ozáření částic zdrojem světla, v tomto případě laserem, částice bude světlo rozptylovat do všech směrů. Metoda DLS měří kolísání neboli fluktuaci rozptýleného světla kolem jeho průměrné hodnoty, které je následně detekováno pomocí vhodného detektorového uspořádání. Obraz, který vznikne rozptýleným světlem, je tvořen světlými a tmavými částmi. Světlé části obrazce na stínítku jsou tvořeny v důsledku dopadajícím světlem, v případě tmavých skvrn žádné světlo nenapadá [99].

Vztah mezi rychlostí pohybující se částice a její velikostí udává Stokesova – Einsteinova rovnice, ze které lze pomocí difúzního koeficientu vypočítat hydrodynamický průměr částice. Metodou DLS lze změřit také zeta potenciál, což je údaj, kterým můžeme charakterizovat stabilitu částic. Zeta potenciál je potenciál, který leží

za hranicí skluzu difúzní vrstvy elektrické dvojvrstvy částice. Za touto hranicí se již ionty v difúzní vrstvě elektrické dvojvrstvy nepohybují s částicí. Pokud je zeta potenciál v rozmezí hodnot -30mV a $+30\text{mV}$, znamená to, že částice jsou nestabilní. Za stabilní jsou částice považovány tehdy, pokud absolutní hodnota Zeta potenciálu je větší než 30 [100].

2.12 Antimikrobiální aktivita

Látky s antimikrobiálními účinky mají schopnost inhibovat neboli potlačit růst mikroorganismů. Jsou to látky, které mají bakteriostatický, baktericidní a fungicidní účinek. Účinek antibiotika na bakterie lze v laboratoři určit několika metodami. Jednou z metod je zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC). Jde o nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která ještě inhibuje růst mikroorganismu, tzn. mikroorganismy nenarostou na hodnotu 100 %. MIC je důležitá hlavně z hlediska pozorování rezistence mikroorganismů na antimikrobiální látky. Umožňuje také sledování aktivity nových látek. MIC lze zjistit z agaru nebo bujónu tím způsobem, že se daný kmen bakterie zaočkuje do jamek mikrotitrační destičky s agarem (bujónem) a snižuje se přidaná koncentrace antibiotika, popřípadě testované antimikrobiální látky. Inkubuje se, dokud nenaroste kontrola, což bývá zpravidla přes noc. Dalším krokem je pozorování zákalu nebo sedimentace agregátů. Následně se z poslední jamky, kde je růst mikroorganismu ještě potlačen odečítá minimální inhibiční koncentrace.

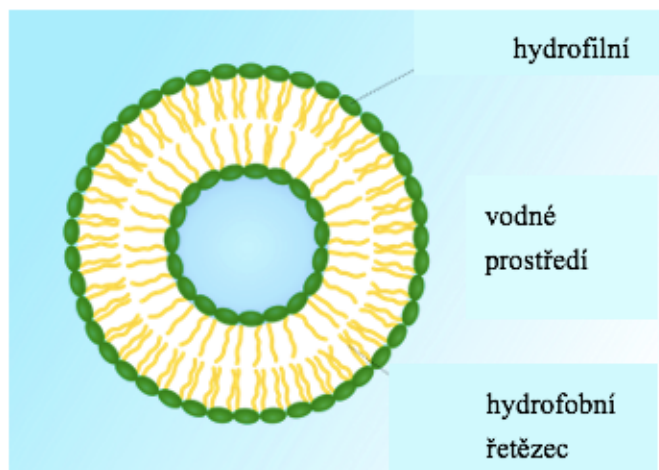
2.13 Enkapsulace

Enkapsulace je proces, při kterém dochází k zapouzdření jedné látky do druhé látky. Látkou, která je zapouzdřena bývá obvykle aktivní látka, kterou obklopuje materiál stěny. Enkapsulace se často využívá ve farmacii k přenosu aktivních látek do těla. Zapouzdřená látka má několik výhod. Aktivní látka je obalem chráněná před chemickou degradací a uchovává si tak plně svoji funkci. Obal chrání také před nepříznivými vnějšími vlivy a umožňuje například kontrolované uvolňování látky, čehož je využíváno u léčiv nebo právě u kosmetiky [101].

K enkapsulaci lze použít několik technik, například extruze, sprejové sušení nebo sprejové chlazení nebo zapouzdření částic pomocí liposomů [102].

2.13.1 Liposomy

Liposomy jsou částice se stěnou složenou nejčastěji z fosfolipidů. Liposomy lze označit za vezikuly, jejichž obal je tvořen dvojitou membránou. Většinou část této dvojvrstvy tvoří lecitin a příměsi jiných fosfolipidů nebo cholesterolu. Fosfolipidy obsahují hydrofilní a hydrofobní část, takže jsou amfifilní. Ve vodném prostředí se pak hydrofilní konce nasměrují ven a hydrofobní konce směrem dovnitř (Obr.24). Tím se vytvoří dvojvrstva. Uvnitř dvojvrstvy mohou být přenášeny látky rozpustné v tucích [103].



Obrázek 24 Struktura liposomu

Ve středu liposomů jsou pak přenášeny látky hydrofilní. Kožní membrána má podobné složení jako membrána liposomů a to umožňuje liposomům se snadněji začlenit do pokožky. Při použití liposomů v kosmetice je tak možný transfer aktivní látky do hlubších vrstev pokožky [104].

Liposomy se připravují hydratací fosfolipidového filmu, který vznikl na stěnách baňky po odpaření vzorku organickým rozpouštědlem. Když poté dojde k hydrataci vodou, vznikají liposomy. Pokud je vzorek ve vodné disperzi, tak se odpařovat nemusí a lze rovnou vytvořit liposomy pomocí ultrazvuku [105].

3 CÍL PRÁCE

V diplomové práci budou řešeny následující cíle:

1. Teoretická rešerše zaměřená na přírodní kosmetické přípravky a jejich hlavní složky, jejich účinky a využití
2. Příprava přírodních extraktů a jejich charakterizace
3. Enkapsulace extraktů do nanočástic, charakterizace částic a příprava kosmetických základů s využitím těchto extraktů
4. Testování biologických účinků připravených emulzí (antimikrobiálního, antioxidačního) a stability emulzí

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité chemikálie pro analýzy

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzeno-thiazoline-6-sulfonic acid)), Sigma-Aldrich (USA)
Acetonitril (P-LAB)
BHI médium, Himedia (IND)
Dusičnan sodný
Ethanol, Lach: Ner (CZE) Ethanol pro UV/VIS, Penta (CZE)
Folin-Ciaultovo činidlo, VWR Chemicals (FRA)
Glyrol (Sigma – Aldrich) –
Hydroxid sodný, Lach: Ner (CZE)
Chlorid hlinitý
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu, Serva (Německo)
Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU)
LB médium, Sigma-Aldrich (USA)
Lecithin - sojový, Serva (Německo)
Pentylene glykol (P-LAB, CZ)
Peroxidisíran draselný, Sigma-Aldrich (DEU)
Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich (USA)
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8,-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid), Sigma-Aldrich (CHE)
Uhličitan sodný bezvodý, Penta (CZE)

4.2 Použité kosmetické suroviny na přípravu krému

Fenoxyethanol (Sigma)
Glyceryl steárat citrát (Kosuro)
Karnaubský vosk (Eko-Koza, CZ)
Lecithin - sojový, Serva (Německo)
Pentylene glykol (P-LAB, CZ)
Propan-1,3-diol (P-LAB, CZ)
Skvalen (Biooo, CZ)
Tokoferol (P-LAB, CZ)
Xantanová guma (P-LAB, CZ)

4.3 Použité přístroje a laboratorní pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DEU)
Spektrofotometr, Helios δ , Unicam (UK)
Temperovaná třepačka Unimax 1010, Heidolph (DEU) Vortex, Vitrum (DEU)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DEU)
ELISA reader BioTek ELx808, Biotek (DEU)
HPLC sestava UltiMate 3000 s UV/VIS detektorem – Thermo Fisher Scientific (USA)

Bandelin Sonodrex technik soni
Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)

4.4 Použité vzorky

Bio *Reishi Pulvere* (MycoMedica)
Hřebíček mletý (Sonnentor)
Chaga 100 % bio prášek z plodnice (MycoMedica)
Rhodotorula toruloides (CCY 6224)

4.5 Použité mikroorganismy

Escherichia coli CCM 7395
Staphylococcus epidermidis CMM 4418
Rhodotorula toruloides CCY 6224

Všechny použité mikroorganismy byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.6 Příprava vodných extraktů

Z prášku jednotlivých testovaných surovin byly připraveny vodné extrakty tak, že 1 g prášku daného vzorku byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody, promíchán na vortexu a následně extrahován 24 hodin na automatické třepačce. Po extrakci byl obsah stočen v centrifuze při 5000 ot./min po dobu 5 minut a dále byl využíván pouze supernatant.

4.7 Příprava ethanolových extraktů

Z prášku jednotlivých testovaných surovin byly připraveny alkoholové extrakty tak, že 1 g prášku daného vzorku byl rozpuštěn v 10 ml 96% ethanolu, následně taktéž promíchán na vortexu a extrahován 24 hodin na automatické třepačce. Po extrakci byl obsah stočen v centrifuze při 5000 ot./min po dobu 5 minut a dále byl využíván pouze supernatant.

4.8 Spektrofotometrické analýzy

Extrakty vzorků byly podrobeny několika spektrofotometrickým analýzám na účelem charakterizace složení extraktu a obsahu aktivních látek. Vzorky byly analyzovány z hlediska celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační účinnosti.

4.8.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Stanovení fenolických látek proběhlo pomocí spektrofotometrie podle následujícího postupu. Do jednotlivých zkumavek bylo napipetováno 50 µl vzorku, ke kterému byl

vždy přidán 1 ml destilované vody a 1 ml směsi Folin-Ciocalteuova činidla naředěného destilovanou vodou v poměru 1:9. Směs byla promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Následně po uplynutí doby inkubace byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Všechny zkumavky byly promíchány pomocí přístroje vortex a nechány 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla změřena výsledná absorbance neznámých vzorků při vlnové délce 750 nm oproti blanku, který byl připraven stejným postupem jako analyzované vzorky s tím rozdílem, že bylo místo vzorku použito 50 μ l destilované vody. Všechny neznámé vzorky byly analyzovány ve třech sériích a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. K vytvoření kalibrační přímky byla sestavena kalibrační řada roztoků v rozmezí koncentrací 0,05–0,7 mg/ml ze standardního roztoku kyseliny gallové o koncentraci 1 mg/ml. Výsledná koncentrace celkových fenolických látek byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky $A_{750} = 1,5448 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9745$.

4.8.2 Stanovení antioxidační aktivity

4.8.2.1 Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity)

Metoda TEAC testuje schopnost vzorku či látek zhaset radikál $ABTS^{\cdot+}$ neboli (2,2'-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátu)). Metoda je označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), právě proto, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Metoda je založena tedy na zhasení radikálu ABTS antioxidanty, které se působí jako donory vodíku. Měří se pomocí spektrofotometrie a pozorují se změny absorpčního spektra ABTS radikálu při 734 nm. V reakční směsi se kation-radikál ABTS vytváří oxidací ABTS. Používá se systém ABTS/H₂O₂/peroxidasa. Při experimentálním měření se užívají dva postupy.

V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál $ABTS^{\cdot+}$, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu $ABTS^{\cdot+}$. Častěji se užívá uspořádání, při němž se antioxidant přidává k radikálu $ABTS^{\cdot+}$ již vyprodukovanému pomocí peroxidázy. Antiradikálová aktivita vzorků se hodnotí parametrem TEAC. Označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství Troloxu. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol/l. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu (mmol/l), která je rovna antioxidační aktivitě vzorku. Koncentrace vzorku dávající stejnou procentuální změnu absorbance roztoku jako 1 mM Trolox je považována za TEAC.

4.8.2.2 Vlastní postup stanovení

Jako první krok byl připraven roztok ABTS rozpuštěním látky ABTS v destilované vodě na konečnou koncentraci 7 mM. Pro získání radikálového kationtu z ABTS byl přidán 2,45 mM roztok peroxodisíranu draselného a vzniklý roztok byl ponechán 24 hodin ve tmě. Následující den byl před měřením roztok ABTS•+ upraven ethanolem pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$. Absorbance byla měřena proti ethanolu pro UV/VIS při vlnové délce 734 nm. Pro vytvoření kalibrační závislosti byl použit standardní roztok Troloxu o koncentraci 1 mg/ml, který byl připraven rozpuštěním Troloxu v 60% ethanolu. Kalibrační řada byla sestavena v rozmezí koncentrací 50–400 µg/ml a byla proměřena stejným způsobem jako neznámé vzorky.

U měření vzorků bylo do zkumavek napipetováno 10 µl analyzovaných vzorků, a k nim byl přidán 1 ml roztoku ABTS•+. Zkumavky byly ponechány 10 minut ve tmě a následně byl zaznamenán úbytek absorbance v čase 10 minut jako A_{10} . Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních. Výsledná absorbance jednotlivých vzorků byla zjištěna z rozdílu hodnot počáteční absorbance A_0 a absorbance naměřené po 10 minutách ve tmě A_{10} . Z naměřených hodnot absorbancí byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. V počátečním čase, tedy A_0 , byl měřen blank, který představoval 10 µl destilované vody a 1 ml roztoku ABTS•+ pro vodné extrakty, pro ethanolové extrakty byl jako blank použit ethanol. Z rovnice kalibrační křivky $A = 0,0011 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9917$ byla následně vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků.

4.8.3 Stanovení celkového množství flavonoidů

Flavonoidy by měly být přítomné ve všech testovaných vzorcích hub a rostlinných extraktů Stanovení celkového množství flavonoidů v extraktech bylo provedeno pomocí spektrofotometrie, a to reakcí s hlinitou solí a dusitanem.

4.8.3.1 Vlastní postup stanovení

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml extraktu o koncentraci 0,1g/ml, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok byl důkladně promíchán na vortex mixeru a ponechán 5 minut odstát. Poté bylo do zkumavek napipetováno 0,2 ml 10 % roztoku chloridu hlinitého. Roztok byl opět promíchán a ponechán 5 minut odstát.

Nakonec bylo přidáno 1,5 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Roztok byl ponechán 15 minut odstát a následně byla změřena absorbance proti blanku při 510 nm. Blank byl vytvořen stejným způsobem, namísto vzorku byla přidána destilovaná voda či ethanol v závislosti na měřeném vzorku. Kalibrační křivka pro měření byla sestavena proměřením řady katechinu v rozmezí koncentrací 0,2 – 0,04 mg/ml. Z kalibrační křivky byla následně vypočítána koncentrace flavonoidů v jednotlivých vzorcích.

4.9 Stanovení obsahu lipofilních látek pomocí HPLC

Obsah lipofilních látek byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

4.9.1 Postup a parametry stanovení HPLC

Pro analýzu vodných a ethanolových extraktů byla použita metoda HPLC-DAD. Extrakty byly po 24 hodinách stočeny na centrifuze a následně přefiltrovány pomocí sterilních PTFE mikrofiltrů do vialek. Do každé vialky byl odpipetován 1 ml vzorku a následně byly umístěny do chromatografu a změřeny. Parametry, při kterých měření probíhalo jsou zaznamenány v (Tabulka 1).

Tabulka 1 Parametry pro metodu HPLC-DAD

Parametry měření HPLC-DAD		
Kolona	Kinetex EvoC18 150 mm x 4,6 mm x 5 μm	
Detektor	DAD Vanquish series	
Složení mobilní fáze	MFA:ACN:TrisHCl:MeOH	MFA:ACN:TrisHCl:MeOH
	84:14:02	60:40:00
Čas (min)	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

4.9.2 Stanovení obsahu eugenolu v extraktech hřebíčku pomocí HPLC

Pro analýzu eugenolu v extraktech hřebíčku byla použita metoda HPLC. Extrakty byly stočeny v centrifuze, přefiltrovány přes PTFE filtr do vialek a následně naředěny 10x, 50x a 100x pomocí acetonitrilu (Tabulka 2).

Tabulka 2 Parametry pro metodu HPLC na stanovení eugenolu

Parametry měření HPLC		
Kolona	Kinetex C18 2,6 μm, 100 Å, 150 mm x 4,6 mm	
Detektor	UV-VIS 280 nm	
Složení mobilní fáze	MFA:0,01%MiliQMFB:ACN	MFA:0,01%MiliQMFB:ACN
Čas (min)	MF A [%]	MF B [%]
0	75	25
1	75	25
5	60	40
10	45	55
12	30	70
průtok MF	0,4 ml/min	

4.10 Antimikrobiální testy

V této diplomové práci byla použita bujónová diluční metoda za použití 96-jamkových mikrotitračních destiček. Každá destička obsahovala dva vzorky od jednoho testovaného extraktu, ve vodě a v ethanolu.

4.10.1 Kultivace mikroorganismů a antimikrobiální test

Na antimikrobiální test byl vybrán jeden zástupce grampozitivních a jeden zástupce gramnegativních bakterií. Jako grampozitivní byla vybrána *Staphylococcus epidermidis* a v případě gramnegativní *Escherichia coli*. Pro každou bakteriální kulturu bylo připraveno médium, které bylo následně vysterilováno a zchlazeno (Tabulka 3). Kultura bakterií byla z kryozkumavek zaočkována do 50 ml média a ponechána narůst při 37 °C po dobu 24 hodin.

Tabulka 3 Použité mikroorganismy

mikroorganismus	médium použité pro kultivaci
<i>Escherichia coli</i>	LB (Lysogeny broth)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI (Brain heart infusion)

Následující den byla vytvořena v každé destičce koncentrační řada ředění vzorků s médiem v rozmezí 4-2048krát. Poté bylo do každé jamky přidáno stejné množství mikrobiální kultury, která byla před měřením vhodně naředěná na hodnotu 0,5 McFarlandovy stupnice, což odpovídá přibližně 1×10^8 KTJ/ml (kolonie tvořících jednotek v 1 ml) a následně 2000krát zředěna. Do jamek po celém obvodu mikrotitrační destičky byla napipetována destilovaná voda, aby bylo zabráněno vysychání kultury v destičce. Ihned po dokončení přípravy destičky byla změřena absorbance pomocí přístroje ELISA

reader při vlnové délce 630 nm. Destička byla následně ponechána 24 hodin temperovat při 37 °C a potom byla absorbance změřena podruhé při stejné vlnové délce.

Vyhodnocení diluční bujónové metody probíhalo podle následujícího postupu. Destička byla změřena v čase 0 a v čase po 24 hodinách působení potenciálně antimikrobiálních činidel. Hodnota absorbance v čase 0 byla odečtena od hodnoty absorbance v čase po 24 hodinách. Zároveň byla změřena absorbance samotných mikroorganismů v růstovém médiu. Tato hodnota je považována za hodnotu 100 %. Pokud je nárůst kultury vyhodnocení vyšší než 100 %, znamená to, že látky obsažené v testovaných vzorcích nějakým způsobem růst mikroorganismů podporují. Za minimální inhibiční koncentraci MIC je pak považována nejnižší koncentrace vzorku (nejvyšší zředění), při které vzorek nárůst ještě inhibuje, tedy nárůst nepřesáhl 100 %. Kvůli srovnání antimikrobiální aktivity extraktů, bylo v případě ethanolového extraktu testováno také rozpouštědlo, tedy ethanol. Vzhledem k tomu, že destilovaná voda nevykazuje žádnou antimikrobiální aktivitu, sloužila v případě vodného extraktu jako kontrola 100 % hranice znázorňující buňky v čistém médiu.

4.10.2 Resazurinový test viability kultury

Viabilita buněk neboli jejich životaschopnost je schopnost buňky přežít po určitou dobu a zároveň vykazovat enzymovou aktivitu. Životaschopnost buňky ovlivňují faktory jako kultivační médium, kontaminace či teplota. Na detekci viability slouží různá barviva, například resazurin. Resazurin se prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz buněk mikroorganismů přemění redukcí tmavě modrého resazurinu na resorufin, který má světle růžovou barvu. Množství resorufinu je přímo úměrné počtu živých buněk. Viabilita kultury po 24 hodinách byla stanovena pomocí resazurinového testu, kdy bylo do každé jamky přidáno 20 mikrolitrů barviva zředěného pomocí PBS pufru v poměru 1:11 s destilovanou vodou. Destička byla 30 minut temperována při 37°C a následně byla pomocí ELISA readeru změřena absorbance při 630 nm. Jako hodnota 100 % byla při vyhodnocení metody určena metabolická aktivita buněk mikroorganismů v čistém médiu. Od této hodnoty byly následně odečítány výsledky. V případě, že měla buňka metabolickou aktivitu pod hranicí 100 %, došlo k tomu, že vzorek metabolickou aktivitu buněk narušil.

4.11 Enkapsulace aktivních látek do nanočástic

Vodné a ethanolové extrakty přírodních látek byly enkapsulovány do nanočástic pomocí ultrazvuku. U vodných extraktů nebylo nutné vzorek odpařovat. 10 ml vzorku bylo smícháno s 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu a 10 ml vody. K přípravě liposomů byl použit ultrazvukový přístroj „Bandelin Sonodrex Technik Soni“ při programu č.5, intenzitě 50 % po dobu 1 minuty v cyklech po 15 sekundách. Cykly byly několikrát opakovány.

U ethanolových extraktů byl ze vzorku nejprve odpařen ethanol za použití dusíku. Suchý extrakt byl zachycen na stěnách zkumavek. Do odpařených vzorků byl přidán

chloroform a celá směs byla smíchána s 10 mg cholesterolu, 90 mg lecitinu a 10 ml destilované vody. Směs byla použita k přípravě liposomů pomocí ultrazvukového přístroje (Bandelin) při programu č.5, intenzitě 50 % a s cykly po 15 sekundách. Cykly byly několikrát opakovány. Následně byl ze vzorku odpařen chloroform, vzorek byl zajištěn parafilmem a dán do chladu.

4.11.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Z připravené směsi liposomů bylo odebráno 0,5 ml do Eppendorf zkumavky. Roztok byl následně zcentrifugován při 11000 ot./min po dobu 1 hodiny. Supernatant byl odlit a byl použit pro stanovení fenolických látek. Enkapsulační účinnost byla vypočítána jako rozdíl obsahu polyfenolů před a po enkapsulaci.

4.12 Charakterizace liposomů pomocí metody DLS

Stanovení velikosti liposomů s aktivními látkami, které byly použity do krémů a jejich zeta potenciálu bylo provedeno pomocí metody dynamického rozptylu světla. Připravené liposomy z ethanolového extraktů houby Chaga, hřebíčku a vodného extraktu kvasinky *Rhodotorula toruloides* byly zcentrifugovány po dobu 1 hodiny na 11000 ot./min. Supernatant byl následně odlit a precipitát byl rozsuspendován v 1ml destilované vody. Následně byl destilovanou vodou 100krát zředěn. Takhle připravené vzorky byly ve skleněných kyvetách podrobeny měření v přístroji ZetaSizer Nano ve 3 cyklech a dvanácti opakováních v každém cyklu. Byly proměřeny jak vzorky nezředěné, tak vzorky stokrát zředěné. Pomocí přístroje byla přepočtem korelační analýzy vyhodnocena distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciál.

4.13 Kompozice a příprava krému

Jednotlivé složky krému a jejich procentuální obsah byl navržen tak, aby krém obsahoval pouze přírodních ingredience a ingredience tzv. přírodního původu. Terminologie byla více popsána v kapitole 2.4. Další kritérium výběru ingrediencí je příjemná textura krému, která umožňuje jeho snadnou aplikaci.

Jednotlivé složky krému jsou rozděleny do vodní a olejové fáze a jejich funkce byly podrobněji popsány v kapitole 2.7.

Tabulka 4 Návrh složení krému

	ingredience	procentuální zastoupení	funkce
vodná fáze	destilovaná voda	71,90 %	rozpuštědlo
	glycerin	2 %	humektant
	pentylen glycol	3 %	humektant
	propan-1,3-diol	3 %	humektant
	xantanová guma	0,05 %	zahuš'ovadlo, stabilizátor
olejová fáze	lecitin	1,5 %	emulgátor
	skvalan	10 %	emolient
	glyceryl stearát citrát	3,5 %	emolient, emulgátor
	vitamín E	0,05 %	antioxidant
	karnaubský vosk	5 %	stabilizátor, zahuš'ovadlo
ostatní	fenoxyethanol	0,5 %	syntetický konzervant
	olej z čajovníku	0,5 %	přírodní konzervant

Výše uvedená kompozice tvoří 100 %. U konzervantů byl vždy použit pouze jeden z uvedených. Extrakty byly přidány v množství 1 % z celkového objemu základu.

Tabulka 5 Kompozice aktivních látek (extraktů) v krému

	typ extraktu	množství
aktivní látky	extrakt z hřebíčku (ethanolový)	1 %
	extrakt z houby Chaga (ethanolový)	1 %
	extrakt z kvasinky <i>Rhodotorula toruloides</i>	1 %

4.13.1 Postup přípravy krému

Složky olejové fáze byly naváženy do skleněné kádinky a rozeřráty ve vodní lázni na 80°C. Při teplotě 60 °C byl přidán tokoferol acetát. Glykoly vodné fáze byly naváženy do nerezové nádoby a následně byla přidána horká destilovaná voda. Do směsi glykolů s vodou byla přidána xantanová guma a směs byla promíchána tyčovým mixérem po dobu 5 minut a ponechána chvíli odstát. Následně byla do vodné fáze míchané vysokou rychlostí přilévána rozeřráta tuková fáze a fáze byly emulgovány po dobu 20 minut. Pomocí studené vody a ledu byla emulze za stálého míchání zchlazena na pokojovou teplotu. Do vychladnuté emulze byl, popřípadě nebyl přimíchán konzervant.

Byly připraveny 3 vzorky krému lišící se systémem konzervace. Jako syntetický konzervant byl použit fenoxiethanol a jako přírodní konzervant byl použit olej z čajovníku. Jeden vzorek byl ponechán bez přidaného konzervantu. Do připravených krémů byly dohromady přidány extrakty vzorků, které vykázaly v rámci testů na obsah kosmeticky prospěšných látek nejlepší výsledky. Podle výsledků uvedených (Obr.24, Obr.25, Obr.26) jsou to ethanolový extrakt hřebíčku, ethanolový extrakt houby Chaga a vodný extrakt kvasinky *Rhodotorula toruloides* připravovaný pomocí vortexu. Byla vytvořena řada 6 krémů. 3 krémy obsahují enkapsulované extrakty, 3 krémy obsahují extrakty bez enkapsulace. Trojice krémů je vždy tvořena krémem se syntetickým konzervantem, přírodním konzervantem a bez konzervantu. Množství každého přidaného extraktu bylo 1 % objemu krému. Připravené vzorky krému byly podrobeny testu antioxidační aktivity a testům antimikrobiální účinnosti.

4.14 Antimikrobiální test připravených krémů

Antimikrobiální test byl proveden podle stejného postupu jako je uvedeno v kapitole 4.10.1. Následně byl proveden také test viability kultur podle postupu v kapitole 4.10.2. V případě antimikrobiálních testů již hotových krémů byly jako kontroly antimikrobiální aktivity použity jednotlivé konzervanty v daných vzorcích. V případě krému s obsahem oleje z čajovníku jako konzervantu, byl jako kontrola použit právě olej z čajovníku. V případě krému s fenoxiethanolem byl použit ethanol a u krému bez konzervantu byla jako kontrola antimikrobiální aktivity použita destilovaná voda.

4.15 Stanovení antioxidační aktivity připravených krémů

Antioxidační aktivita připravených krémů byla stanovena podle stejného postupu jako je uvedeno v kapitole 4.8.2. Rozdílem oproti měření antioxidační aktivity jednotlivých extraktů bylo dvojnásobné zředění vzorků krému z důvodu jejich vyšší viskozity.

4.16 Cyklický stabilitní test

Po zhotovení všech vzorků krémů byla testována stabilita pomocí cyklického testu. Cyklický test byl proveden se všemi vzorky v duplikátu. Každý přípravek byl v množství 1 g nanesen do Eppendorf zkumavky o objemu 1,5 ml a po nanesení byl krátce

zcentrifugován, aby se veškerý vzorek nacházel ve spodní části zkumavky a nezůstaly tak jeho zbytky na stěnách. Tento krok byl důležitý vzhledem ke sledování změn vzhledu. Vzorky byly stejným způsobem naváženy na vážicí misky. Tím vznikla možnost porovnat stabilitu vzorků v těsnícím a otevřeném obalu. Samotné cyklické testy byly provedeny ve 3 cyklech, tzn. 6 fázích. V první fázi byly vzorky umístěny do termostatu při teplotě 40 °C, kde byly ponechány 24 hodin. Následně se umístily do prostředí s 5 °C, opět na 24 hodin. Po nanesení vzorku do zkumavky a misky byl zaznamenán vzhled a hmotnost. Tyto parametry byly následně vyhodnocovány na konci každé fáze, tzn. po každých 24 hodinách.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

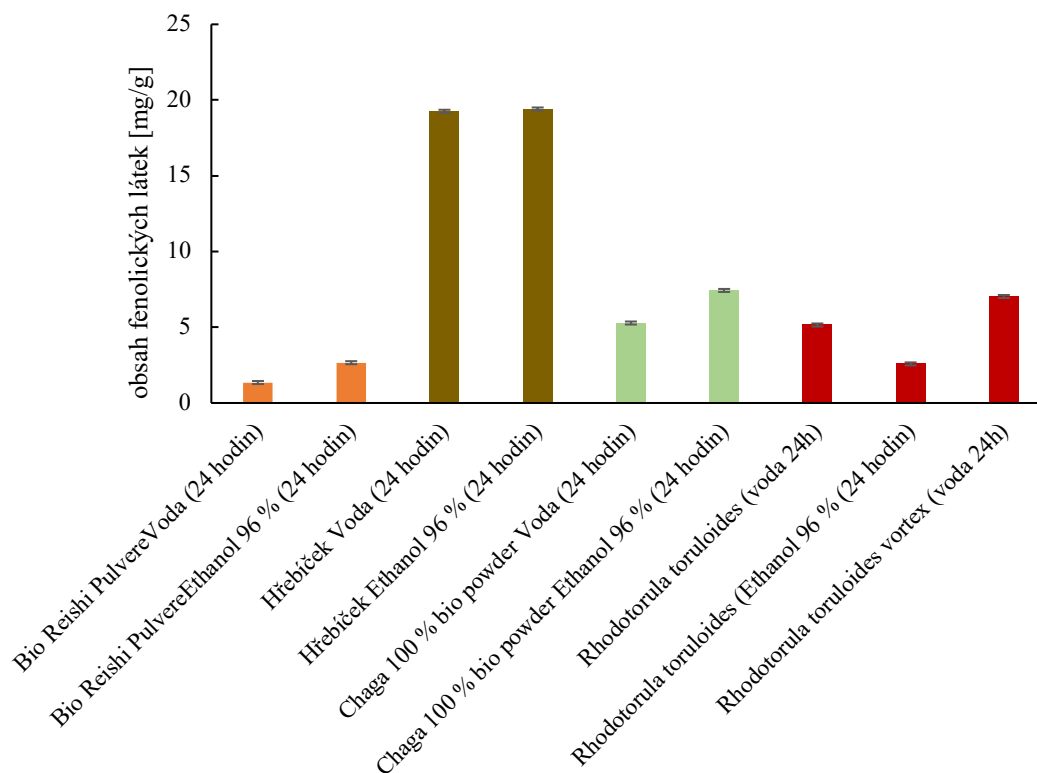
5.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek v extraktech

Výsledky stanovení fenolických látek byly stanoveny v obou typech extraktů a lze vidět, že typ rozpouštědla byl u některých rozhodujícím faktorem. Výsledky měření ukázaly značné množství fenolických látek ve vzorkách hřebíčku, přičemž lepší výsledek vykázal ethanolový extrakt (Tabulka 6).

Tabulka 6 Výsledky analýzy fenolických látek v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Typ extraktu	Celkový obsah fenolických látek [mg/g]
Bio <i>Reishi Pulvere</i>	Voda (24 hodin)	1,35 ± 0,009
Bio <i>Reishi Pulvere</i>	Ethanol 96 % (24 hodin)	2,66 ± 0,160
Hřebíček	Voda (24 hodin)	19,26 ± 0,002
Hřebíček	Ethanol 96 % (24 hodin)	19,41 ± 0,002
Chaga 100 % bio powder	Voda (24 hodin)	5,28 ± 0,030
Chaga 100 % bio powder	Ethanol 96 % (24 hodin)	7,43 ± 0,010
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda (24 hodin)	5,15 ± 0,010
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Ethanol 96 % (24 hodin)	2,58 ± 0,010
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda (24 hodin) vortex	7,03 ± 0,010

Tento trend se opakoval u několika dalších vzorků. Ve vzorcích testovaných hub byla koncentrace fenolických látek také vyšší v případě použití ethanolu jako extrakčního rozpouštědla. Lze tedy říct, že rozpouštědlo má v případě rostlinných extraktů při stanovení fenolických látek důležitou roli. V případě vody, jakožto rozpouštědla více polárního než ethanol byly koncentrace nižší. Důvodem může být i to, že extrakty obsahují více látek rozpustných v organických rozpouštědlech než ve vodě. Výjimkou je testovaná červená kvasinka *Rhodotorula toruloides*, u které bylo naopak naměřeno nejvíce fenolických látek v případě vodných extraktů. Tento fakt by mohl být dán tím, že kvasinka je živý organismus a ethanolové prostředí na ni může působit nepříznivě. Mezi vodnými extrakty bylo vyššího výsledku dosaženo v případě vodného extraktu vytvořeného pomocí kuliček na vortexu (7,03 mg/g). Kvasinka je pomocí mechanické síly vortexu lépe extrahována, než v případě běžného vodného extraktu (5,15mg/g) (Obr.25)



Obrázek 25 Graf zastoupení fenolických látek v mg/g v jednotlivých vzorcích

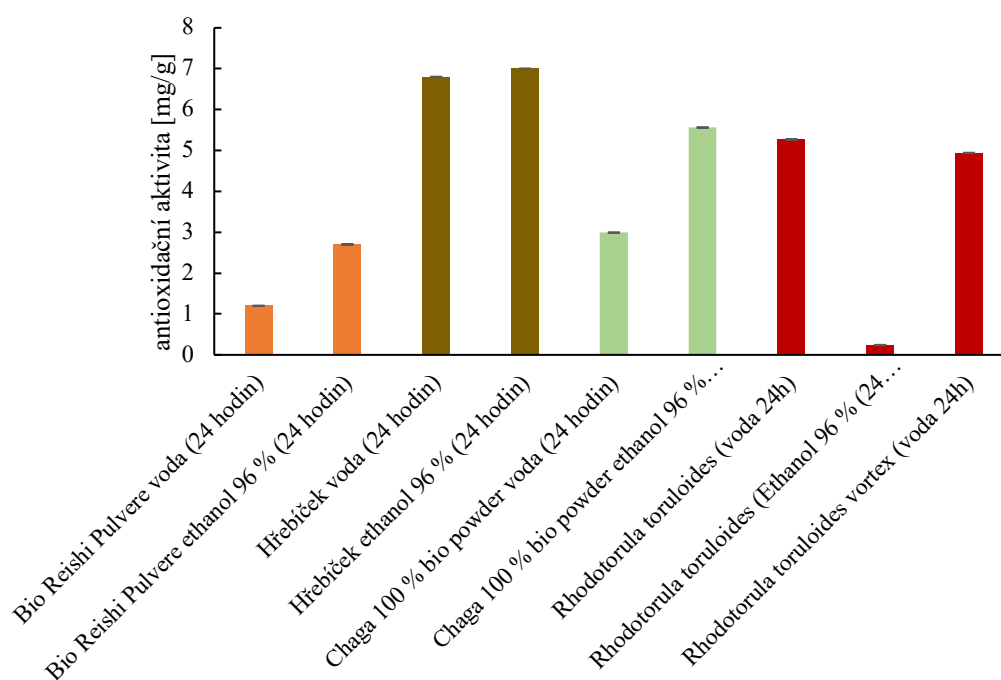
5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity v extraktech

Z výsledků (Tabulka 7) lze vyčíst, že nejlepší antioxidační aktivitu vykázaly extrakty hřebíčku a houby Chaga. Lze vidět, že v případě hub velmi záleželo na extrakčním rozpouštědle a u obou hub byla zaznamenána vyšší antioxidační aktivita v případě použití organického rozpouštědla než u extraktů vodných. U ethanolového extraktu houby Chaga to bylo 5,56 mg/g. V případě vodného extraktu houby Chaga byla hodnota o něco nižší (2,99 mg/g). Tato skutečnost může být dána tím, že pokud jde o aktivní látky, houba Chaga obsahuje značné množství triterpenoidů, které vykazují výraznou antioxidační aktivitu, ale nejsou rozpustné ve vodě, naopak jsou lépe rozpustné v organických rozpouštědlech. Velmi dobrou antioxidační aktivitu vykázal vodný extrakt červené kvasinky *Rhodotorula toruloides* (5,27 mg/g). Tento extrakt je svým výsledkem velice zajímavý a vysoká antioxidační aktivita bude pravděpodobně způsobena vysokým obsahem fenolických látek v tomto extraktu. Zároveň bylo v daném extraktu stanoveno značné množství karotenoidů, které mohou k antioxidačnímu účinku také přispívat.

Tabulka 7 Výsledky analýzy antioxidační aktivity v jednotlivých vzorcích

vzorek	typ extraktu	Antioxidační aktivita [mg/g]
Bio <i>Reishi</i> Pulvere	Voda (24 hodin)	1,2 ± 0,005
Bio <i>Reishi</i> Pulvere	Ethanol 96 % (24 hodin)	2,7 ± 0,012
Hřebíček	Voda (24 hodin)	6,8 ± 0,004
Hřebíček	Ethanol 96 % (24 hodin)	7,0 ± 0,005
Chaga 100 % bio powder	Voda (24 hodin)	2,99 ± 0,01
Chaga 100 % bio powder	Ethanol 96 % (24 hodin)	5,56 ± 0,13
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda (24 hodin)	5,27 ± 0,01
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Ethanol 96 % (24 hodin)	0,24 ± 0,01
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda vortex (24 hodin)	4,94 ± 0,01

Poměrně nízkou antioxidační aktivitu vykázal vzorek vodného extraktu houby *Reishi* (1,2 mg/g) a ethanolový extrakt kvasinky *Rhodotorula toruloides* (Obr.26).



Obrázek 26 Graf znázorňující antioxidační aktivitu jednotlivých vzorků v mg/g

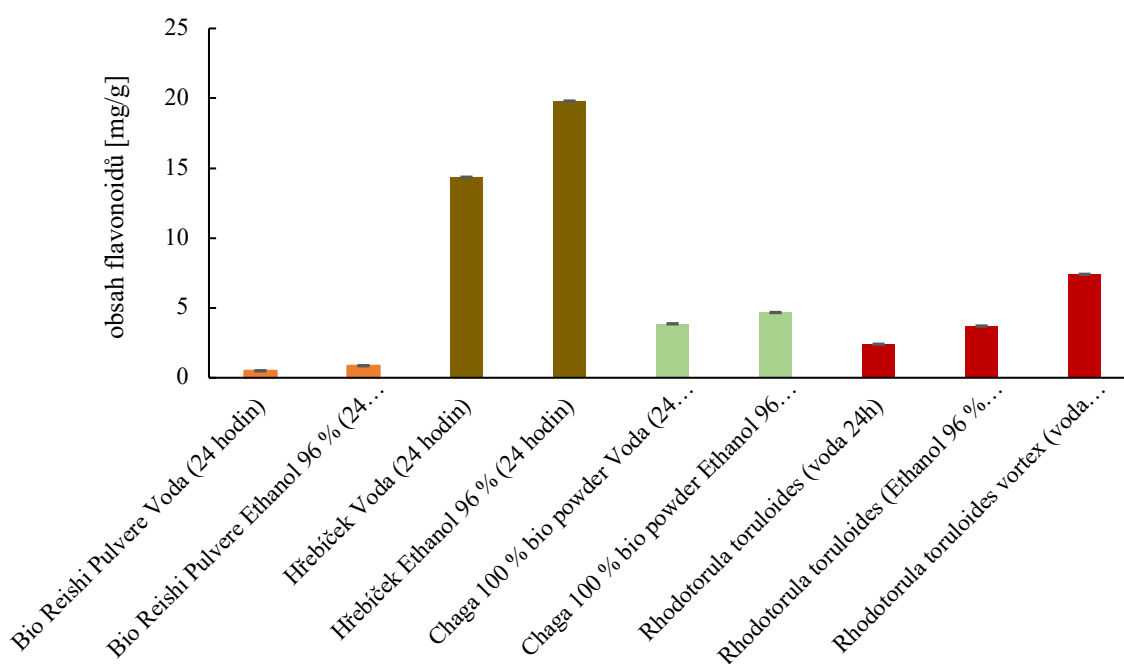
5.3 Stanovení celkového množství flavonoidů v extraktech

Největší množství flavonoidů bylo naměřeno v případě vzorků hřebíčku. Hřebíček by měl obsahovat například flavonoidy quercetin, kaempferol a jejich deriváty. U ethanolového extraktu byl výsledek ještě o něco vyšší, než v případě vodného extraktu a to 19,8 mg/g. V případě houby Chaga tomu bylo obdobně. U ethanolového extraktu byl obsah flavonoidů stanoven na 4,67 mg/g, u vodného na 3,86 mg/g. Nejnižší množství flavonoidů se naopak vyskytovalo v extraktech houby *Reishi* (Tabulka 8).

Tabulka 8 Výsledky analýzy množství flavonoidů

Vzorek	Typ extraktu	Celkový obsah flavonoidů [mg/g]
Bio <i>Reishi Pulvere</i>	Voda (24 hodin)	0,50 ± 0,005
Bio <i>Reishi Pulvere</i>	Ethanol 96 % (24 hodin)	0,85 ± 0,012
Hřebíček	Voda (24 hodin)	14,3 ± 0,004
Hřebíček	Ethanol 96 % (24 hodin)	19,8 ± 0,005
Chaga 100 % bio powder	Voda (24 hodin)	3,86 ± 0,010
Chaga 100 % bio powder	Ethanol 96 % (24 hodin)	4,67 ± 0,130
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda (24 hodin)	2,4 ± 0,005
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Ethanol 96 % (24 hodin)	3,7 ± 0,010
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Voda vortex (24 hodin)	7,4 ± 0,010

Obsah flavonoidů v případě vzorků hřebíčku a vzorků kvasinky *Rhodotorula toruloides* jsou poměrně překvapivé. Vzhledem k tomu, že flavonoidy jsou podskupinou fenolických látek, mělo by množství flavonoidů být nižší, než množství fenolických látek (Obr.27). Tento jev můžeme vysvětlit zvážením několika faktorů. V případě stanovení obou skupin látek se používala spektrofotometrie, ovšem s jiným postupem stanovení. Rozdíly v technikách přípravy vzorků by tak mohly přispět k odchylkám v naměřeném obsahu flavonoidů a fenolických sloučenin. Je možné, že v případě techniky použité pro stanovení fenolických sloučenin nebyly veškeré flavonoidy detekovány, jelikož tato metoda pro ně není specifická a metodou byly detekovány pouze jiné fenolické látky. Naopak flavonoidy byly detekovány metodou přímo zacílenou na tuto skupinu látek. V případě vzorku kvasinky *Rhodotorula Toruloides* je tomu obdobně. Dalším důvodem by mohla být interference jiných látek při měření fenolických látek, které tak nebyly detekovány v celém množství. Nelze však vyloučit ani možnou chybu měření v případě stanovení fenolických látek.



Obrázek 27 Graf zastoupení flavonoidů v mg/g v jednotlivých vzorcích

5.4 Analýza lipofilních látek v extraktech

Lipofilní látky byly analyzovány pomocí HPLC (Tabulka 9). Postup měření a parametry použité pro měření jsou uvedeny v kapitole 4.9. V případě této analýzy jsou uvedeny kvalitativní výsledky přítomnosti jednotlivých detekovaných látek v ethanolových extraktech. Důvodem, proč nebyly vodné extrakty zařazeny do výsledků byl fakt, že nevykazovaly při analýze HPLC měřitelnou odezvu. V ethanolových extraktech byl detekován u více vzorků beta karoten, který je významným lipidickým antioxidantem (2.10.1). Dále byl ve 3 vzorcích detekován ergosterol, který je prekurzorem vitamínu D (viz kap. 2.10.2.1) a chlorofyl. U kvasinky *Rhodotorula toruloides* byl detekován také torulen, což je další karotenoid, který je mimo jiné zodpovědný za její červené zbarvení.

Tabulka 9 Obsah lipofilních látek v jednotlivých extraktech

Vzorek extrakt 24 hodin (ethanol 96 %)	Ergosterol	Chlorofyl	Beta karoten	Torulen
<i>Reishi</i>	✓	x	x	x
Hřebíček	x	✓	x	x
Chaga	✓	x	✓	x
<i>Rhodotorula toruloides</i>	✓	x	✓	✓

5.4.1 Stanovení eugenolu v extraktech hřebíčku

Eugenol byl stanoven v extraktech z hřebíčku pomocí metody HPLC a naměřené chromatografy byly vyhodnoceny pomocí programu Chromoleon 7, kde byla provedena integrace ploch pod křivkou a pomocí kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace eugenolu ve vzorcích. Vzhledem k vysoké koncentraci eugenolu ve vzorcích a zakalení vodného vzorku bylo nejpřehlednějších výsledků dosaženo v případě vzorku zředěného 100krát. Původní extrakt byl již zředěn 10krát. Množství eugenolu ve vzorku bylo vypočítáno pomocí kalibrační křivky $A = 5610,39 \cdot c$ a bylo vztaženo na 1 g sušiny.

Tabulka 10 Obsah eugenolu v extraktech hřebíčku

vzorek	obsah eugenolu ve vzorku (mg/g)
hřebíček (96 % ethanol)	98,57
hřebíček (voda)	14,24

Obsah eugenolu v ethanolovém extraktu z hřebíčku byl vyšší než v případě vodného a činil 98,57 mg/g. V případě stanovení eugenolu pomocí HPLC bylo naměřeno výrazně vyšší množství eugenolu, než celkových fenolických látek metodou spektrofotometrie. Tato skutečnost by mohla vyplývat z toho, že extrakt hřebíčku byl kvůli měření naředěn pomocí acetonitrilu, který je pro eugenol vzhledem k polaritě mnohem lepším rozpouštědlem, než voda či ethanol. Voda je z těchto tří rozpouštědel rozpouštědlem nejvíce polárním, acetonitril nejméně polárním. Důvodem, který by také mohl k výsledku přispívat je to, že vzorky byly ponechány před měřením ve vialkách několik dní, než byly pomocí HPLC změřeny a působení acetonitrilu tak bylo poměrně dlouhé, což mohlo vést k uvolnění eugenolu z vázaných forem, například formy isoeugenolu nebo eugenolu ve formě vázané s glykosidy. Vzhledem k tomuhle faktu mohl být výsledek vyšší než u spektrofotometrické metody [106].

Spektrofotometrické stanovení může být také ovlivněno více faktory, než v případě HPLC a to například delší manipulací se vzorkem v průběhu jeho stanovení, změně teplot či interference fenolických látek s jinými látkami ve vzorku, které jsou v případě HPLC separovány.

Porovnáme-li stanovení eugenolu pomocí HPLC a stanovení celkových fenolických látek, zjistíme, že v případě spektrofotometrického stanovení nebyl zjištěn tak značný rozdíl mezi vodným a ethanolovým extraktem. Důvodem by mohla být opět polarita rozpouštědel tedy to, že v ethanolovém extraktu byl hřebíček při této analýze rozpouštěn ethanolem a acetonitrem, zatímco vodný extrakt vodou a acetonitrem.

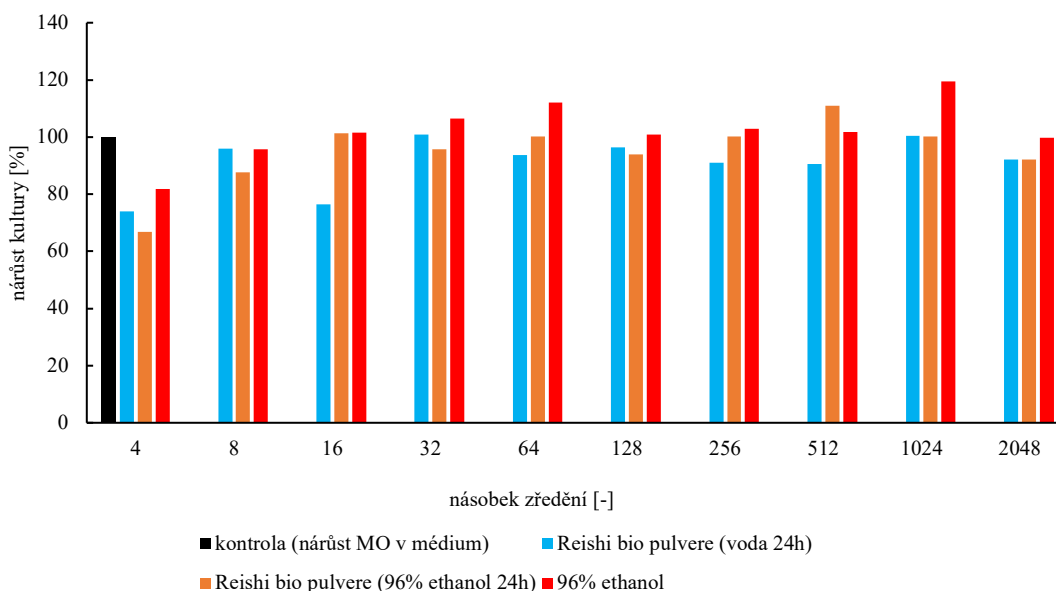
Metoda HPLC může také obecně poskytovat citlivější stanovení, než metoda spektrofotometrická [107]

5.5 Antimikrobiální testy jednotlivých extraktů

Výsledky antimikrobiálních testů provedených pomocí bujónové diluční metody, jejíž postup je uveden v kapitole 4.10.1 jsou zobrazeny na následujících grafech (Obr. 29, Obr.30). Černý sloupec vyjadřuje hranici 100 %, která představuje nárůst mikroorganismů v čistém médiu bez působení jiných látek a slouží jako kontrola. Veškeré výsledky jsou dopočítány na základě této kontroly. V případě, že bakterie v přítomnosti vzorku nedosáhla 100 % nárůstu, znamená to, že vzorek vykazuje antimikrobiální aktivitu. Grafy zobrazují procentuální nárůst mikrobiální kultury po 24 hodinách oproti této kontrole. Test byl proveden při použití vzorků testovaných přírodních extraktů a jejich rozpouštědel z důvodu možného porovnání antimikrobiální aktivity mezi vzorkem a rozpouštědlem. U ethanolového extraktu byl jako kontrola použit 96 % ethanol, u vodného extraktu slouží jako kontrola právě černý sloupec zobrazující bakterie v čistém růstovém médiu. Vzorky byly testovány při postupném dvojkovém ředění 4 – 2048krát. Výchozí koncentrace extraktů je 0,1g sušiny/ml.

Pod jednotlivými grafy s antimikrobiální aktivitou je vždy vyobrazen graf testu viability kultury po přidání barviva resazurinu, který zobrazuje životaschopnost kultury v závislosti na zředění vzorku.

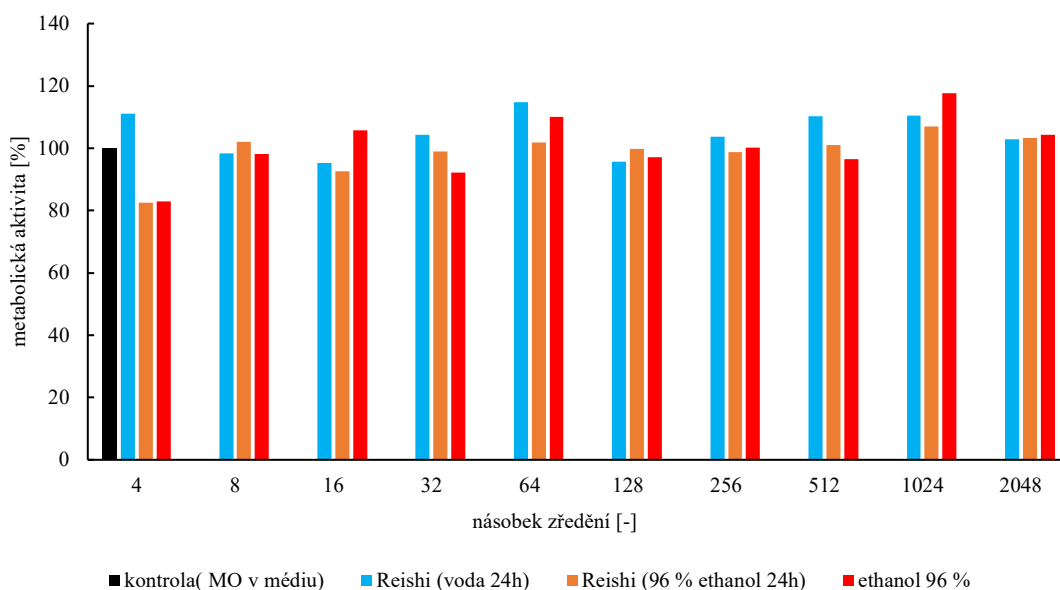
5.5.1 Antimikrobiální testy na bakterii *Staphylococcus epidermidis*



Obrázek 28 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury SE na zředění vzorků Reishi

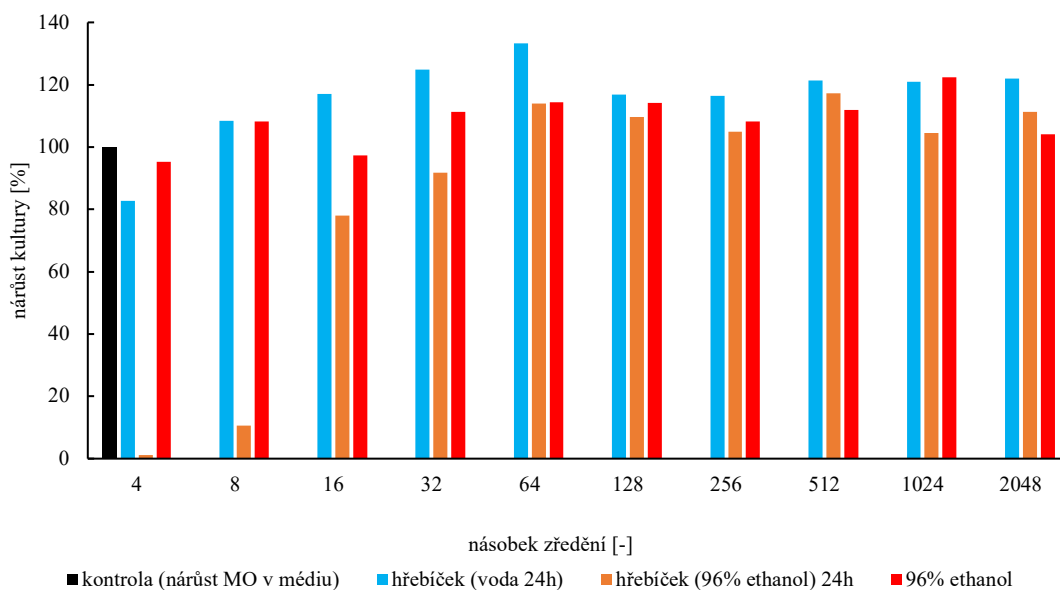
V případě porovnání ethanolového a vodného extraktu lépe inhibuje nárůst bakterie SE vzorek ethanolového extraktu houby *Reishi*, který při nejnižším zředění inhibuje nárůst o 33,3 % proti nárůstu mikroorganismu v médiu (Obr.28). Antimikrobiální

aktivita tohoto vzorku následně mírně klesá s vyšším zředěním. Při porovnání ethanolového extraktu s 96 % ethanolom lze vidět, že ethanol má na bakterii mírně horší antibakteriální účinek z čehož lze usoudit určitou antimikrobiální aktivitu samotné houby *Reishi*. V případě vodného extraktu houby *Reishi* byl nárůst inhibován do zředění 16krát. Skutečnost, že houba *Reishi* dosahuje v případě vyšších zředění i hodnot nárůstu přes 100 % může pramenit z faktu, že tato houba obsahuje poměrně velké procento sacharidů, které pro bakterie slouží jako zdroj uhlíku a živin.



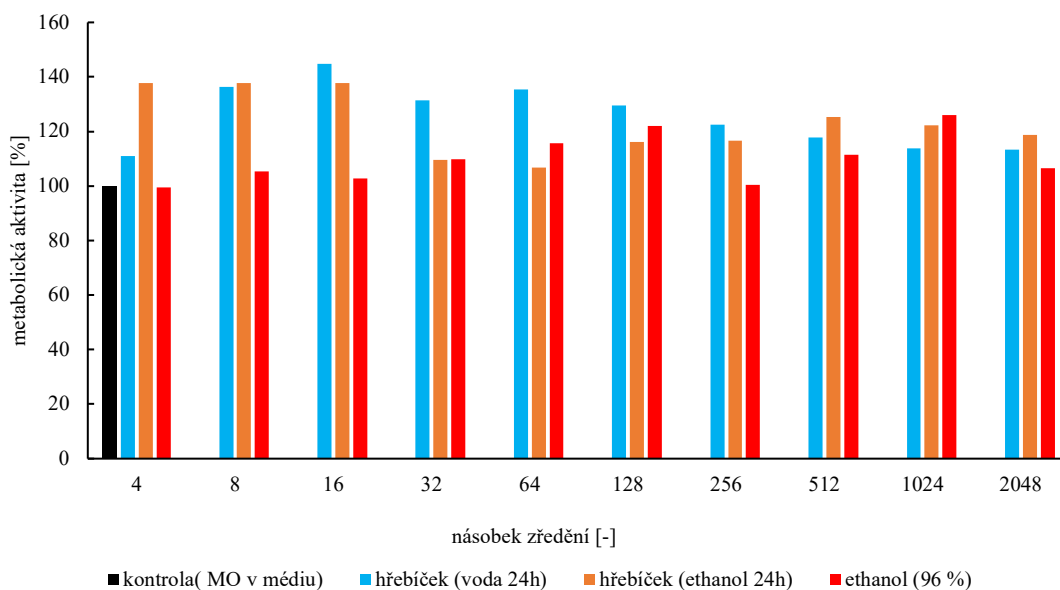
Obrázek 29 Resazurinový test *Reishi*/SE

V případě metabolické aktivity vzorků vodného a ethanolového extraktu *Reishi* měly největší životaschopnost buňky v přítomnosti extraktu *Reishi* ve vodě při vyšších zředěních (Obr.29). V případě vodného extraktu při zředění 4krát byla metabolická aktivita buněk vyšší než v případě buněk v čistém médiu. Z tohoto faktu lze usoudit, že houba *Reishi* podporuje metabolickou aktivitu této bakterie. Houba *Reishi* obsahuje velké množství sacharidů, které mohou být pro bakterie zdroje uhlíku a energie.



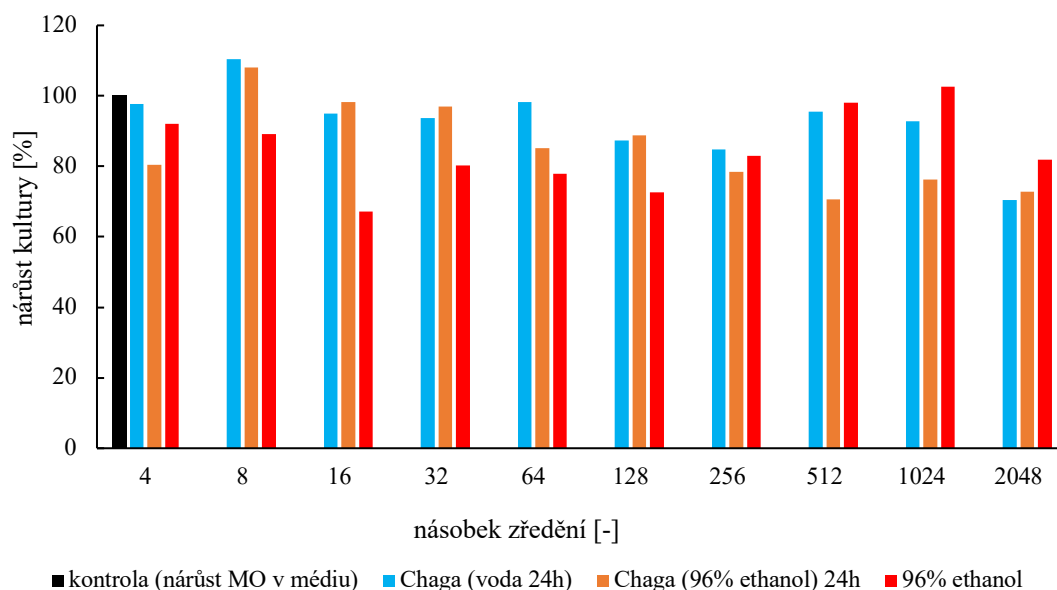
Obrázek 30 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury SE na zředění vzorků hřebíčku

Z grafu testování extraktů hřebíčku (Obr. 30) můžeme pozorovat, že vzorek ethanolového extraktu hřebíčku nabývá při nízkých zředěních výrazné antimikrobiální aktivity a inhibuje nárůst bakterie na 1,5 % proti nárůstu bakterií v médiu. Následně se nárůst bakterií výrazně zvyšuje a hodnota MIC byla v případě ethanolového extraktu stanovena na koncentraci vzorku při zředění 32krát. Při porovnání výsledků ethanolového extraktu s 96 % ethanolom ale můžeme pozorovat, že nárůst bakterií je v případě čistého ethanolu mnohem větší už při nízkých zředěních. Z toho lze usoudit výraznou antimikrobiální aktivitu samotného hřebíčku. Naproti tomu v případě vodného extraktu kultura bakterie narostla již při nejnižším zředění 82 %, z čehož lze pozorovat částečnou inhibici nárůstu oproti kontrole bakterií v médiu, ale při vyšších zředěních se nárůst nadále zvyšuje.



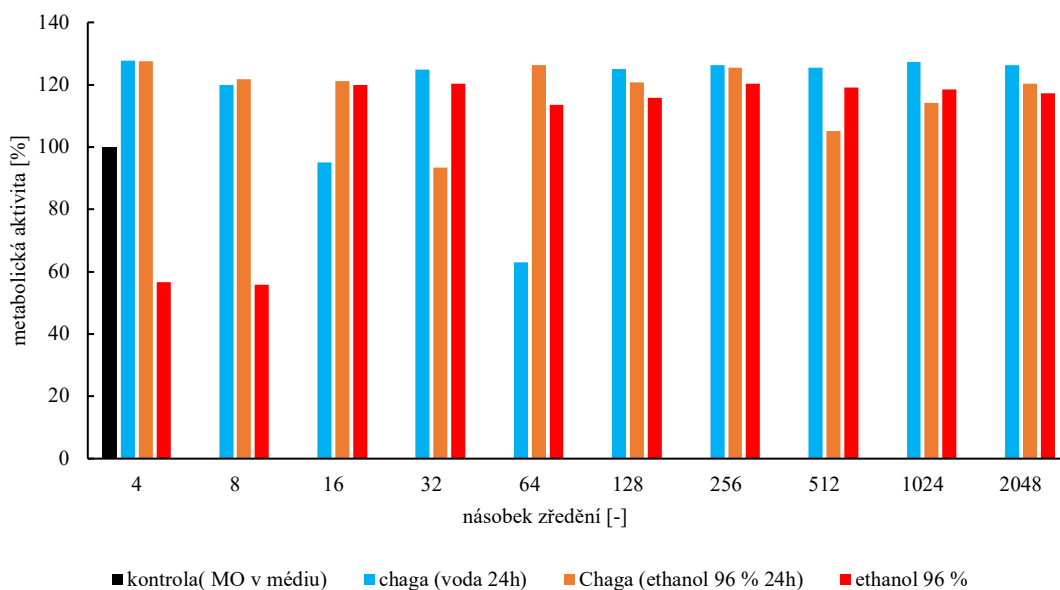
Obrázek 31 Resazurinový test hřebíček/SE

Metabolická aktivita bakterie se nejvíce projevila u vzorku vodného extraktu hřebíčku, kdy v případě zředění tohoto extraktu 16krát bakterie vykazují metabolickou aktivitu proti kontrole. Lze tedy konstatovat, že hřebíčkové extrakty při těchto zředěních metabolickou aktivitu bakterií negativně příliš neovlivnily (Obr.31). Vzhledem k tomu, že je metabolická aktivita velmi vysoká u ethanolového extraktu hřebíčku, je možné, že bakterie *Staphylococcus epidermidis* umí využívat nízkou koncentraci ethanolu v kombinaci s látkami v extraktu ke svému růstu. Hřebíček obsahuje fenolické sloučeniny, které jsou některé druhy bakterií schopny metabolizovat. Bakterie s vhodnými metabolickými dráhami jsou schopny při nižších koncentracích fenolické sloučeniny degradovat a využívat je jako zdroj uhlíku a energie. Tento fakt byl například prokázán u bakterií rodu *Pseudomonas*, které dokáží tímto způsobem využívat přímo eugenol [108].



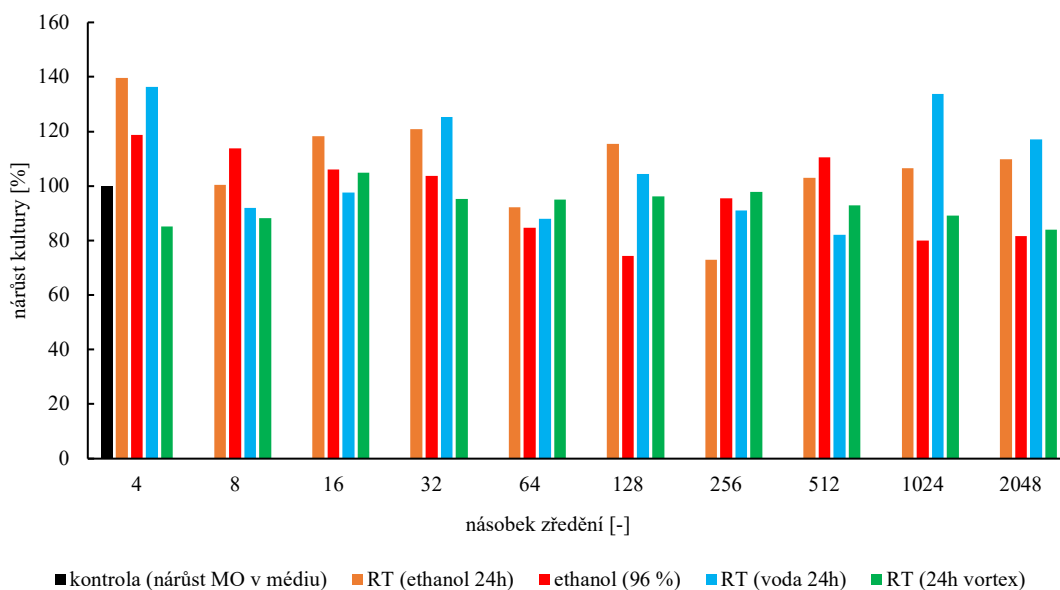
Obrázek 32 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury SE na zředění vzorků Chaga

Bakterie *Staphylococcus epidermidis* byla vystavena také vodnému a ethanolovému extraktu medicínální houby Chaga (Obr.32). Z grafu lze vidět, že extrakt houby růst mikroorganismů spíše podporuje. Při nejnižším zředění vodného extraktu bakterie narostla na 97,6 % a při dalším zředění již narostla přes 100 % oproti neovlivněné kultuře v médiu. V případě ethanolového extraktu byl nárůst při nejnižším zředění 80 % ve srovnání s kontrolou. Oba vzorky se vykazaly větší nárůst než jejich kontroly, což může být způsobené vysokým obsahem sacharidů v této houbě, které slouží pro mikroorganismy jako potrava.



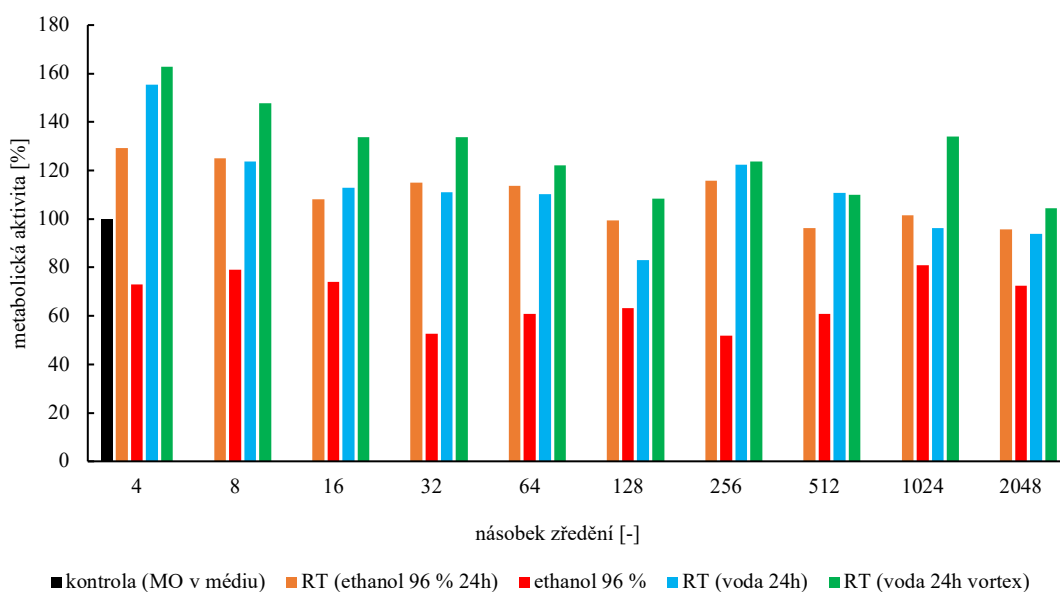
Obrázek 33 Resazurinový test chaga/SE

Z resazurinového testu lze pozorovat vysokou metabolickou aktivitu bakterie *Staphylococcus epidermidis* (Obr.33). Metabolickou aktivitu bakterie negativně ovlivnil pouze ethanol při nízkých zředěních. Pokud srovnáme účinek ethanolového extraktu houby Chaga s čistým ethanolom, je patrné, že houba Chaga je pro bakterii *Staphylococcus epidermidis* určitým způsobem prospěšná a podporuje její metabolismus. Stejně jako u metabolické aktivity extraktu hřebíčku v ethanolu je také možné, že bakterie určitým způsobem využívá kombinace nízké koncentrace ethanolu a houby Chaga.



Obrázek 34 Graf závislosti nárůstu bakterie *Staphylococcus epidermidis* na zředění vzorku RT

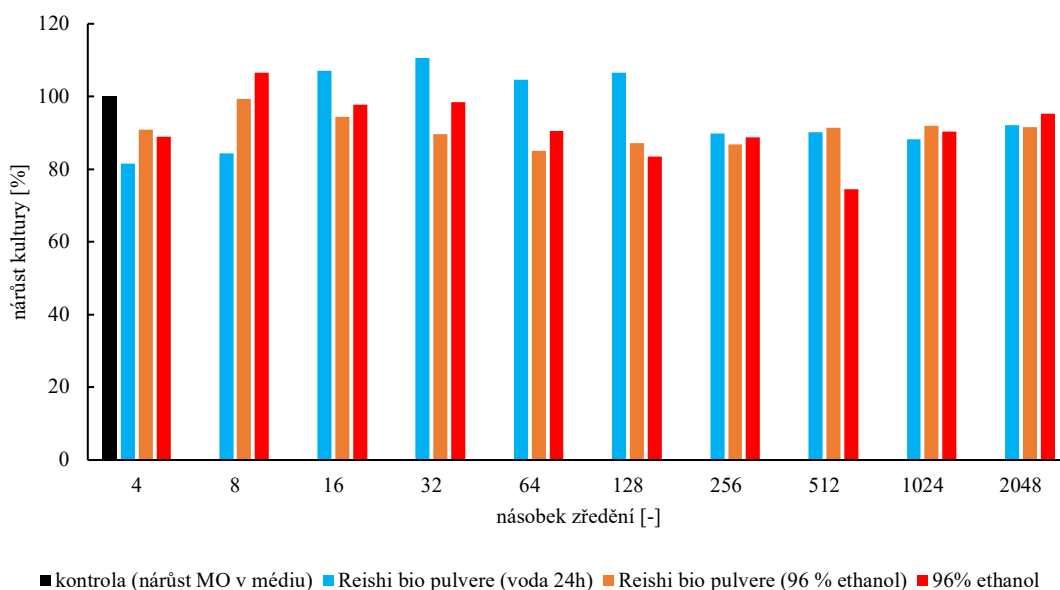
Vodný extrakt kvasinky *Rhodotorula toruloides* extrahovaný na vortexu pomocí kuliček inhibuje růst bakterie *Staphylococcus epidermidis* při zředění 4krát a to na 85,2 % proti kontrole bakterií v médiu (Obr.34). Vodný extrakt kvasinky inhibuje nárůst bakterie při zředění 8krát o zhruba 9 %. Bakterie v tomto případě narostly na 91 %. Ethanolový extrakt inhibuje nárůst kultury při zředění 256krát o 28 % proti kontrole. Nárůst bakterie byl v tomto případě 72 %. Je nutné poznamenat, že kvasinka *Rhodotorula* je také mikroorganismus a může tak docházet k jejímu růstu na médiu. To by mohl být jeden z důvodů, proč je nárůst mikroorganismů v případě těchto vzorků tak vysoký.



Obrázek 35 Resazurinový test RT/SE

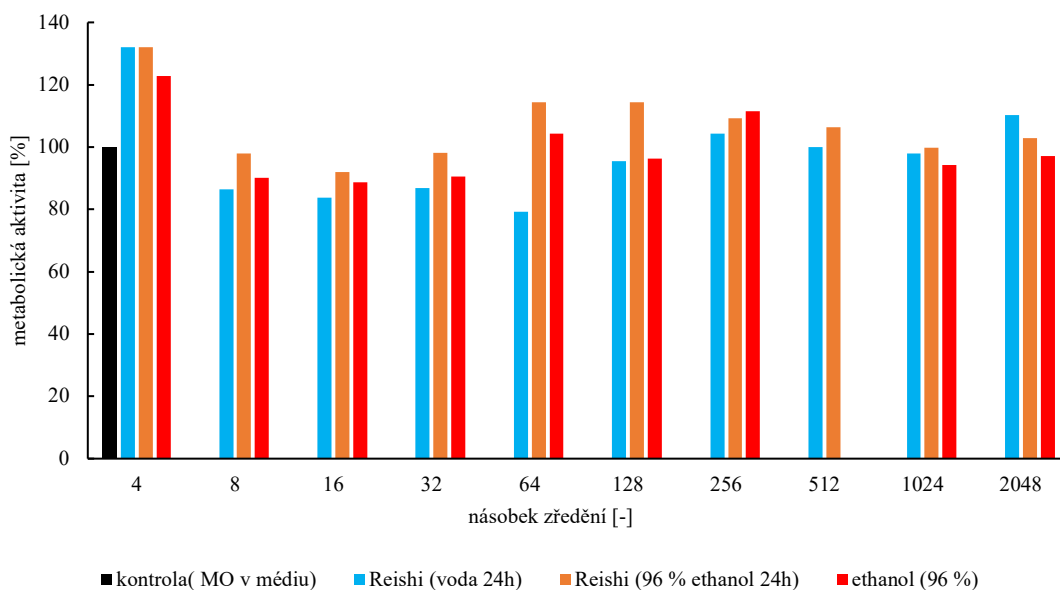
U vzorků kvasinky *Rhodotorula toruloides* byla metabolická aktivita vysoká u všech vzorků obsahující kvasinku. Největší viabilita kultury byla zaznamenána při použití vodného extraktu extrahovaného za použití přístroje vortex, který je zobrazen pomocí zeleného sloupce (Obr.35). Je pravděpodobné, že do metabolické aktivity byla zahrnuta také metabolická aktivita samotné kvasinky. Jediný vzorek, u kterého byla metabolická aktivita buněk negativně ovlivněna byl čistý 96 % ethanol. Tady je možné konstatovat, že ethanol jako denaturační činidlo narušil metabolismus proteinů bakterie, která už neobnovila svoji životaschopnost.

5.5.2 Antimikrobiální testy na bakterii *Escherichia coli*



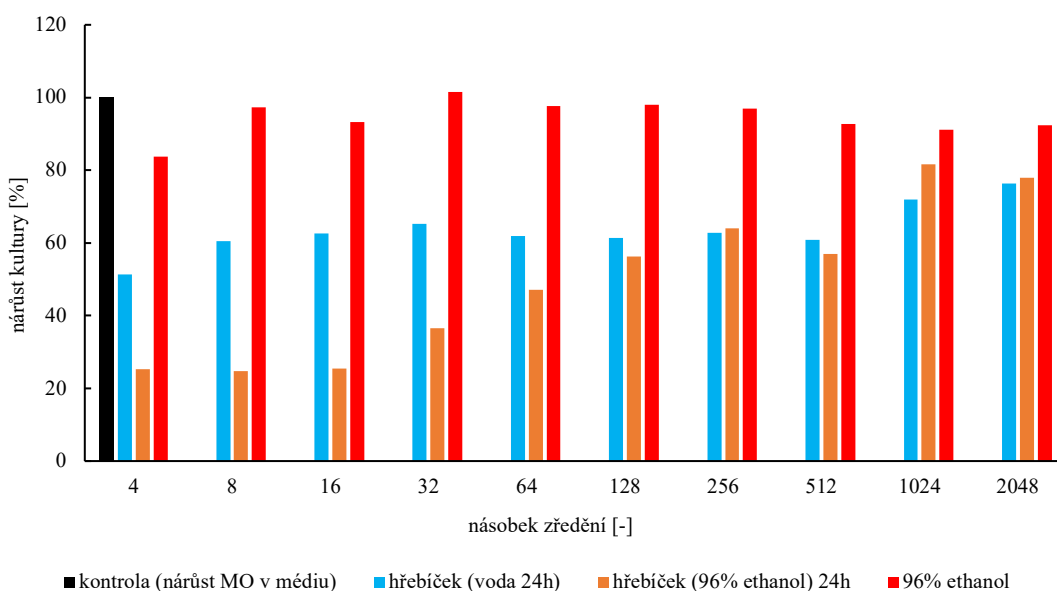
Obrázek 36 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury *E.coli* na zředění vzorků *Reishi*

Druhou bakterií podrobenou antimikrobiálnímu testu vůči extraktům je bakterie *Escherichia coli*. V tomto případě kultura v přítomnosti vodného extraktu *Reishi* při nejnižším zředění narostla na 81 % proti kultuře, tedy byla inhibována o 19 % a při vyšším zředění se inhibiční schopnost snižuje (Obr.36). Výsledky vodného extraktu jsou velmi podobné kontrole, tj. nárůstu mikroorganismů v čistém médiu. Ethanolový extrakt inhiboval nárůst kultury při nejnižším zředění o 9,2 %. Stejně jako u přechodí testované bakterie u stejné houby dochází k tomu, že bakterie *E.coli* využívá určitých uhlíkových látek v houbě *Reishi* a v kombinaci s vodou narůstá více než kontrola.



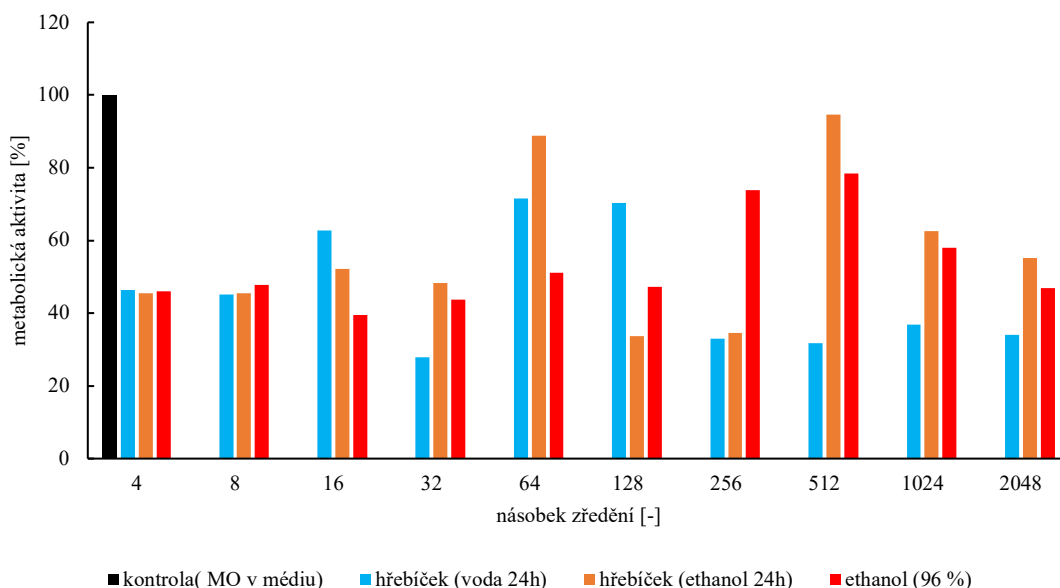
Obrázek 37 Resazurinový test Reishi/EC

V případě vzorků extraktů *Reishi* byla největší metabolická aktivita zaznamenána u vzorku vodného extraktu (Obr.37). Stejně jako u bakterie *Staphylococcus epidermidis*, kde byla při nejnižším zředění metabolická aktivita bakterií u vodného extraktu tohoto vzorku 111% oproti kontrole (Obr.29), i u bakterie *E.coli* je metabolická aktivita výrazně přes vyšší než v případě buněk rostoucích v médiu. Nejnižší metabolická aktivita byla zjištěna v případě vzorku ethanolového extraktu *Reishi* a v případě čistého ethanolu.



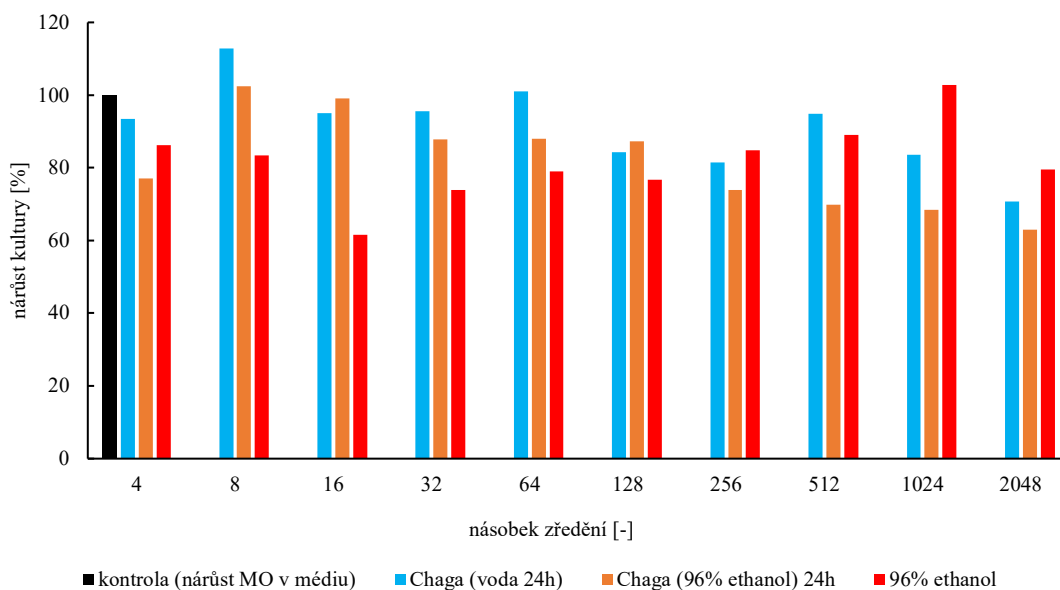
Obrázek 38 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury *E.coli* na zředění vzorků hřebíčku

V případě antimikrobiálního působení extraktů hřebíčku na *Escherichia coli* lze pozorovat, že vzorky působí lepším antibakteriálním účinkem než jejich kontroly (Obr.38). Vodný extrakt hřebíčku inhibuje při nejnižším zředění (4krát) nárůst o 49 % v porovnání v buňkami v médiu. Při dalším zředění vodného extraktu kultura mírně narůstá, ale nárůst je inhibován i při nejvyšším zředění na 77,9 % proti kontrole, tedy o 22 %. To poukazuje na poměrně dobré antimikrobiální vlastnosti hřebíčku vůči této bakterii. V případě ethanolového extraktu hřebíčku bakterie narostly při nejnižším zředění pouze na 25,3 % oproti kontrole buněk v médiu. Při zvyšujícím se zředění nárůst bakterií stoupá, ale i při nejvyšším zředění 2048krát stále inhibuje nárůst bakterie *Escherichia coli* o 23,4 %. Kontrola v podobě 96% ethanolu nárůst kultury inhibuje lehce jen při nejnižším zředění, což vypovídá o velmi dobrých antimikrobiálních vlastnostech hřebíčku proti této bakterii. Při zředění 32krát ethanol nárůst bakterie neinhubuje, což by se dalo považovat za chybu měření, vzhledem k tomu, že při ostatních zředěních nárůst nepřesáhl 100 %.



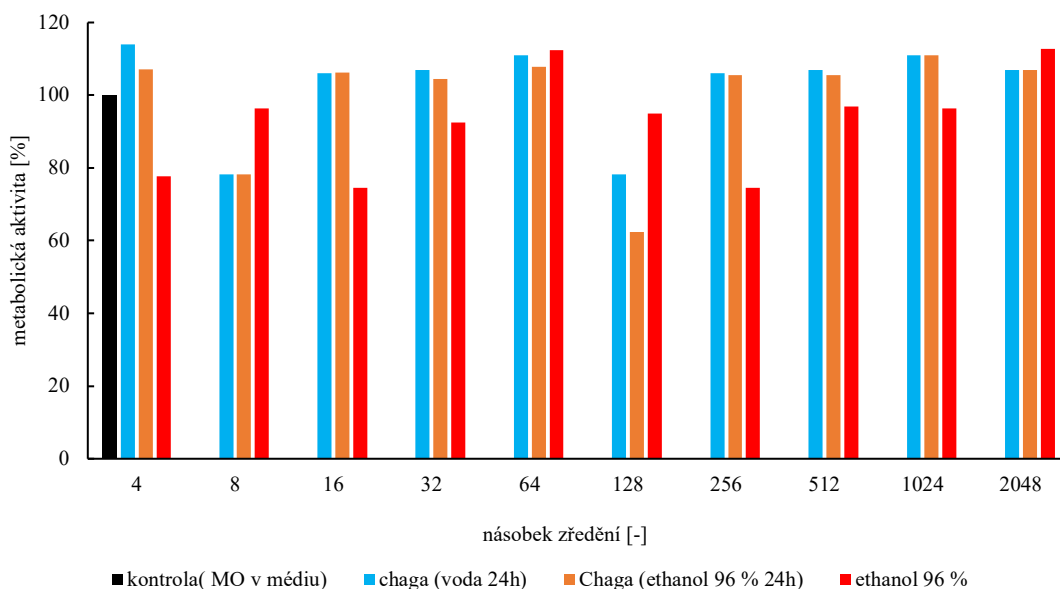
Obrázek 39 Resazurinový test hřebíček/EC

Bakterie *E.coli* neměla ani u jednoho ze vzorků stejnou životaschopnost jako bakterie rostoucí volně v médiu. Nejvyšší viabilita bakterie byla zaznamenána při vysokém zředění 512krát u vzorku ethanolového extraktu hřebíčku. Tato viabilita ale stále nedosáhla viability kultury v čistém médiu. Naopak nejnižší metabolická aktivita byla zaznamenána u vzorku vodného extraktu hřebíčku při zředění 32krát (Obr.39).



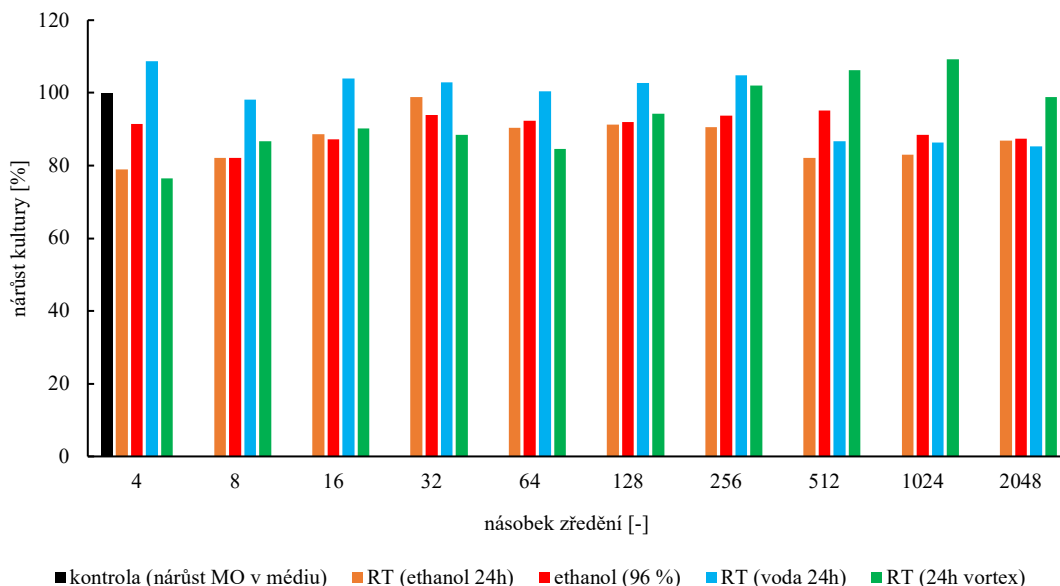
Obrázek 40 Graf závislosti nárůstu mikrobiální kultury *E.coli* na zředění vzorků Chaga

Stejně jako v případě předchozí testované bakterie, i v případě bakterie *Escherichia coli* byl zaznamenán vyšší nárůst bakterie v přítomnosti vzorků s obsahem extraktu Chaga než v případě kontrol. Inhibice bakteriálního růstu byla vykázána v případě vodného i ethanolového extraktu při zředění 4x. U ethanolového extraktu činila inhibice 23 %, u vodného extraktu 6,5 % oproti kontrole buněk v médiu (Obr.40). Je tedy možné, že i bakterie *E.coli* dokáže určitým způsobem využívat uhlíkové formy sloučenin jako zdroj živin.



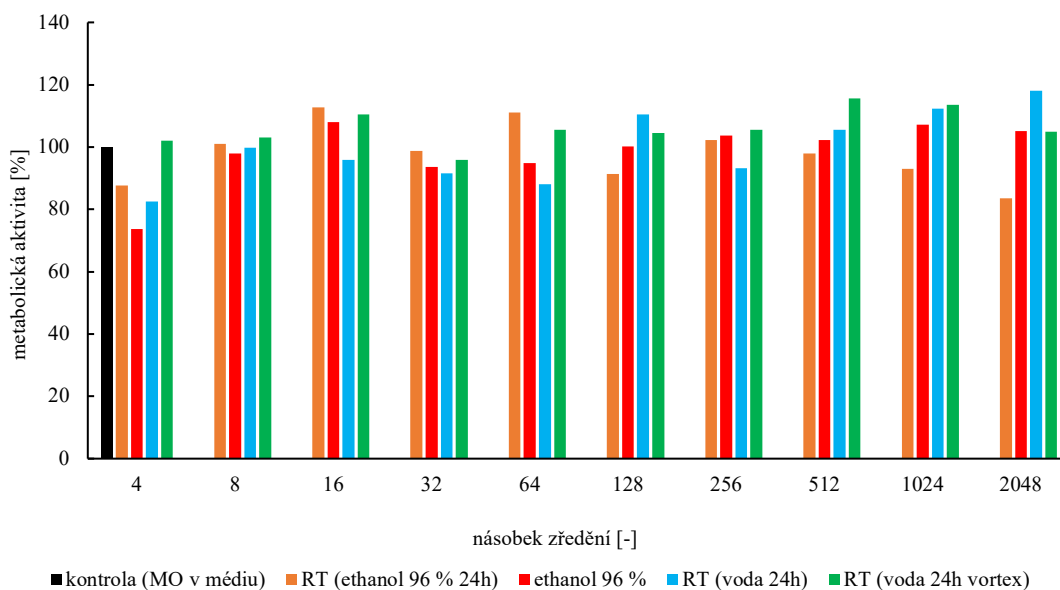
Obrázek 41 Resazurinový test – Chaga/EC

Viabilita kultury stanovovaná oproti viabilitě buněk v čistém médiu bez antimikrobiálních činidel byla nejvyšší v případě vzorku vodného extraktu houby Chaga. Stejně jako tomu bylo i u houby *Reishi*, i houba Chaga podporuje růst a pozitivně ovlivňuje metabolismus bakterií. Nejnižší viabilita kultury byla naměřena u vzorku ethanolového extraktu houby Chaga při zředění 128krát. Při nejvyšším použitém zředění neměl ani čistý ethanol na metabolismus bakterie *E.coli* negativní vliv (Obr.41).



Obrázek 42 Graf závislosti nárůstu kultury *E.coli* na zředění vzorků RT

U bakterie *E.coli* vykázal nejlepší antimikrobiální účinek ethanolový extrakt kvasinky (Obr.42), kdy došlo k inhibici nárůstu při všech zředěních. Nejvíce byl v případě tohoto vzorku nárůst inhibován při zředění 512krát. Výsledky vodného extraktu za použití vortexu prokázaly inhibici nárůstu kultury do zředění 128krát. U ethanolového extraktu bylo dosaženo obecně lepší inhibice růstu ve srovnání s čistým ethanolem.



Obrázek 43 Resazurinový test RT/EC

V případě resazurinového testu u vzorků kvasinky *Rhodotorula* byla zaznamenána vysoká viabilita buněk u všech použitých vzorků (Obr.43). Nejnižší viabilitu kultury vykázaly buňky v přítomnosti ethanolu při nejnižším zředění. U vzorků obsahujících kvasinku mohlo dojít stejně jako u předchozí testované bakterie k interferenci metabolických aktivit bakterie *E.coli* a kvasinky *Rhodotorula* a výsledná metabolická aktivita tak může obsahovat jak metabolickou aktivitu bakterie, tak kvasinky.

5.5.3 Souhrnné výsledky antimikrobiálních testů jednotlivých extraktů

Souhrnné výsledky antimikrobiálních testů ukazují minimální inhibiční koncentrace jednotlivých vzorků vůči testovaným bakteriím (Tabulka 11). Vůči bakterii *Staphylococcus epidermidis* vykázal nejlepší antimikrobiální aktivitu extrakt hřebíčku v ethanolu, jehož minimální inhibiční koncentrace byla stanovena na koncentraci při zředění 32krát. V případě vodného extraktu hřebíčku byla MIC stanovena na zředění 4krát. Zde se dá usoudit, že podíl na antimikrobiální účinnosti měl samotný ethanol. V rámci výsledků antimikrobiálních testů byla ale několikrát dokázána vyšší antimikrobiální aktivita ethanolového extraktu hřebíčku oproti samotnému ethanolu, z čehož vyplývá, že hřebíček disponuje velice dobrými antimikrobiálními vlastnostmi (Obr.30).

V případě bakterie *E.coli* byl vykázán nejlepší antimikrobiální účinek v případě obou extraktů hřebíčku, které i při nejvyšším použitém zředění inhibovaly nárůst bakterií a jejich MIC byla stanovena na koncentraci při zředění 2048krát. Tyto extrakty přitom inhibovaly nárůst lépe než jejich kontroly (Obr.38). Velmi dobrou antimikrobiální

aktivitu vykázal také vzorek ethanolového extraktu houby *Reishi*, jehož MIC byla stanovena na koncentraci při zředění 2048krát. Stejně tomu bylo také u ethanolového extraktu kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Výsledek tohoto extraktu také ukazuje lepší antimikrobiální aktivitu v porovnání s ethanolem (Obr.42). Z výsledků tedy vyplývá, že testované rostlinné extrakty měly lepší antimikrobiální účinek vůči gramnegativnímu mikroorganismu *E.coli*, než vůči zástupci grampozitivních bakterií. Vzhledem k tomu, že tato bakterie nemá schopnost ethanol jakkoliv využívat ke svému růstu, výsledky bakterie *E.coli*, u kterých nárůst přesáhl výrazně hranici 100 % lze považovat za chybu metody.

Tabulka 11 Výsledky MIC jednotlivých extraktů

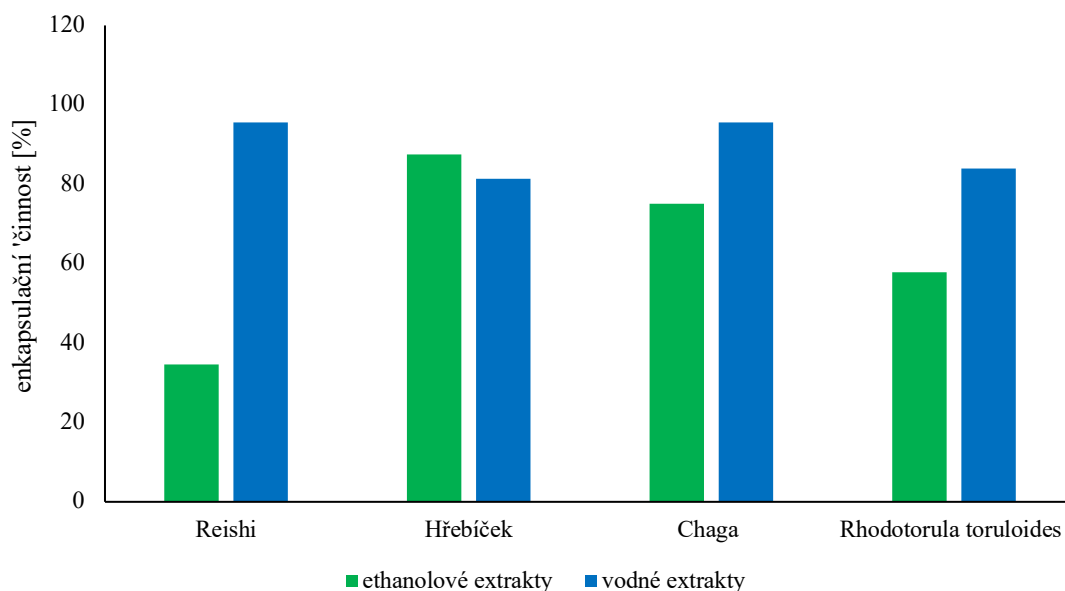
MIC jednotlivých extraktů (násobek zředění extraktu)		
Mikroorganismus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Hřebíček(voda 24h)	4x	2048x
Hřebíček (96% ethanol 24h)	32x	2048x
<i>Reishi</i> Bio Pulvere (voda 24h)	16x	8x
<i>Reishi</i> Bio Pulvere (96% ethanol 24h)	8x	2048x
Chaga (voda 24h)	4x	4x
Chaga (96% ethanol 24h)	4x	4x
<i>Rhodotorula toruloides</i> Voda (24 hodin)	-	-
<i>Rhodotorula toruloides</i> Ethanol 96 % (24 hodin)	-	2048x
<i>Rhodotorula toruloides</i> Voda (24 hodin) vortex kuličky	8x	128x

5.6 Enkapsulační účinnost

Enkapsulace do liposomů byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.11.1 a byla vypočítána na základě obsahu fenolických látek v extraktu a ve stočeném enkapsulovaném extraktu. Výsledky enkapsulační účinnosti jsou uvedeny níže (Tabulka 12, Obr.44).

Tabulka 12 Výsledky enkapsulační účinnosti liposomů

extrakt	obsah fenolických látek před enkapsulací	enkapsulované množství [mg/g]	enkapsulované množství [%]
<i>Reishi</i> (voda 24h)	1,35	1,29	95,55
<i>Reishi</i> (ethanol 24h)	2,66	0,92	34,58
Hřebíček (voda 24h)	19,26	15,66	81,31
Hřebíček (ethanol 24h)	19,41	16,98	87,48
Chaga (voda 24h)	5,28	5,05	95,64
Chaga (ethanol 24h)	7,43	5,58	75,10
<i>Rhodotorula toruloides</i> ethanol (24 hodin)	2,58	1,49	57,75
<i>Rhodotorula toruloides</i> voda (24)	7,03	5,90	83,92

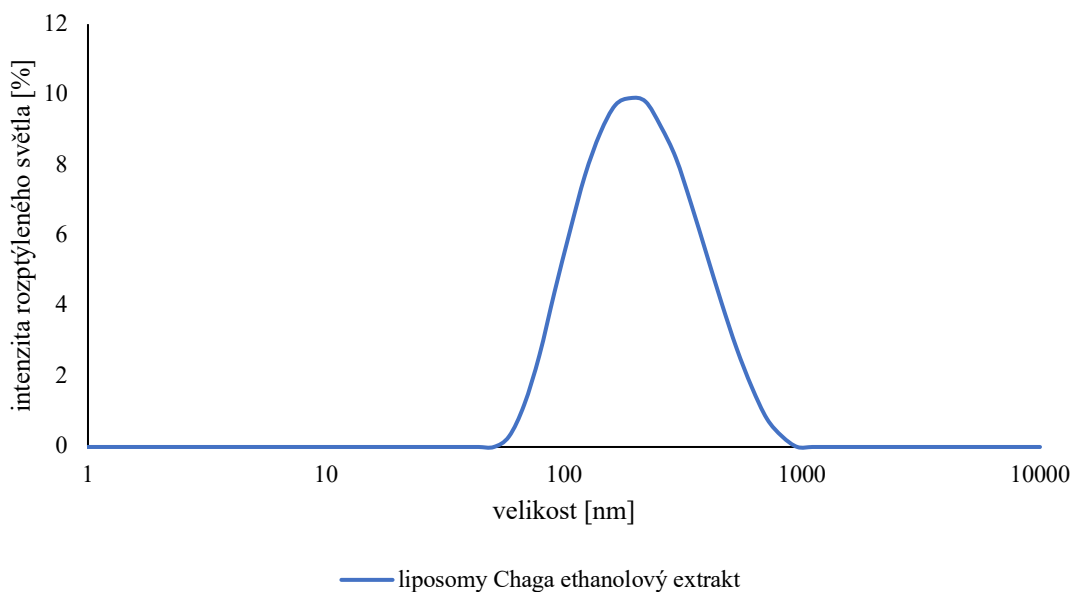


Obrázek 44 Graf zobrazující enkapsulační účinnost u liposomů s obsahem jednotlivých extraktů

Z výsledků lze pozorovat rozdílnou enkapsulační účinnost v závislosti na jednotlivých vzorcích. Nejvyšší enkapsulační účinnosti dosáhly vodné extrakty hub *Reishi* (95,55 %) a Chaga (95,64 %). Nejnižší hodnota enkapsulační účinnosti byla naopak naměřena u ethanolového extraktu *Reishi* (34,58 %), což může být způsobeno přítomností látek destabilizujících membrány v houbě *Reishi* spojenou s jejich lepší rozpustností v ethanolu. Ethanol také proniká lépe přes fosfolipidovou dvojvrstvu, než voda a tím pádem mohou látky enkapsulované do liposomů snadněji unikat do prostředí.

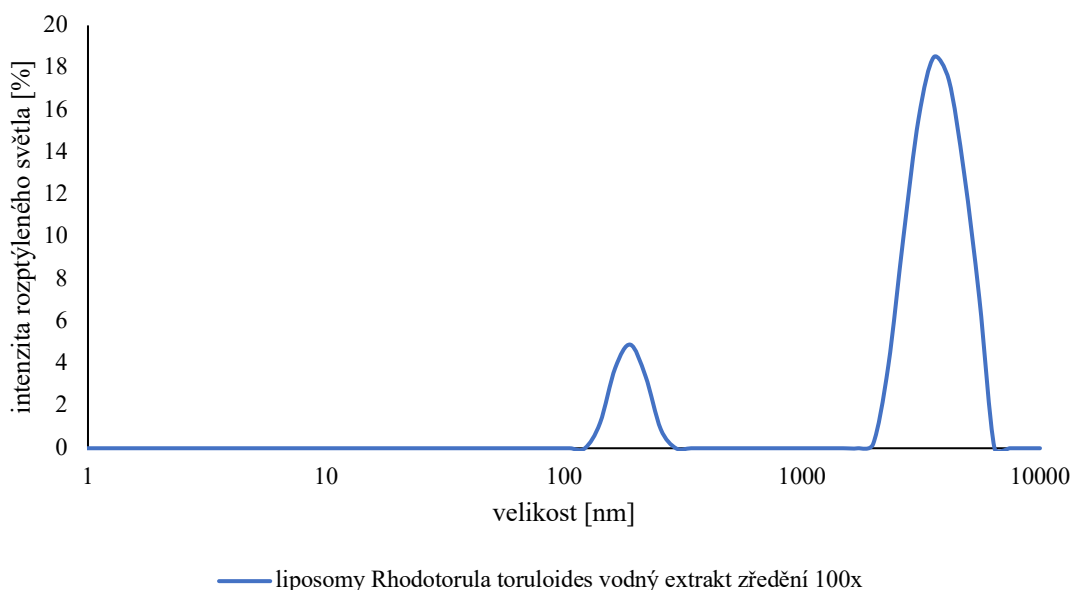
5.7 Analýza částic pomocí DLS

Pomocí analýzy dynamického rozptylu světla byla pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) stanovena distribuce velikosti liposomů připravených z jednotlivých extraktů, které byly následně přidány do krémů. Měření probíhalo ve skleněných kyvetách při laboratorní teplotě 25 °C, doba kalibrace byla nastavena na 60 sekund. Poloha v kyvetě, při které laser snímal rozptyl částic ve vzorku, byla nastavena na fixní hodnotu 1,00. Každý vzorek byl proměřen ve 3 cyklech a 12 opakováních. Z těchto měření byl následně vypočten průměr. Výsledkem byla naměřená závislost intenzity rozptýleného světla oproti velikosti částic.



Obrázek 45 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek Chaga ethanolový extrakt

Nejjednodušší výsledek z hlediska velikostní distribuce částic byl vyhodnocen v případě vzorku liposomů ethanolového extraktu houby Chaga (Obr.45), kdy se rozmezí velikosti všech částic pohybovalo mezi 100-1000 nm, přičemž střední hodnota velikosti částice byla stanovena na 182,1 nm. Největší intenzita rozptýleného světla byla tedy pozorována v případě částic s velikostí zhruba 200 nm.



Obrázek 46 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek *Rhodotorula toruloides* vodný extrakt

Dva distribuční podíly byly naměřeny v případě vzorku liposomů vodného extraktu *Rhodotorula toruloides* (Obr.46). V prvním distribučním podílu jsou částice o velikosti v rozmezí 100-300 nm, ve druhém distribučním podílu pak cca 3000-6000 nm. Střední velikost částice byla stanovena na 1444 nm. Vzhledem k přítomnosti dvou frakcí zde byla vyhodnocena střední hodnota velikost částice zvláště pro každou frakci. Frakce se od sebe velice lišily svojí střední velikostí částic a důvodem by tak mohlo být, že v případě druhé frakce s vyšší střední velikostí se jedná o kvasinky *Rhodotorula toruloides*, jejichž velikost bývá od 1 do 10 mikrometrů [109]. Veškeré hodnoty středních velikostí a zeta potenciálu jsou uvedeny níže (Tabulka 13).

Tabulka 13 Souhrnné výsledky měření DLS

vzorek	střední hodnota velikosti částice [nm]	Zeta potenciál [mV]
<i>Rhodotorula toruloides</i>	375,8	-20,8
<i>Rhodotorula toruloides</i> 100x	164,2,0	-22,7
Chaga	182,1	-47,3
Chaga 100x	185,3	-47,0
Hřebíček	336,8	-50,5
Hřebíček 100x	306,4	-52,5

Pomocí Zeta potenciálu můžeme určit stabilitu částice. Jak již bylo podrobněji popsáno v kapitole 4.12, za stabilní částice jsou považovány částice s nižší hodnotou Zeta potenciálu než -30mV a vyšší hodnotou než $+30\text{mV}$. V případě proměřených vzorků lze

konstatovat, že veškeré částice kromě vzorků kvasinky *Rhodotorula toruloides* jsou stabilní. Důvodem nestability částic s enkapsulovanými extrakty kvasinky *Rhodotorula toruloides* může být to, že se jedná o živý organismus.

Veškeré grafy s naměřenými distribuce částic jsou pro lepší přehlednost uvedeny v kapitole 9.

5.8 Antioxidační účinnost připravených krémů

Antioxidační aktivita byla změřena stejným způsobem jako v případě jednotlivých extraktů podle postupu uvedeného v kapitole 4.8.2.

Tabulka 14 Výsledky antioxidační aktivity

systém konzervace	extrakty bez enkapsulace	enkapsulované extrakty
	antioxidační aktivita [mg/g]	antioxidační aktivita [mg/g]
bez konzervantu	3,53	2,25
fenoxyethanol	1,45	1,02
olej z čajovníku	5,69	4,98

Krémy s extrakty bez enkapsulace vykázaly v případě měření antioxidační aktivity lepší výsledky (Tabulka 14). Důvodem může být mimo jiné to, že měření pomocí UV-VIS spektrofotometrie probíhá velmi rychle a v případě enkapsulovaných extraktů byly antioxidační látky uzavřeny v částicích. Během krátkého časového úseku se tak z částic neuvolnily a nezhášely tak kation ABTS tak dobře, jako látky neenkapsulované. ABTS je činidlo, které je velmi dobře rozpustné ve vodě, tím pádem dobře neproniká přes membránu liposomů a látky uzavřené v částicích v něm příliš nereagují.

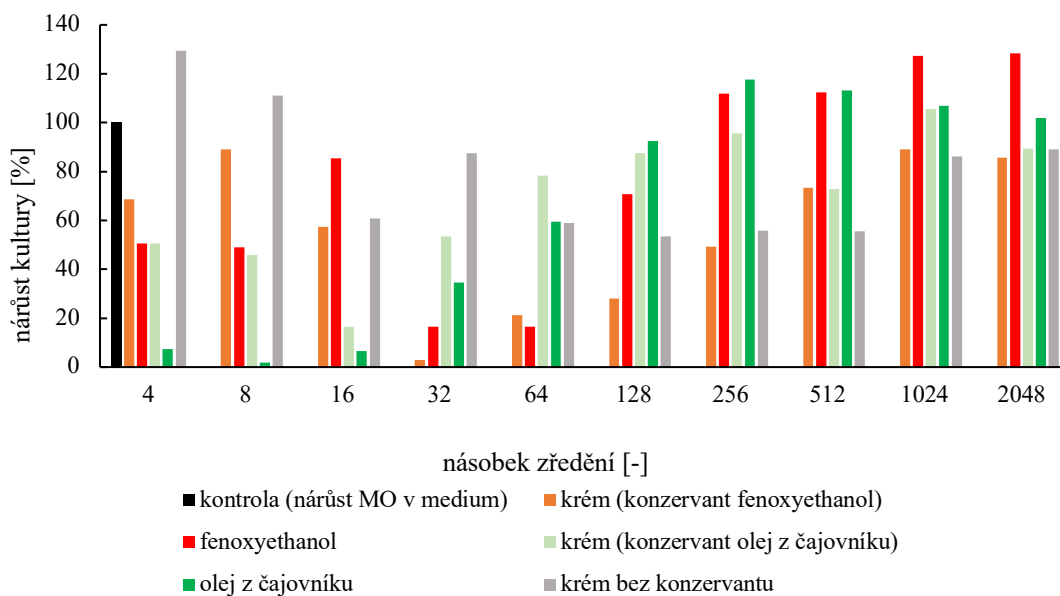
5.9 Antimikrobiální testy připravených krémů

V rámci antimikrobiálního testování vzorků hotových krémů byly použity 3 druhy krémů lišící se použitým typem konzervantu – analyzován byl vzorek krému se syntetickým konzervantem, přírodním a bez konzervantu. Antimikrobiální aktivita těchto vzorků je stejně jako u antimikrobiálních testů extraktů vyhodnocena jako procentuální nárůst mikroorganismů při použití vzorků proti kontrole, kterou představují mikroorganismy v čistém médiu. Nárůst samotných mikroorganismů v čistém médiu tak udává hodnotu 100 %. Pokud je procentuální nárůst menší než 100 %, látka vykazuje antimikrobiální aktivitu a inhibuje nárůst bakterie. Pokud je procentuální nárůst vyšší než 100 %, bakterie nejspíš určitým způsobem vzorek využívá k růstu. Aby bylo rozlišitelné, zda krém s konzervantem inhibuje nárůst bakterie lépe, nebo hůře, byly jako kontroly k jednotlivým vzorkům stejným způsobem otestovány samotné konzervanty. V případě krému s fenoxyethanolem sloužil jako kontrola fenoxyethanol, u krému s přírodním konzervantem sloužil jako kontrola olej z čajovníku. Vzhledem k tomu, že u krému bez

konzervantu nebyl použit žádný konzervant, sloužil jako kontrola tohoto vzorku pouze nárůst mikroorganismů v médiu.

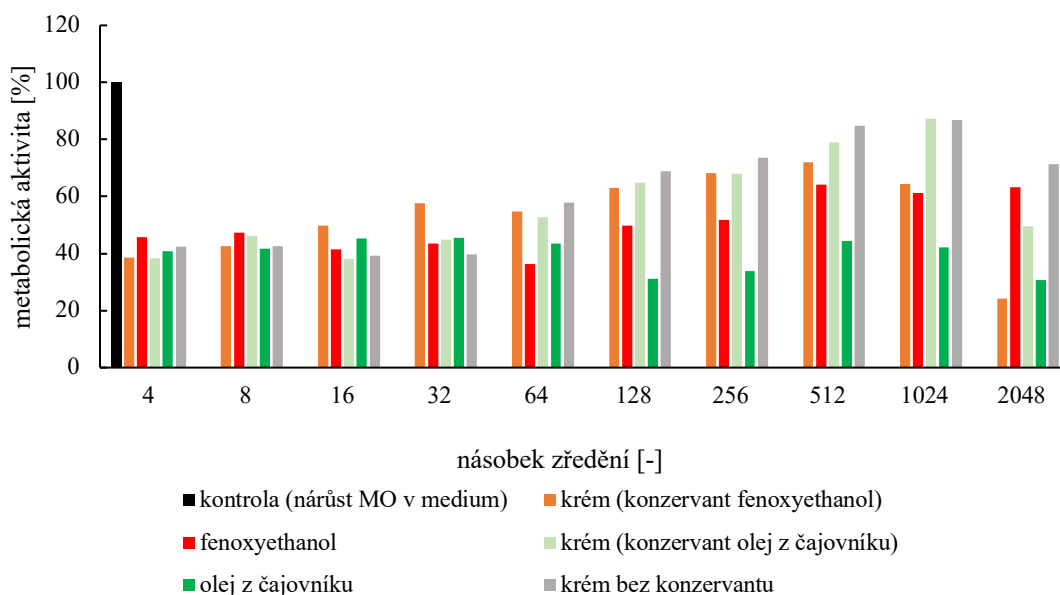
Metabolická aktivita byla hodnocena stejným způsobem jako u vzorků extraktů. Při vyhodnocování je srovnávána metabolická aktivita buněk za působení jednotlivých vzorků s metabolickou aktivitou buněk v čistém médiu.

5.9.1 Antimikrobiální testy krémů na bakterii *Staphylococcus epidermidis*



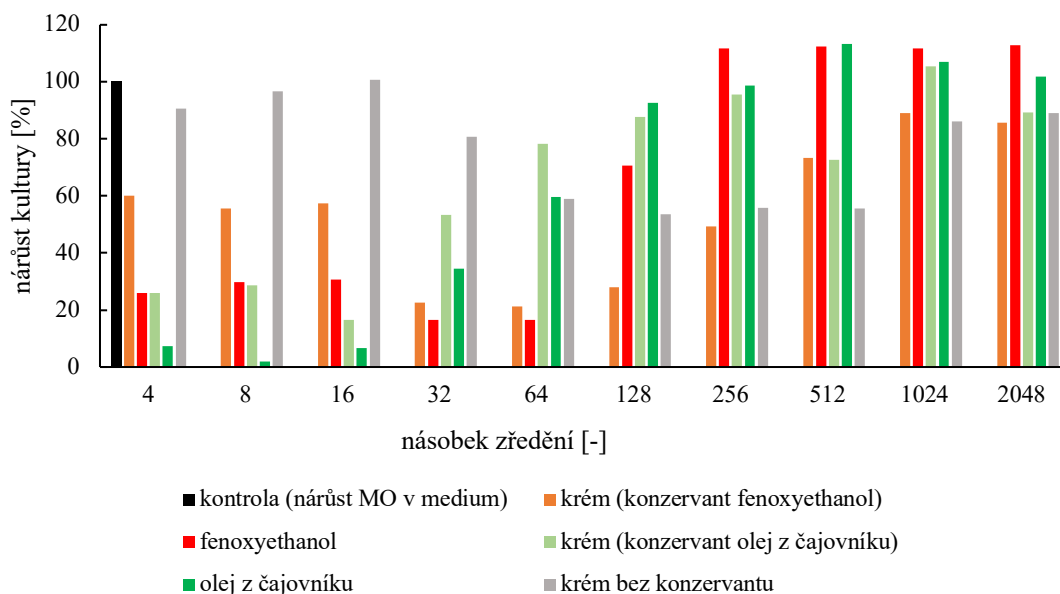
Obrázek 47 Graf závislosti nárůstu kultury na zředění krému s různými typy konzervantů a extrakty bez enkapsulace

V případě bakterie *Staphylococcus epidermidis* při nejnižších zředěních nejlépe antimikrobiálně funguje olej z čajovníku a jeho účinnost výrazně klesá při zředění vyšším než 64krát (Obr.47). Stejně jako u bakterie *E.coli*, i u této bakterie inhibuje krém s „tea tree“ olejem nárůst bakterie do zředění 512x. Jeho kontrola, tzn. samotný tea tree olej ale inhibuje nárůst pouze při zředění 256krát, z čehož lze usoudit pozitivní antimikrobiální roli přidaných přírodních extraktů. Naopak nejnižší antimikrobiální účinek prokázal vzorek krému bez konzervace. Zde byl nárůst již při nejnižším zředění přes 100 %. To mohlo být způsobeno tím, že v krému bez konzervantu není jiná konzervační látka, než přidané extrakty a základní složení krému obsahuje značné množství glykolů, které mohou mikroorganismy využívat jako zdroj uhlíku a živin.



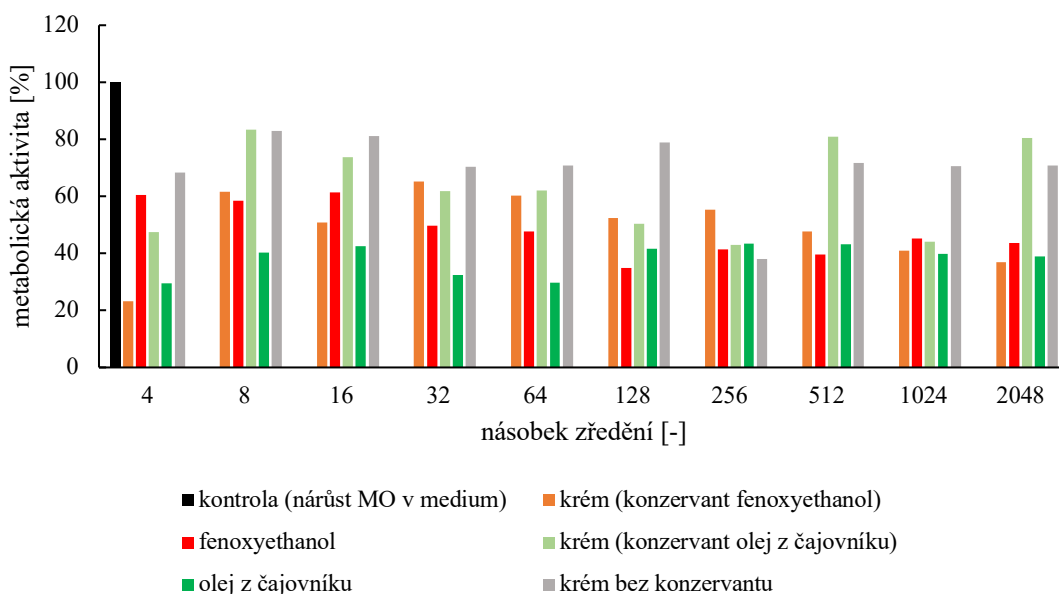
Obrázek 48 Graf závislosti metabolické aktivity buněk na zředění vzorku – resazurinový test/SE

Metabolická aktivita buněk bakterie *Staphylococcus epidermidis* byla nejlepší v případech přítomnosti vzorku krému bez konzervantu a krému s přírodním konzervantem (Obr.48). U žádného ze vzorků však metabolická aktivita bakterií nedosáhla viability buněk v čistém médiu (kontrola). Je vidět, že všechny druhy konzervace negativně ovlivnily buněčný metabolismus této bakterie.



Obrázek 49 Graf závislosti nárůstu kultury na zředění krému s různými typy konzervantů a enkapsulovanými extrakty

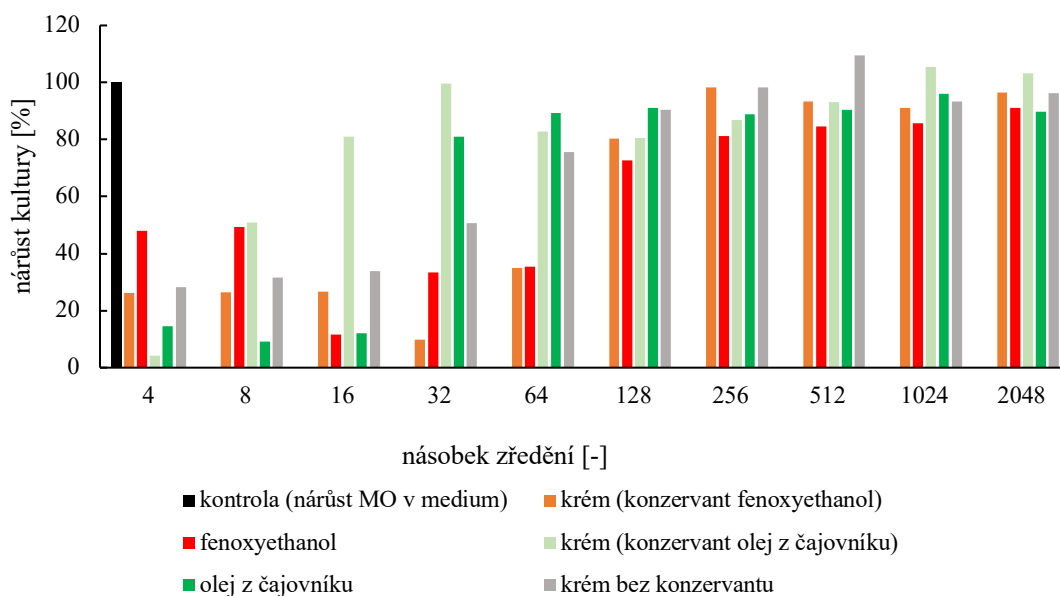
U enkapsulovaných extraktů došlo k nevyšší inhibici nárůstu mikroorganismů v případě oleje z čajovníku, který inhiboval nárůst bakterií až na 2%. Velmi dobrý výsledek vykázal i krém s přírodním konzervantem (Obr.49). Krém s tea tree olejem inhiboval při nejnižším zředění nárůst mikroorganismů na 25,86 % proti nárůstu kontroly, v případě zředění 16krát pak dokonce na 16,48 %. Nejhorší účinek inhibice nárůstu mikroorganismů byla pozorována v případě vzorku krému bez konzervantu. Tato skutečnost mohla být opět způsobena tím, že krém obsahuje značné množství glykolů, které jsou pro bakterie zdrojem uhlíku a mohou tak růst mikroorganismů naopak podporovat. Proto je použití konzervantu důležité.



Obrázek 50 Graf závislosti metabolické aktivity na násobku zředění u krému s enkapsulovanými extrakty – resazurinový test/SE

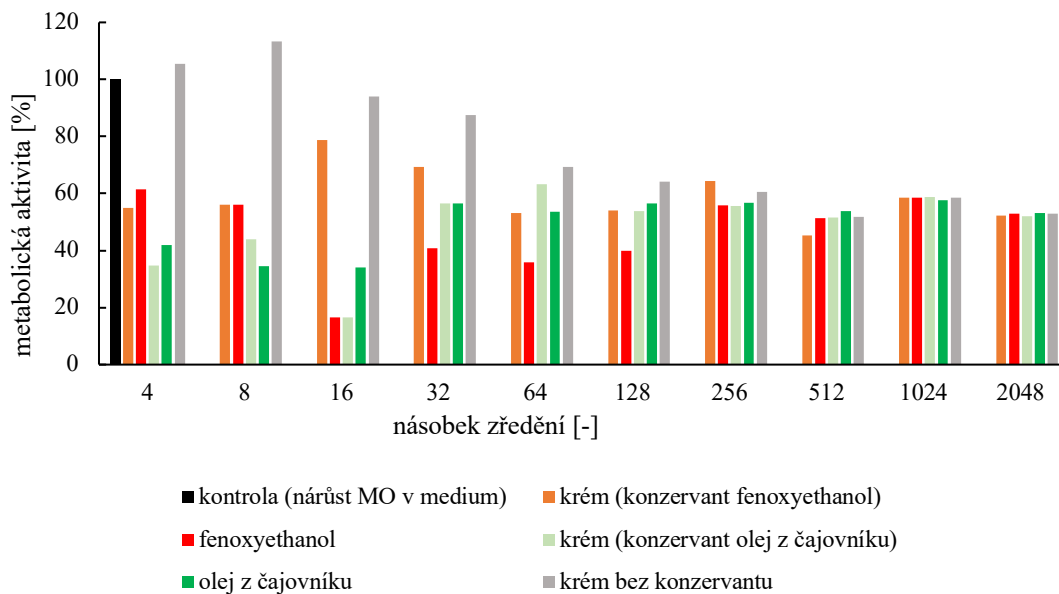
Metabolická aktivita bakterie *Staphylococcus epidermidis* byla stejně jako u vzorků krémů s neenkapsulovanými extrakty po 24 hodinách nejvyšší v případě vzorku krému bez konzervantu a s přírodním konzervantem. Nejnižší metabolickou aktivitu buňky vykázaly v případě, že na ně působil vzorek tea tree oleje a fenoxylethanolu. Ani v případě těchto vzorků metabolická aktivita nepřesáhla metabolickou aktivitu buněk v čistém médiu (Obr. 53).

5.9.2 Antimikrobiální testy krémů na bakterii *Escherichia coli*



Obrázek 51 Graf závislosti nárůstu kultury na zředění krému s různými typy konzervantů a extrakty bez enkapsulace

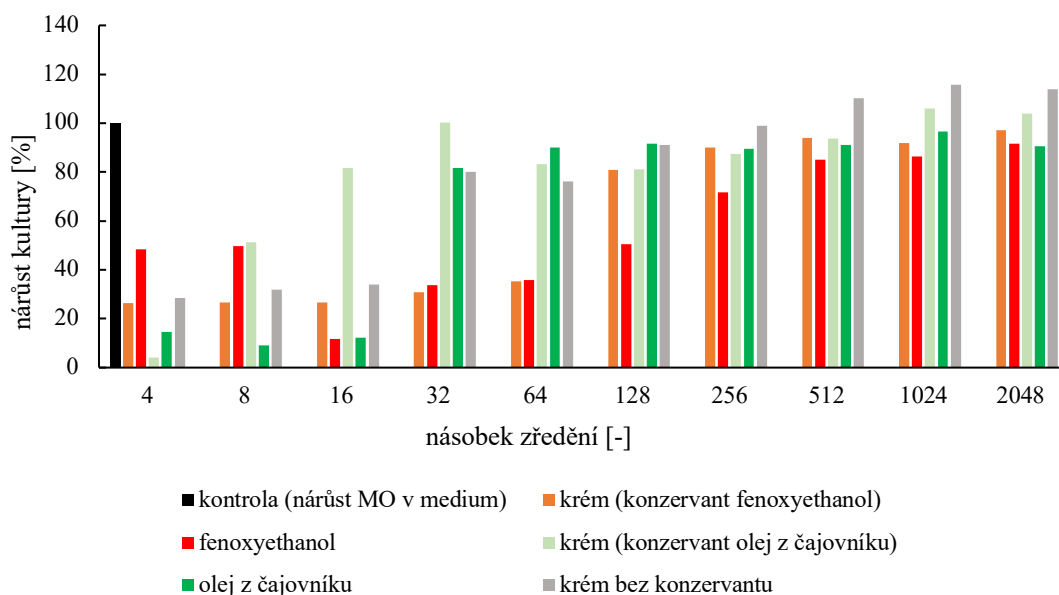
Z grafu (Obr. 54) je patrné, že nejlepšího výsledku v rámci antimikrobiální aktivity vykázal vzorek krému s přírodním konzervantem, tedy olejem z čajovníku (4,15 % při zředění 4krát). S rostoucím zředěním antimikrobiální účinek tohoto vzorku postupně klesá. Nárůst bakterie *E.coli* spolehlivě inhibuje také krém se syntetickým konzervantem, při zředění 4krát až na 26 % proti kontrole buněk v čistém médium. Při zředění větším než 64krát, nárůst skokově vzrůstá. Vzorek krému bez konzervantu byl schopen inhibovat nárůst bakterie při zředění až 256krát.



Obrázek 52 Graf závislosti metabolické aktivity buněk na zředění vzorku – resazurinový test EC

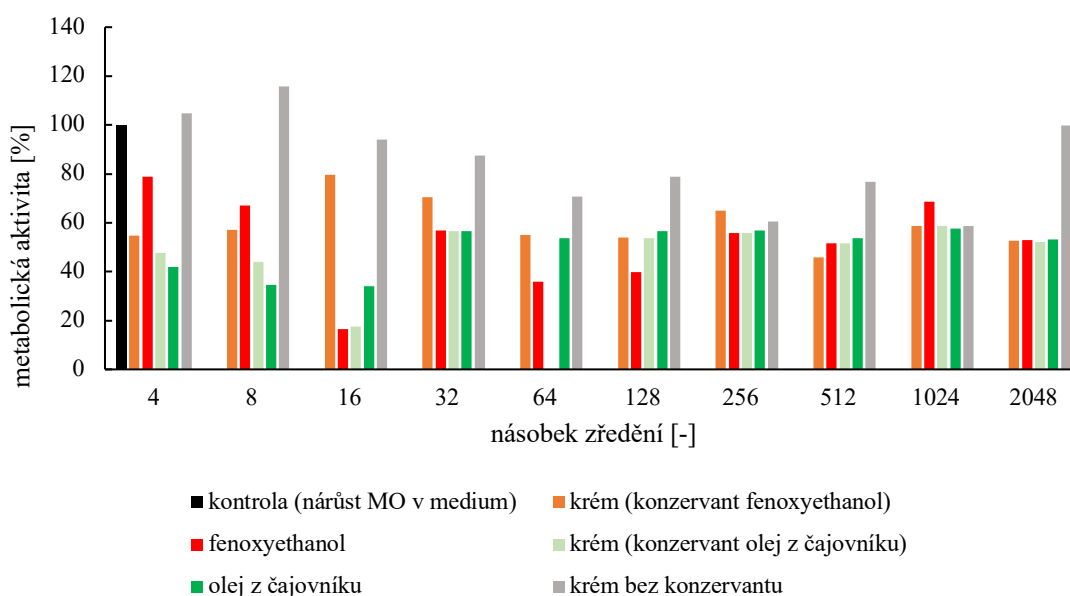
Z grafu (Obr.52) lze pozorovat, že nejvyšší metabolickou aktivitu vyvinuly bakterie při použití nekonzervovaného vzorku krému, a to přes 100 % při nejnižším zředění. Naopak nejnižší viabilitu mají buňky, na které působí syntetický konzervant fenoxylethanol, což se ukázalo i u bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Při nejnižším zředění byla velice dobře redukována metabolická aktivita i pomocí přírodního konzervantu tea tree oleje.

Tento olej má schopnost inhibovat respiraci bakterie *E.coli*, zvyšovat propustnost mikrobiálních membrán a tím ovlivňovat její metabolismus [110]



Obrázek 53 Graf závislosti nárůstu kultury na zředění krému s různými typy konzervantů a s enkapsulovanými extrakty

V případě krémů s enkapsulovanými extrakty vykázal nejlepší antimikrobiální aktivitu vzorek krému s tea tree olejem jako konzervantem, který antimikrobiálně účinkoval při nejnižším zředění lépe než jeho kontrola (Obr.53). Velmi dobrý výsledek měl v porovnání s kontrolou také krém bez konzervantu, který při nejnižším zředění inhiboval nárůst mikroorganismů na 29 %, což je velký rozdíl oproti kontrole samotných mikroorganismů. Z této skutečnosti lze dojít s závěru, že extrakty vykazují v rámci krému dobrý antimikrobiální výsledek.



Obrázek 54 Závislost metabolické aktivity buněk na násobku zředění u krému s enkapsulovanými extrakty – resazurinový test/ EC

V případě metabolické aktivity bakterie *E.coli* byla největší životaschopnost buněk v případě přítomnosti krému bez konzervantu (Obr.54). Tato skutečnost může být způsobena obsahem uhlíku ve složkách krému, které může bakterie využívat jako živiny. Nejnižší metabolická aktivita pak byla pozorována v případě vzorku krému s tea tree olejem. Zde se stejně jako v případě předchozího testu (Obr.52) opět ukázala schopnost tohoto přírodního oleje zasahovat do metabolismu bakterie *E.coli*.

Tabulka 15 Souhrnné výsledky antimikrobiálních testů krémů

MIC jednotlivých vzorků (násobek zředění krému)			
typ extraktu	složení vzorku	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
extrakty bez enkapsulace	krém (konzervant fenoxxyethanol)	2048x	2048x
	fenoxxyethanol	128x	2048x
	krém (konzervant olej z čajovníku)	512x	512x
	olej z čajovníku	128x	2048x
	krém bez konzervantu	-	256x
enkapsulované extrakty	krém (konzervant fenoxxyethanol)	2048x	2048x
	fenoxxyethanol	128x	2048x
	krém (konzervant olej z čajovníku)	512x	16x
	olej z čajovníku	256x	2048x
	krém bez konzervantu	8x	256x

Z výsledných údajů v lze v případě některých vzorků vidět antimikrobiální vliv přidaných přírodních extraktů (Tabulka 15). Například v případě bakterie *Staphylococcus epidermidis* je MIC výrazně vyšší u krému se syntetickým konzervantem a s extrakty bez enkapsulace (2048krát) než u samotného syntetického konzervantu (128krát). Stejně tak je tomu i u krémů s přírodním konzervantem u stejné bakterie. V případě bakterie *Escherichia coli* je MIC u krému s fenoxxyethanolem shodná s MIC fenoxxyethanolu. V případě krému bez konzervace lze dokázat možný účinek přírodních extraktů na mikrobiální růst *E.coli*.

Co se týče výsledků u krémů s enkapsulovanými extrakty, tak v některých případech tento trend pokračuje. U vzorku krému s fenoxxyethanolem byla inhibice v případě bakterie *Staphylococcus epidermidis* opět vyšší než u kontroly - samotného fenoxxyethanolu. Stejně tak je tomu i u přírodního konzervantu. U krému bez konzervace je hodnota MIC v případě *E.coli* vyšší (256x), než u bakterie *Staphylococcus epidermidis* (8x). V případě bakterie *E.coli* byla zaznamenána shodná MIC v případě krému se syntetickým konzervantem jako u jeho kontroly. U přírodního konzervantu byla MIC lepší v případě kontroly o 2 stupně zředění. Obecně lze tedy říci, že syntetický konzervant působil antimikrobiálně lépe vůči bakterii *E.coli*. Přírodní konzervant olej z čajovníku vykázal podle MIC (Tabulka 15) celkově lepší antimikrobiální výsledky vůči *E.coli*, než

vůči bakterii *Staphylococcus epidermidis*, což mohlo být způsobeno výrazným ovlivněním metabolismu *E.coli* a ovlivnění respirace buněk [110].

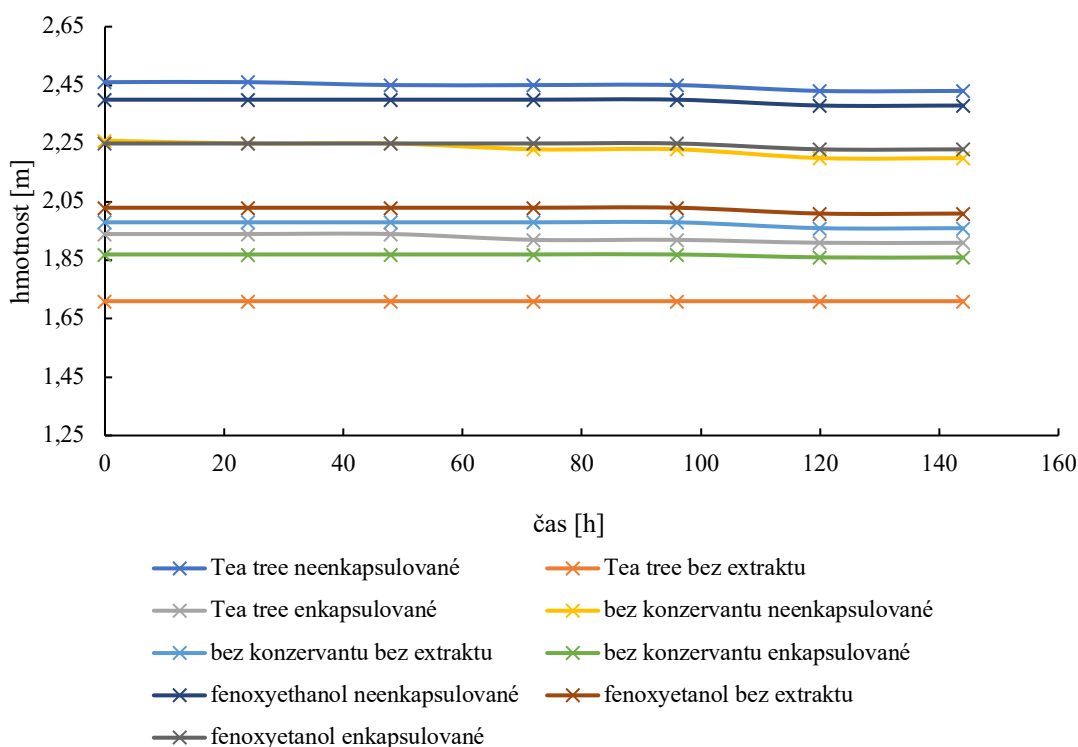
Co se týče rozdílu účinku enkapsulovaných extraktů a extraktů bez enkapsulace, tak rozdíl lze vidět v případě krému s přírodním konzervantem, když v případě enkapsulovaných extraktů je MIC vůči oběma bakteriím shodná. U krémů s extrakty bez enkapsulace je MIC v případě bakterie *E.coli* výrazně nižší. To by mohlo být způsobeno neuvolněním uzavřeného extraktu v částici.

5.10 Cyklický stabilitní test

Cyklický stabilitní test byl proveden postupem uvedeným v kapitole 4.16. Ze získaných naměřených hmotností po každé fázi byla sestavena závislost hmotnosti na čase. Pro lepší přehlednost byl sestaven samostatný graf pro vzorky z uzavřeném těsnícím obalu a v otevřeném obalu.

5.10.1 Cyklický test v uzavřeném obalu

V rámci testování stability přípravku pomocí cyklického testu byly jako uzavřený obal využity Eppendorf zkumavky, ve kterých se hmotnost vzorku držela na konstantních hodnotách s velice mírnými odchylkami v rámci desetiny gramu (Obr. 58).



Obrázek 55 Graf závislosti hmotnosti přípravku v Eppendorf zkumavce na čase

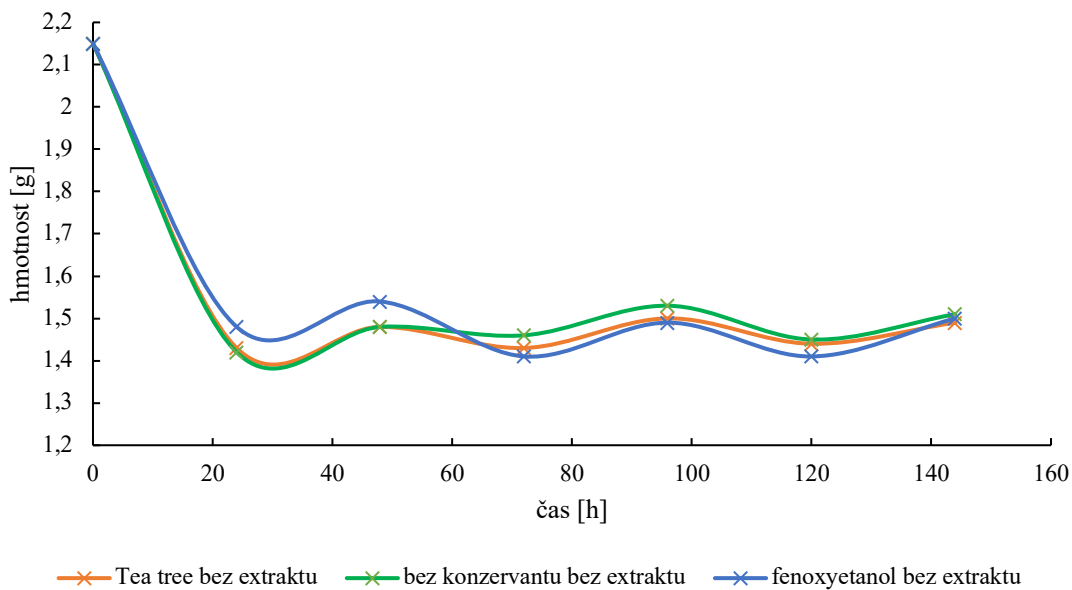
Spolu s pozorováním změny hmotnosti byly pozorovány také změny vzhledu přípravků po jednotlivých fázích, včetně výskytu kondenzátu (Tabulka 16). Přítomnost kondenzátu byla zaznamenána po 1.fázi pouze u vzorku krému konzervovaného fenoxyletanolem s extrakty bez enkapsulace. Tato skutečnost byla vzhledem k již dlouho neopakovanému jevu nejspíše způsobena špatným uzavřením Eppendorf zkumavky. Kondenzát se objevil následně po 5.fázi cyklu u některých vzorků, ale ve velmi nepatrném množství.

Tabulka 16 Záznam přítomnosti kondenzátu v Eppendorf zkumavkách

fáze	1.	2.	3.	4.	5.	6.
teplota	5°C	40°C	5°C	40°C	5°C	40°C
krém (fenoxyletanol) bez extraktů	x	x	x	x	✓	✓
krém(fenoxyletanol) bez enkapsulace	x	✓	x	x	x	✓
krém (fenoxyletanol) enkapsulace	x	x	x	x	x	✓
krém (olej z čajovníku) bez extraktů	x	x	x	x	x	x
krém (olej z čajovníku) bez enkapsulace	x	x	x	x	x	x
krém (olej z čajovníku) enkapsulace	x	x	x	x	x	✓
krém bez konzervantu a extraktů	x	x	x	x	✓	✓
krém bez konzervant bez enkapsulace	x	x	x	x	x	✓
krém bez konzervant enkapsulace	x	x	x	x	x	x

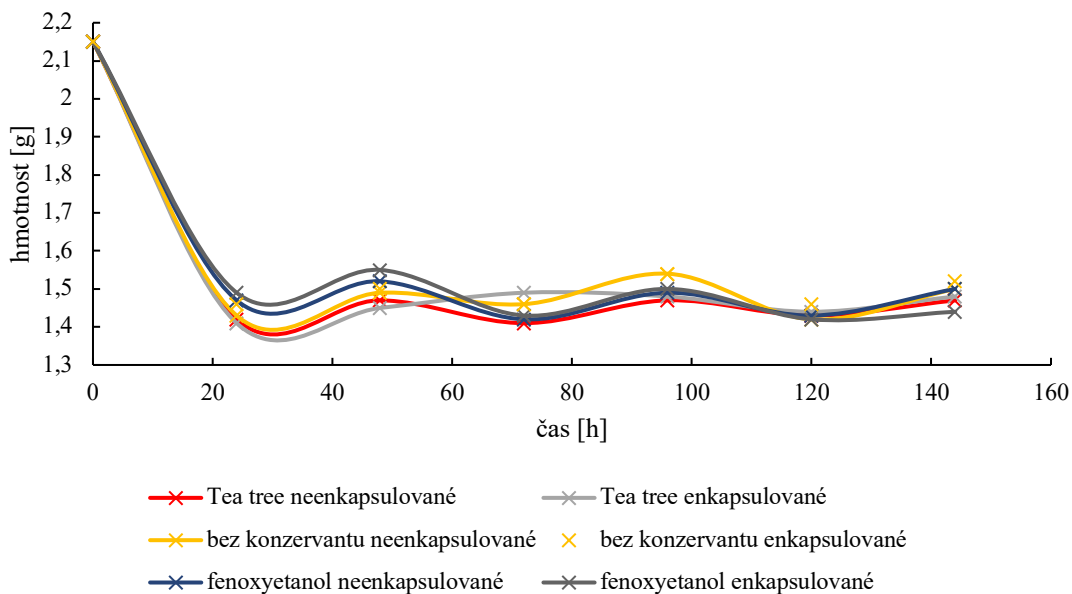
5.10.2 Cyklický test v otevřeném obalu

U cyklického testu v otevřeném obalu byl zaznamenán u všech vzorků největší úbytek hmotnosti v rámci 1.fáze cyklu důsledkem odpaření značné části vody ze vzorku. Následně hodnoty mírně kolísaly. Všechny vzorky se během testu chovaly velice podobně. Co se týče vzhledu vzorků v průběhu měření, tak u všech emulzí bylo zaznamenáno mírné zvýšení viskozity emulze v důsledku odpaření vody. Nedošlo však k separaci fází ani k jiným změnám vzhledu přípravků, což poukazuje na dobré emulgační schopnosti použitých emulgátorů. Výsledky stabilitního testu v otevřeném obalu byly z důvodu lepší přehlednosti křivek rozděleny do dvou grafů (Obr.56, Obr.57)



Obrázek 56 Graf závislosti hmotnosti na čase krému bez extraktů

Z grafu je patrný úbytek hmotnosti v 1.fázi měření pro všechny vzorky měření. Úbytek hmotnosti byl mírnější v případě vzorku krému s fenoxyethanolem jako konzervantem, který je v grafu vyznačen modře (Obr.56).



Obrázek 57 Graf závislosti hmotnosti na čase krému s extrakty

V případě vzorků krémů s extrakty došlo jak u enkapsulovaných, tak i u krémů s extrakty bez enkapsulace, k výraznému úbytku hmotnosti v 1. fázi cyklu (Obr.57).

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla analýza zajímavých přírodních extraktů a zjištění jejich potencionálně prospěšných účinků na kůži formou jejich zakomponování do kosmetického produktu. První část diplomové práce se zabývala analýzou jednotlivých látek ve vodných a ethanolových extraktech vzorků houby *Reishi*, Chaga, hřebíčku a kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Byla provedena analýza jejich antioxidační aktivity, obsahu fenolických látek, obsahu flavonoidů, obsahu lipofilních látek a jejich antimikrobiální aktivity.

Nejvyšší antioxidační aktivita byla změřena u vzorku ethanolového extraktu hřebíčku (7 mg/g). Tuhle vysokou hodnotu antioxidační účinnosti lze přisuzovat vysokému obsahu složky eugenol, což bylo následně potvrzeno analýzou pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Další poměrně vysoká antioxidační aktivita byla změřena u ethanolového extraktu houby Chaga (5,56mg/g). Ethanolový extrakt hřebíčku vykázal také nejvyšší obsah fenolických látek (19,41 mg/g) a flavonoidů (19,8 mg/g). V případě výsledků analýzy HPLC byly v několika vzorcích detekovány karotenoidy. Vysoký podíl karotenoidů obsahovala především kvasinka *Rhodotorula toruloides*. Mezi detekovanými karotenoidy byl například beta karoten, který mimo jiné pozitivní vlastnosti účinkuje i jako sluneční filtr a velmi dobře se tak doplňuje s ostatními antioxidanty. Detekovaných lipofilních látek bylo větší množství, než je uvedeno ve výsledcích předložené práce, tyto látky však vzhledem k nedostupnosti standardů nebyly hodnoceny. Analýza dalších lipofilních látek, zejména v medicínálních houbách je velice zajímavá a mohla by se například stát problematikou pro budoucí závěrečné práce.

V případě antimikrobiální účinnosti proti bakterii *Staphylococcus epidermidis* vykázal nejlepší výsledky ethanolový extrakt hřebíčku, kdy minimální inhibiční koncentrace tohoto vzorku byla při zředění extraktu 32x. Proti bakterii *E.coli* vykázal nejlepší antimikrobiální účinnost opět vzorek ethanolového extraktu z hřebíčku, kdy minimální inhibiční koncentrace extraktu byla při nejvyšším testovaném zředění (2048x). Stejněho výsledku dosáhl také ethanolový extrakt houby *Reishi* a kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Obecně byla zjištěna lepší antimikrobiální účinnost rostlinných extraktů vůči G- bakterii.

Další částí práce byla formulace krému z ingrediencí přírodního původu. Krém byl zformulován jako typ emulze olej ve vodě z vodné a olejové fáze, kdy vodná fáze obsahovala vodu, glykoly a přírodní polymer a olejová fáze následně oleje, emulgátory a antioxidační látku. Výsledný krém má lehkou texturu, která se dobře vstřebává a při nanášení vytváří příjemný film na kůži. Byla připravena řada tří krémů s rozdílným konzervantem - krém se syntetickým konzervantem, s přírodním konzervantem a bez konzervantu. Do krému byly následně přidány tři extrakty podle výsledků analýzy obsahových látek, a to ethanolový extrakt z hřebíčku, ethanolový extrakt z houby Chaga a vodný extrakt z kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Extrakty byly přidány v množství 1% ve formě bez enkapsulace a ve formě enkapsulované do liposomů, u kterých byla následně určena enkapsulační účinnost. Enkapsulační účinnost byla poměrně vysoká

u všech extraktů, nejvyšší hodnota byla zaznamenána u vodného extraktu *Reishi* (95,55%).

Liposomy byly podrobeny charakterizaci pomocí metody dynamického rozptylu světla, kde byla změřena jejich velikost. Výsledky velikosti částic u všech měřených vzorků byly v rozmezí, které se běžně využívá na enkapsulaci aktivních látek v kosmetice. Po přidání těchto extraktů v obou formách (enkapsulované a bez enkapsulace) byly krémy s extrakty podrobeny testu antioxidační aktivity a antimikrobiálním testům na G- a G+ bakteriích, včetně resazurinového testu viability kultur. Nakonec byla ověřena stabilita všech krémů pomocí cyklického stabilitního testu realizovaného pomocí změn teplot v cyklech po 24 hodinách. V rámci stabilitního testu nebyly zjištěny žádné znepokojivé výsledky a emulze nevykazovaly žádné známky separace fází nebo změny struktury.

Z výsledků práce lze konstatovat, že testované extrakty obsahují látky, které mohou být v kosmetickém průmyslu velice prospěšné a pomocí lipozomálních částic o optimální velikosti je lze tak i dopravit do hlubších vrstev kůže. Zejména látky s antioxidační aktivitou jsou v poslední době jednou z nejvíce vyhledávaných skupin v kosmetických přípravcích. V kombinaci s využitím medicínálních hub se tak jeví jako ideální složka například houba Chaga, která vykazovala velice dobré antioxidační vlastnosti. Medicínální houby nebyly v kosmetice doposud příliš využívány, ale na základě výsledků této diplomové práce by v budoucnu mohly sloužit jako poměrně dobře dostupný zdroj mnoha aktivních látek a alespoň částečně tak nahradit synteticky vyráběné ingredience.

7 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] A History of Cosmetics from Ancient Times. Online. Dostupné z: <https://www.cosmeticsinfo.org/get-the-facts/a-history-of-cosmetics-from-ancient-times/>. [cit. 2023-04-11].
- [2] JAIN, NK a CHAUDHRI, SK. History of cosmetics. Online. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009, roč. 3, č. 3. ISSN 0973-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-8398.56292>. [cit. 2023-04-11].
- [3] ALIBARDI, Lorenzo. Adaptation to the land: The skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes. Online. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2003, roč. 298B, č. 1, s. 12-41. ISSN 1552-5007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jez.b.24>. [cit. 2024-01-08].
- [4] ASHCROFT, Gillian S.; GREENWELL-WILD, Teresa; HORAN, Michael A.; WAHL, Sharon M. a FERGUSON, Mark W.J. Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. Online. *The American Journal of Pathology*. 1999, roč. 155, č. 4, s. 1137-1146. ISSN
- [5] LIM, Kyung-Min. Skin Epidermis and Barrier Function. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22063035>. [cit. 2023-10-03].
- [6] PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M. a JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. Online. *Experimental Dermatology*. 2008, roč. 17, č. 12, s. 1063-1072. ISSN 09066705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>. [cit. 2023-10-03].
- [7] MARTÍNEK, Jindřich a VACEK, Zdeněk. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [8] LIM, Kyung-Min. Skin Epidermis and Barrier Function. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22063035>. [cit. 2023-04-11].
- [9] GUNNARSSON, Maria; MOJUMDAR, Enamul Haque; TOPGAARD, Daniel a SPARR, Emma. Extraction of natural moisturizing factor from the stratum corneum and its implication on skin molecular mobility. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021, roč. 604, s. 480-491. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.07.012>. [cit. 2024-01-08].
- [10] KANWAR, AJ. Skin barrier function. Online. *Indian Journal of Medical Research*. 2018, roč. 147, č. 1. ISSN 0971-5916. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.232013>. [cit. 2023-04-11].

methods for the determination. Online. *Pharmaceutical Methods*. 2012, roč. 3, č. 2, s. 68-72. ISSN 22294708. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2229-4708.103875>. [cit. 2024-04-28].

[11] CHRISTOPHERS, Enno. Cellular Architecture of the Stratum Corneum. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 1971, roč. 56, č. 3, s. 165-169. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260765>. [cit. 2024-01-08].

[12] PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M. a JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. Online. *Experimental Dermatology*. 2008, roč. 17, č. 12, s. 1063-1072. ISSN 09066705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>. [cit. 2023-10-03].

[13] Regulace kosmetických výrobků vs. léčivé výrobky. Online. 2019, s. 10. Dostupné z: <https://www.pravniprostor.cz/clanky/ostatni-pravo/regulace-kosmetickykh-vyrobku-vs-lecive-vyrobky>. [cit. 2023-10-03].

[14] HOJEROVÁ, Jarmila a BOSKOVIČOVÁ, Eva. *Kozmetika - zdravie - krása: odhalené tajomstvá*. Bratislava: Metro Media, 2009. ISBN 978-80-89327-02-7.

[15] HUEBER, F.; SCHAEFER, H. a WEPIERRE, J. Role of Transepidermal and Transfollicular Routes in Percutaneous Absorption of Steroids: In vitro Studies on Human Skin. Online. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2004, roč. 7, č. 5, s. 237-244. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000211300>. [cit. 2023-10-03].

[16] HU, Xueqing a HE, Huaming. A review of cosmetic skin delivery. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021, roč. 20, č. 7, s. 2020-2030. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.14037>. [cit. 2024-01-08].

[17] KIM, Byel; CHO, Hang-Eui; MOON, Sun He; AHN, Hyun-Jung; BAE, Seunghee et al. Transdermal delivery systems in cosmetics. Online. *Biomedical Dermatology*. 2020, roč. 4, č. 1. ISSN 2398-8460. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>. [cit. 2024-01-08].

[18] WIECHERS, J. W.; WATKINSON, A. C.; CROSS, S. E. a ROBERTS, M. S. Predicting skin penetration of actives from complex cosmetic formulations: an evaluation of inter formulation and inter active effects during formulation optimization for transdermal delivery. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2012, roč. 34, č. 6, s. 525-535. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12001>. [cit. 2024-01-08].

[19] PRAUSNITZ, Mark R a LANGER, Robert. Transdermal drug delivery. Online. *Nature Biotechnology*. 2008, roč. 26, č. 11, s. 1261-1268. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>. [cit. 2023-10-03].

[20] MCMULLEN, Roger L. a DELL'ACQUA, Giorgio. History of Natural Ingredients in Cosmetics. Online. *Cosmetics*. 2023, roč. 10, č. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10030071>. [cit. 2024-01-05].

- [21] LEE, Jongsung a HYUN, Chang-Gu. Natural Products for Cosmetic Applications. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28020534>. [cit. 2024-01-05].
- [22] LIU, Ji-Kai. Natural products in cosmetics. Online. *Natural Products and Bioprospecting*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2192-2195. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00363-y>. [cit. 2023-10-03].
- [23] FONSECA-SANTOS, Bruno; CORRÊA, Marcos Antonio a CHORILLI, Marlus. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. Online. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, roč. 51, č. 1, s. 17-26. ISSN 1984-8250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000100002>. [cit. 2023-10-03].
- [24] FONSECA-SANTOS, Bruno; CORRÊA, Marcos Antonio a CHORILLI, Marlus. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. Online. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, roč. 51, č. 1, s. 17-26. ISSN 1984-8250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000100002>. [cit. 2024-01-05].
- [25] LEE, Jongsung a HYUN, Chang-Gu. Natural Products for Cosmetic Applications. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28020534>. [cit. 2023-10-03].
- [26] LEAL-CALDERON, Fernando; SCHMITT, Veronique a BIBETTE, Jerome. *Emulsion science*. 2nd ed. New York: Springer, 2007. ISBN 978-2-224-03142-8.
- [27] MCCLEMENTS, David Julian a GUMUS, Cansu Ekin. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016, roč. 234, s. 3-26. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>. [cit. 2023-05-22].
- [28] MCCLEMENTS, David Julian. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007, roč. 47, č. 7, s. 611-649. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>. [cit. 2024-01-08].
- [29] LEONG, T.S.H.; WOOSTER, T.J.; KENTISH, S.E. a ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. Online. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009, roč. 16, č. 6, s. 721-727. ISSN 13504177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.008>. [cit. 2023-10-04].
- [30] MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y. Le; PICCERELLE, P. a KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, roč. 289, č. 1-2, s. 117-131. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.10.020>. [cit. 2024-01-08].

- [31] YAQOOB KHAN, Azhar; TALEGAONKAR, Sushama; IQBAL, Zeenat; JALEES AHMED, Farhan a KRISHAN KHAR, Roop. Multiple Emulsions: An Overview. Online. *Current Drug Delivery*. 2006, roč. 3, č. 4, s. 429-443. ISSN 15672018. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/156720106778559056>. [cit. 2023-10-04].
- [32] Emulsions: making oil and water mix. Online. Dostupné z: <https://www.aocs.org/stay-informed/inform-magazine/featured-articles/emulsions-making-oil-and-water-mix-april-2014?SSO=True>. [cit. 2023-10-04].
- [33] LOI, Chia Chun; EYRES, Graham T. a BIRCH, E. John. Effect of mono- and diglycerides on physical properties and stability of a protein-stabilised oil-in-water emulsion. Online. *Journal of Food Engineering*. 2019, roč. 240, s. 56-64. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.016>. [cit. 2024-01-08].
- [34] HAZT, Bianca; PEREIRA PARCHEN, Gabriela; FERNANDA MARTINS DO AMARAL, Lilian; RONDON GALLINA, Patrícia; MARTIN, Sandra et al. Unconventional and conventional Pickering emulsions: Perspectives and challenges in skin applications. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, roč. 636. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122817>. [cit. 2024-01-08].
- [35] BERTSCH, Pascal; STEINGOETTER, Andreas; ARNOLD, Myrtha; SCHEUBLE, Nathalie; BERGFREUND, Jotam et al. Lipid emulsion interfacial design modulates human in vivo digestion and satiation hormone response. Online. 2022, roč. 13, č. 17, s. 9010-9020. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D2FO01247B>. [cit. 2023-10-09].
- [36] SANTAMARIA-ECHART, Arantzazu; P. FERNANDES, Isabel; C. SILVA, Samara; C. REZENDE, Stephany; COLUCCI, Giovana et al. New Trends in Natural Emulsifiers and Emulsion Technology for the Food Industry. Online. *Natural Food Additives*. 2022. ISBN 978-1-83968-959-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99892>. [cit. 2024-01-08].
- [37] MCCLEMENTS, David Julian; BAI, Long a CHUNG, Cheryl. Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. Online. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2017, roč. 8, č. 1, s. 205-236. ISSN 1941-1413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030154>. [cit. 2024-01-08].
- [38] SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. Online. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1981, roč. 58, č. 10, s. 889-892. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02659652>. [cit. 2024-01-08].
- [39] RIEHM, David A.; ROKKE, David J.; PAUL, Prakash G.; LEE, Han Seung; VIZANKO, Brent S. et al. Dispersion of oil into water using lecithin-Tween 80 blends: The role of spontaneous emulsification. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017, roč. 487, s. 52-59. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.010>. [cit. 2024-01-08].

00029440. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65217-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65217-0). [cit. 2024-01-08].

[40] TIDWELL, H.C. a DUNKELBERG, Carolyn. Effect of an Exogenous Emulsifier on the Absorption of Cholesterol and Mineral Oil. Online. *Gastroenterology*. 1957, roč. 33, č. 4, s. 601-604. ISSN 00165085. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(19\)35710-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(19)35710-5). [cit. 2024-01-09].

[41] Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Online. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/14356007>. [cit. 2024-01-08].

[42] RALSTON, A. W. a HOERR, C. W. THE SOLUBILITIES OF THE NORMAL SATURATED FATTY ACIDS. Online. *The Journal of Organic Chemistry*. 1942, roč. 07, č. 6, s. 546-555. ISSN 0022-3263. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jo01200a013>. [cit. 2024-01-09].

[43] BEARE-ROGERS, J. L.; DIEFFENBACHER, A. a HOLM, J. V. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). Online. *Pure and Applied Chemistry*. 2001, roč. 73, č. 4, s. 685-744. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/pac200173040685>. [cit. 2024-01-09].

[44] AVERILL, H. P.; ROCHE, J. N. a KING, C. G. SYNTHETIC GLYCERIDES. I. PREPARATION AND MELTING POINTS OF GLYCERIDES OF KNOWN CONSTITUTION 1. Online. *Journal of the American Chemical Society*. 1929, roč. 51, č. 3, s. 866-872. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja01378a032>. [cit. 2024-01-09].

[45] MORTENSEN, Alicja; AGUILAR, Fernando; CREBELLI, Riccardo; DI DOMENICO, Alessandro; FRUTOS, Maria Jose et al. Re-evaluation of acacia gum (E 414) as a food additive. Online. *EFSA Journal*. 2017, roč. 15, č. 4. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4741>. [cit. 2024-01-09].

[46] Solvents in cosmetics. Online. Dostupné z: <https://skinactives.com/blog/what-you-need-to-know-about-solvents-in-skincare/>. [cit. 2024-01-09].

[47] LU, Y. Humectancies of d -tagatose and d -sorbitol. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2001, roč. 23, č. 3, s. 175-181. ISSN 01425463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2001.00084.x>. [cit. 2023-10-10].

[48] WAVIKAR, Preeti a VAVIA, Pradeep. Nanolipidgel for Enhanced Skin Deposition and Improved Antifungal Activity. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2013, roč. 14, č. 1, s. 222-233. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9908-y>. [cit. 2023-10-10].

[49] Emollients. Online. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/23305-emollients>. [cit. 2024-01-08].

- [50] KOUASSI, Marie-Carole; GRISEL, Michel a GORE, Ecaterina. Multifunctional active ingredient-based delivery systems for skincare formulations: A review. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022, roč. 217. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112676>. [cit. 2024-01-09].
- [51] HALLA, Noureddine; FERNANDES, Isabel; HELENO, Sandrina; COSTA, Patrícia; BOUCHERIT-OTMANI, Zahia et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. Online. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>. [cit. 2024-01-09].
- [52] HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert; HEITMAN, Joseph a JAMES, Timothy Y. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. Online. *Microbiology Spectrum*. 2017, roč. 5, č. 4. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>. [cit. 2023-10-16].
- [53] BENGTON, Stefan; RASMUSSEN, Birger; IVARSSON, Magnus; MUHLING, Janet; BROMAN, Curt et al. Fungus-like mycelial fossils in 2.4-billion-year-old vesicular basalt. Online. 2017, roč. 1, č. 6. ISSN 2397-334X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0141>. [cit. 2023-10-16].
- [54] MAY, Tom W.; REDHEAD, Scott A.; BENSCH, Konstanze; HAWKSWORTH, David L.; LENDEMER, James et al. Chapter F of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants as approved by the 11th International Mycological Congress, San Juan, Puerto Rico, July 2018. Online. *IMA Fungus*. 2019, roč. 10, č. 1. ISSN 2210-6359. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0019-1>. [cit. 2024-01-09].
- [55] YANG, Ying; YANG, Ence; AN, Zhiqiang a LIU, Xingzhong. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, roč. 104, č. 20, s. 8379-8384. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0702770104>. [cit. 2024-01-09].
- [56] GALINDO, Luis Javier; LÓPEZ-GARCÍA, Purificación; TORRUELLA, Guifré; KARPOV, Sergey a MOREIRA, David. Phylogenomics of a new fungal phylum reveals multiple waves of reductive evolution across Holomycota. Online. *Nature Communications*. 2021, roč. 12, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25308-w>. [cit. 2024-01-09].
- [57] WASSER, Solomon P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. Online. *Biomedical Journal*. 2014, roč. 37, č. 6. ISSN 2319-4170. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2319-4170.138318>. [cit. 2023-10-16].
- [58] MIYAMOTO, Ichiko; LIU, Jie; SHIMIZU, Kuniyoshi; SATO, Masao; KUKITA, Akiko et al. Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2009, roč. 602, č. 1, s. 1-7. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.11.005>. [cit. 2023-10-16].

- [59] DINI, Irene a LANERI, Sonia. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 13. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>. [cit. 2023-10-16].
- [60] ZIEMLEWSKA, Aleksandra; WÓJCIAK, Magdalena; MROZIAK-LAL, Kamila; ZAGÓRSKA-DZIOK, Martyna; BUJAK, Tomasz et al. Assessment of Cosmetic Properties and Safety of Use of Model Washing Gels with Reishi, Maitake and Lion's Mane Extracts. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27165090>. [cit. 2023-10-16].
- [61] NOWAKOWSKI, Patryk; MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, Renata; BIELECKA, Joanna; MIELCAREK, Konrad; GRABIA, Monika et al. Treasures from the forest: Evaluation of mushroom extracts as anti-cancer agents. Online. 2021, roč. 143. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112106>. [cit. 2023-10-16].
- [62] SLIVA, Daniel. Ganoderma Lucidum(Reishi) in Cancer Treatment. Online. *Integrative Cancer Therapies*. 2003, roč. 2, č. 4, s. 358-364. ISSN 1534-7354. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1534735403259066>. [cit. 2024-04-27].
- [63] YUE, Q.-X.; SONG, X.-Y.; MA, C.; FENG, L.-X.; GUAN, S.-H. et al. Effects of triterpenes from Ganoderma lucidum on protein expression profile of HeLa cells. Online. *Phytomedicine*. 2010, roč. 17, č. 8-9, s. 606-613. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.013>. [cit. 2024-04-27].
- [64] SOCHA, Radomír. *Encyklopedie léčivých hub*. 2014. Praha. ISBN 978-80-200-2312-4.
- [65] EID, Jehane Ibrahim; AL-TUWAIJRI, Majdah Mohammad; MOHANTY, Swabhimani a DAS, Biswadeep. Chaga mushroom (Inonotus obliquus) polysaccharides exhibit genoprotective effects in UVB-exposed embryonic zebrafish (Danio rerio) through coordinated expression of DNA repair genes. Online. *Heliyon*. 2021, roč. 7, č. 2. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06003>. [cit. 2023-10-17].
- [66] ARATA, Satoru; WATANABE, Jun; MAEDA, Masako; YAMAMOTO, Masato; MATSUHASHI, Hideto et al. Continuous intake of the Chaga mushroom (Inonotus obliquus) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice. Online. *Heliyon*. 2016, roč. 2, č. 5. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00111>. [cit. 2023-10-17].
- [67] Chaga Mushroom. Online. Dostupné z: <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/chaga-mushroom>. [cit. 2023-10-17].
- [68] EID, Jehane Ibrahim a DAS, Biswadeep. Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to Chaga (Inonotus obliquus) mushroom polysaccharides in zebrafish (Danio rerio). Online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64157-3>. [cit. 2024-01-09].

- [69] PARK, Yoo Kyoung; LEE, Hyang Burm; JEON, Eun-Jae; JUNG, Hack Sung a KANG, Myung-Hee. Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in human lymphocytes as assessed by comet assay. Online. *BioFactors*. 2004, roč. 21, č. 1-4, s. 109-112. ISSN 0951-6433. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/biof.552210120>. [cit. 2024-04-27].
- [70] HU, Yang; SHENG, Yi; YU, Min; LI, Koukou; REN, Guangming et al. Antioxidant activity of Inonotus obliquus polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, roč. 87, s. 348-356. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.006>. [cit. 2023-10-17].
- [71] ZHENG, Weifa; ZHAO, Yanxia; ZHANG, Meimei; WEI, Zhiwen; MIAO, Kangjie et al. Oxidative stress response of Inonotus obliquus induced by hydrogen peroxide. Online. *Medical Mycology*. 2009, roč. 47, č. 8, s. 814-823. ISSN 1369-3786. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/13693780802653933>. [cit. 2023-10-17].
- [72] YAN, Zheng-Fei; YANG, Yang; TIAN, Feng-Hua; MAO, Xin-Xin; LI, Yu et al. Inhibitory and Acceleratory Effects of Inonotus obliquus on Tyrosinase Activity and Melanin Formation in B16 Melanoma Cells. Online. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, roč. 2014, s. 1-11. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/259836>. [cit. 2023-10-17].
- [73] LI, Yonghong; ZHAO, Zongbao (Kent) a BAI, Fengwu. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Online. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, roč. 41, č. 3, s. 312-317. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>. [cit. 2024-01-11].
- [74] FEI, Qiang; O'BRIEN, Marykate; NELSON, Robert; CHEN, Xiaowen; LOWELL, Andrew et al. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. Online. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, roč. 9, č. 1. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0542-x>. [cit. 2024-01-11].
- [75] KIM, Junyeob; LEE, Eun-Jung; LEE, Kyung-Eun; NHO, Youn-Hwa; RYU, Jeoungjin et al. Lipid extract derived from newly isolated *Rhodotorula toruloides* LAB-07 for cosmetic applications. Online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023, roč. 21, s. 2009-2017. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.018>. [cit. 2024-01-11].
- [76] KONG, Rong; CUI, Yilei; FISHER, Gary J.; WANG, Xiaojuan; CHEN, Yinbei et al. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2016, roč. 15, č. 1, s. 49-57. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12193>. [cit. 2024-01-11].

- [77] RAWLINGS, A. V. a HARDING, C. R. Moisturization and skin barrier function. Online. *Dermatologic Therapy*. 2004, roč. 17, č. s1, s. 43-48. ISSN 1396-0296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x>. [cit. 2024-01-11].
- [78] EL-SABER BATIHA, Gaber; ALKAZMI, Luay M.; WASEF, Lamiaa G.; BESHISHY, Amany Magdy; NADWA, Eman H. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. Online. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 2. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom10020202>. [cit. 2023-10-18].
- [79] SENSCH, Oliver; VIERLING, Wolfgang; BRANDT, Wolfgang a REITER, Melchior. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. Online. *British Journal of Pharmacology*. 2000, roč. 131, č. 6, s. 1089-1096. ISSN 0007-1188. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703673>. [cit. 2024-04-27].
- [80] SHARMA, Himadri; KIM, Dan Yeong; SHIM, Kyu Hwan; SHARMA, Niti a AN, Seong Soo A. Multi-Targeting Neuroprotective Effects of *Syzygium aromaticum* Bud Extracts and Their Key Phytochemicals against Neurodegenerative Diseases. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 9. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24098148>. [cit. 2024-04-27].
- [81] XUE, Qing; XIANG, Zedong; WANG, Shengguang; CONG, Zhufeng; GAO, Peng et al. Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). Online. *Frontiers in Nutrition*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1002147>. [cit. 2023-10-18].
- [82] HARO-GONZÁLEZ, José Nabor; CASTILLO-HERRERA, Gustavo Adolfo; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, Moisés a ESPINOSA-ANDREWS, Hugo. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 21. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>. [cit. 2023-10-18].
- [83] MAMTA; MISRA, Kshipra; DHILLON, Gurpreet Singh; BRAR, Satinder Kaur a VERMA, Mausam. Antioxidants. Online. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. 2014, s. 117-138. ISBN 978-1-4614-8004-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_6. [cit. 2023-10-23].
- [84] PANGRAZZI, Luca; BALASCO, Luigi a BOZZI, Yuri. Natural Antioxidants: A Novel Therapeutic Approach to Autism Spectrum Disorders? Online. *Antioxidants*. 2020, roč. 9, č. 12. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9121186>. [cit. 2023-10-23].
- [85] SCOTT, Kevin A.; COX, Philip B. a NJARDARSON, Jon T. Phenols in Pharmaceuticals: Analysis of a Recurring Motif. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*.

2022, roč. 65, č. 10, s. 7044-7072. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00223>. [cit. 2024-01-09].

[86] BERTELLI, Alberto; BIAGI, Marco; CORSINI, Maddalena; BAINI, Giulia; CAPPELLUCCI, Giorgio et al. Polyphenols: From Theory to Practice. Online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10112595>. [cit. 2023-10-23].

[87] TRESSERRA-RIMBAU, Anna; LAMUELA-RAVENTOS, Rosa M. a MORENO, Juan J. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. Online. *Biochemical Pharmacology*. 2018, roč. 156, s. 186-195. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.050>. [cit. 2023-10-23].

[88] CORY, Hannah; PASSARELLI, Simone; SZETO, John; TAMEZ, Martha a MATTEI, Josiemer. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. Online. *Frontiers in Nutrition*. 2018, roč. 5. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>. [cit. 2023-10-23].

[89] PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. Online. *Journal of Natural Products*. 2000, roč. 63, č. 7, s. 1035-1042. ISSN 0163-3864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/np9904509>. [cit. 2023-11-27].

[90] PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D. a CHANDRA, S. R. Flavonoids. Online. *Journal of Nutritional Science*. 2016, roč. 5, s. 300. ISSN 2048-6790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>. [cit. 2023-11-27].

[91] FERNANDES, P. a CABRAL, J.M.S. Phytosterols: Applications and recovery methods. Online. *Bioresource Technology*. 2007, roč. 98, č. 12, s. 2335-2350. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>. [cit. 2023-11-15].

[92] Sterols in skincare. Online. Dostupné z: <https://www.paulaschoice.com/ingredient-dictionary/ingredient-phytosterols.html>. [cit. 2024-01-09].

[93] MOSTAFA, Wedad Z. a HEGAZY, Rehab A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship. Online. *Journal of Advanced Research*. 2015, roč. 6, č. 6, s. 793-804. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011>. [cit. 2023-11-15].

[94] MUKHERJEE, Siddharth; DATE, Abhijit; PATRAVALE, Vandana; KORTING, Hans Christian; ROEDER, Alexander et al. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. Online. *Clinical Interventions in Aging*. 2006, roč. 1, č. 4, s. 327-348. ISSN 1176-9092. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/ciia.2006.1.4.327>. [cit. 2023-11-15].

[95] ZASADA, Malwina a BUDZISZ, Elżbieta. Retinoids: active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. Online. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2019, roč. 36, č. 4, s. 392-397. ISSN 1642-395X. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/ada.2019.87443>. [cit. 2023-11-15].

- [96] Vitamin D3. Online. Dostupné z: <https://dermaviduals.de/english/publications/special-actives/vitamins-in-cosmetics.html>. [cit. 2023-11-15].
- [97] Spectrofotometry. Online. Dostupné z: <https://www.nist.gov/programs-projects/spectrophotometry>. [cit. 2024-01-09].
- [98] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [99] CHU, B. Laser Light Scattering. Online. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1970, roč. 21, č. 1, s. 145-174. ISSN 0066-426X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.21.100170.001045>. [cit. 2024-04-02].
- [100] PECORA, R. Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions. Online. *The Journal of Chemical Physics*. 1964, roč. 40, č. 6, s. 1604-1614. ISSN 0021-9606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.1725368>. [cit. 2024-04-02].
- [101] DE VOS, Paul; FAAS, Marijke M.; SPASOJEVIC, Milica a SIKKEMA, Jan. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Online. *International Dairy Journal*. 2010, roč. 20, č. 4, s. 292-302. ISSN 09586946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>. [cit. 2024-01-24].
- [102] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia Food Science*. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>. [cit. 2024-01-24].
- [103] NAKHAEI, Pooria; MARGIANA, Ria; BOKOV, Dmitry O.; ABDELBASSET, Walid Kamal; JADIDI KOUHBANANI, Mohammad Amin et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>. [cit. 2024-01-24].
- [104] NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Heliyon*. 2022, roč. 8, č. 5. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>. [cit. 2024-01-24].
- [105] DESAI, Kashappa Goud H. a JIN PARK, Hyun. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Online. *Drying Technology*. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>. [cit. 2024-01-24].
- [106] EL-SABER BATIHA, Gaber; ALKAZMI, Luay M.; WASEF, Lamiaa G.; BESHBIŠHY, Amany Magdy; NADWA, Eman H. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and

Toxicological Activities. Online. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 2. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom10020202>. [cit. 2024-04-28].

[107] DHOLE, Seema M.; AMNERKAR, Nikhil D. a KHEDEKAR, Pramod B. Comparison of UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography

[108] BARTOLOMÉ, Alejandra; RODRÍGUEZ-MORO, Gema; FUENTES, Juan-Luis; LOPES, Mariana; FRONTELA, Juana et al. Biodegradation of a Complex Phenolic Industrial Stream by Bacterial Strains Isolated from Industrial Wastewaters. Online. *Processes*. 2021, roč. 9, č. 11. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr9111964>. [cit. 2024-04-29].

[109] CHEN, Inês. Yeast as budding stem cells? Online. 2009, roč. 16, č. 4, s. 351-351. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nsmb0409-351>. [cit. 2024-04-27].

[110] COX, Sean; MANN, Cindy; MARKHAM, Julie; GUSTAFSON, John; WARMINGTON, John et al. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. Online. *Molecules*. 2001, roč. 6, č. 12, s. 87-91. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/60100087>. [cit. 2024-04-28].

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CI – Colour Index

DLS – Dynamický Light Scattering

E.coli – *Escherichia coli*

FDA – Food and Drug Administration

GMS – Glycerol Monostearát

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients

IOP - *Inonotus obliquus* polysaccharide

KTJ – Kolonie Tvořící Jednotky

MF – Mobilní Fáze

MIC – Minimal Inhibition Concentration

NMF – Natural Moisturizing Factors

ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity

O/V – Olej ve odě

PBS – Phosphate Buffer Solution

PTFE – Polytetrafluorethylen

ROS – Reactive Oxygen Species

RT – *Rhodotorula toruloides*

SE – *Staphylococcus epidermidis*

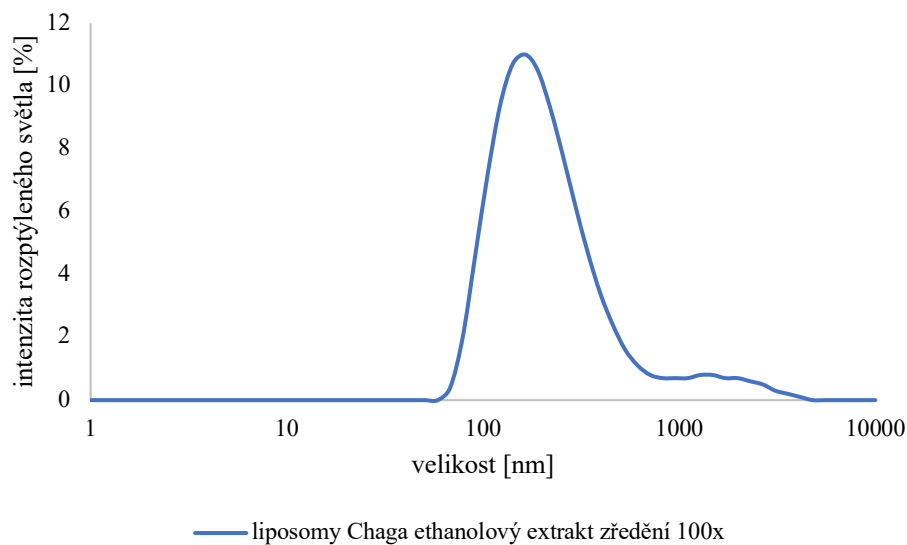
SF – Stacionární Fáze

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

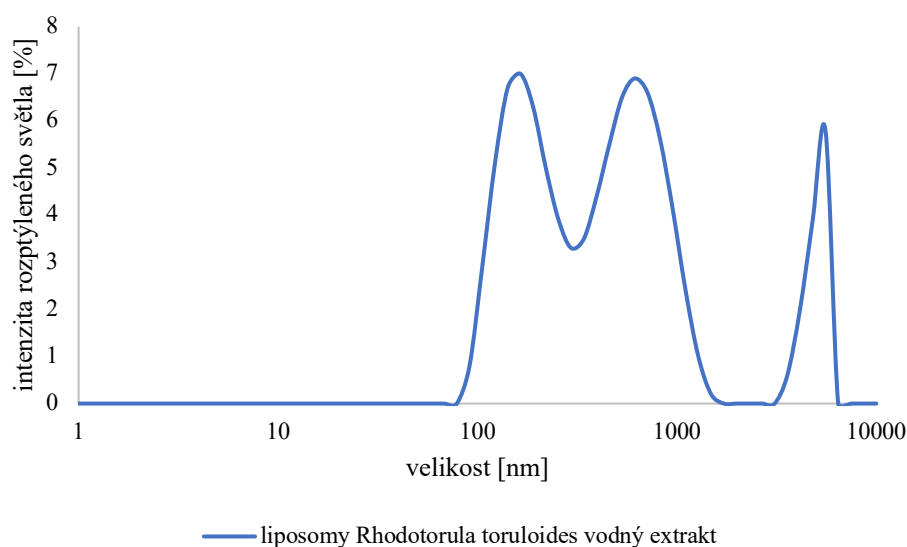
TEWL – Trans Epidermal Water Loss

V/O – Voda v oleji

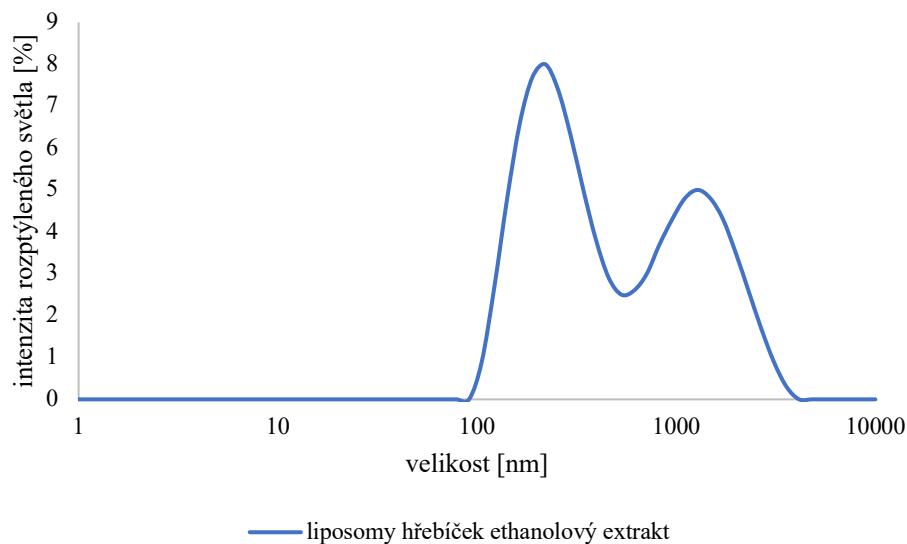
9 PŘÍLOHA 1



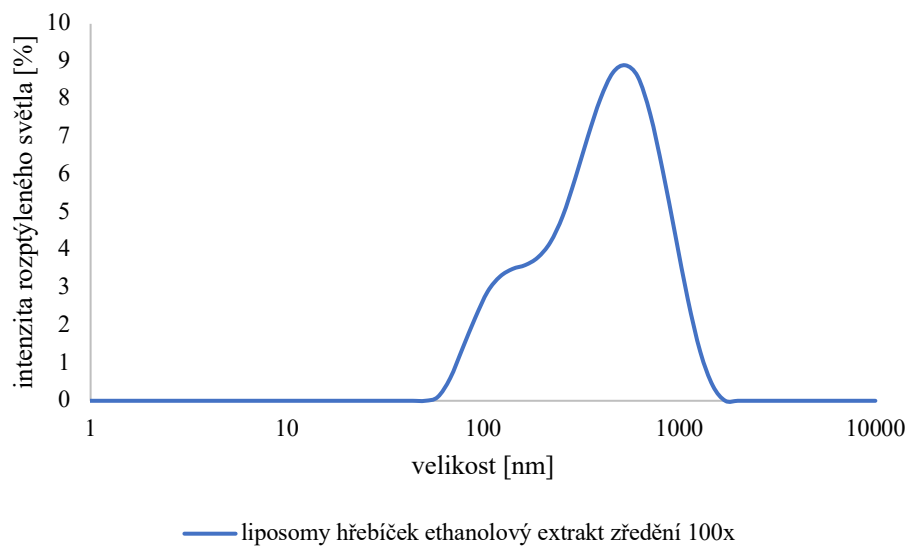
Obrázek 58 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek Chaga: ethanolový extrakt 100x zředěný



Obrázek 59 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek: Rhodotorula toruloides vodný extrakt



Obrázek 60 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek: ethanolový extrakt hřebíčku



Obrázek 61 Distribuční křivka velikostí liposomů na základě intenzity rozptýleného světla pro vzorek: ethanolový extrakt hřebíčku zředěný