



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

STUDIUM STABILITY ANTIMIKROBIÁLNÍCH

NANOMATERIÁLŮ V RŮZNÉM PROSTŘEDÍ POMOCÍ
KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

STUDY OF STABILITY OF ANTIMICROBIAL NANOMATERIALS IN DIFFERENT ENVIRONMENT BY HPLC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

Bc. Šárka Janderová

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

SUPERVISOR

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1931/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Šárka Janderová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Studium stability antimikrobiálních nanomateriálů v různém prostředí pomocí kapalinové chromatografie

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Literární rešerše zaměřená na nanomateriály, jejich přípravu a charakterizaci, stabilitu, postupné uvolňování aktivních látek a instrumentální metody (HPLC)
- 2) Příprava nanomateriálů (částice a vlákna) z přírodních polymerů s enkapsulovanou aktivní antimikrobiální složkou
- 3) Optimalizace metody pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek z materiálů do různých modelových prostředí
- 4) Srovnání stability nosičových materiálů a použitelnosti funkcionalizovaných nanostruktur

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. Šárka Janderová

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

Tato diplomová práce se zabývá přípravou nanomateriálů (nanočástice, nanovlákná) s enkapsulovanou aktivní látkou a stabilitou těchto nanomateriálů v různém prostředí pomocí kapalinové chromatografie. Vývoj a optimalizace metod pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek z nanomateriálů do různých prostředí představuje klíčovou roli pro výzkum zaměřený na jejich využití ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu a přispívá i k rozvoji nových antimikrobiálních nanomateriálů omezujících antibiotickou rezistenci.

Teoretická část je zaměřená na charakterizaci nanomateriálů (nanočástice, liposomy, nanovlákná a kombinované nanomateriály). Další část literární rešerše se věnuje přírodním (eugenol, karvakrol, kurkumin, tymol, vitamin E) a syntetickým (ampicilin, streptomycin) antimikrobiálním látkám. Poslední kapitola se zabývá použitými instrumentálními metodami, které slouží k charakterizaci nanomateriálů a hodnocení jejich stability, uvolněných a degradačních produktů.

V praktické části byla nejprve sledována antioxidační aktivita vybraných látek. Byly připraveny liposomy, u kterých byla zkoumána stabilita a enkapsulační účinnost. Byla optimalizovaná HPLC metoda stanovení aktivních látek. Dále bylo sledováno postupné uvolňování uvedených aktivních látek z připravených liposomů. Pomocí forcespinningu byla připravena nanovlákná, u nichž bylo analyzováno také uvolňování do vybraných modelových prostředí. Jako modelové prostředí sloužila destilovaná voda s minimálním obsahem iontů a nečistot, dále fyziologický roztok při teplotě 25 °C, který má simulovat teplotu povrchu lidského těla a fyziologický roztok při teplotě 37 °C, která je charakteristická pro teplotu lidského těla. Tato analýza poskytuje ucelený pohled na chování připravených materiálů a jejich potenciální využití v praxi.

V poslední části byly připravené kombinované nanomateriály (na bázi nanovláken a nanočástic) s enkapsulovanou aktivní látkou. U těchto nanomateriálů bylo zkoumáno postupné uvolňování aktivních látek a případný synergický účinek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanomateriály, nanočástice, nanovlákná, liposomy, polyhydroxybutyrát, stabilita, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

This thesis deals with the preparation of nanomaterials (nanoparticles, nanofibers) with encapsulated active substances and the stability of these nanomaterials in different environments using liquid chromatography. The development and optimization of methods for monitoring the kinetics of release of encapsulated substances from nanomaterials into various environments play a key role in research aimed at their utilization in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries, and also contribute to the development of new antimicrobial nanomaterials limiting antibiotic resistance.

The theoretical part focuses on the characterization of nanomaterials (nanoparticles, liposomes, nanofibers, and combined nanomaterials). Another section of the literature review deals with natural (eugenol, carvacrol, curcumin, thymol, vitamin E) and synthetic (ampicillin, streptomycin) antimicrobial substances. The final chapter discusses the instrumental methods used for the characterization of nanomaterials and the evaluation of their stability, released, and degradation products.

In the practical part, the antioxidant activity of selected substances was first monitored. Liposomes were prepared, and their stability and encapsulation efficiency were examined. An HPLC method for determining active substances was optimized. Subsequently, the gradual release of the mentioned active substances from prepared liposomes was monitored. Nanofibers were prepared using forcespinning, and their release into selected model environments was also analyzed. Distilled water with minimal ion and impurity content served as a model environment, as well as a physiological solution at 25°C, simulating the temperature of the human body surface, and a physiological solution at 37°C, characteristic of human body temperature. This analysis provides a comprehensive view of the behavior of prepared materials and their potential practical applications.

In the final section, combined nanomaterials (based on nanofibers and nanoparticles) with encapsulated active substances were prepared. The gradual release of active substances and any potential synergistic effects were examined for these nanomaterials.

KEY WORDS

Nanomaterials, nanoparticles, nanofibers, liposomes, polyhydroxybutyrate, stability, high-performance liquid chromatography

JANDEROVÁ, Šárka. *Studium stability antimikrobiálních nanomateriálů v různém prostředí pomocí kapalinové chromatografie* [online]. Brno, 2024 [cit. 2023-11-11]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/157001>. 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

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu a pod jejím vedením. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Lucii Dzurické za poskytnuté rady, ochotu a čas strávený v laboratoři. Jako poslední bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Nanomateriály	10
2.1.1	Klasifikace nanomateriálů	10
2.1.2	Využití nanomateriálů v kosmetickém a lékařském průmyslu	11
2.2	Nanočástice.....	11
2.2.1	Liposomy.....	12
2.2.2	Složky liposomů.....	12
2.2.3	Klasifikace liposomů.....	13
2.2.4	Příprava nanočástic typu liposomů	13
2.2.5	Charakterizace připravených nanočástic s aktivní látkou	14
2.2.6	Enkapsulace.....	15
2.3	Nanovlákná.....	16
2.3.1	Materiály pro přípravu nanovláken	16
2.3.2	Metody pro přípravu nanovláken	17
2.4	Kombinované nanomateriály na bázi nanočástic a nanovláken	19
2.5	Synergický účinek antimikrobiálních látek	20
2.6	Antioxidační účinek.....	20
2.7	Antibiotika	21
2.8	Přírodní látky s antioxidační aktivitou a antimikrobiálním účinkem	23
2.8.1	Eugenol.....	23
2.8.2	Karvakrol.....	24
2.8.3	Kurkumin	24
2.8.4	Tymol	25
2.8.5	Vitamin E	26
2.9	Systémy pro postupné uvolňování aktivních látek	26
2.10	Instrumentální metody využívané při analýze nanostruktur a jejich vlastností.....	26
2.10.1	Dynamický rozptyl světla.....	27
2.10.2	UV/VIS spektrometrie.....	27
2.10.3	Chromatografie.....	27
2.10.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	28

3	CÍLE PRÁCE.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Použité chemikálie.....	31
4.1.1	Chemikálie použité na charakterizaci aktivních látek.....	31
4.1.2	Použité chemikálie na přípravu nanočástic	31
4.1.3	Vybrané aktivní látky	31
4.2	Přístroje a pomůcky	31
4.3	Stanovení antioxidační aktivity vybraných látek.....	32
4.4	Příprava částic.....	32
4.4.1	Příprava roztoku polyhydroxybutyrátu	32
4.4.2	Příprava liposomů	33
4.4.3	Příprava liposomů s polyhydroxybutyrátem	33
4.5	Charakterizace částic	33
4.5.1	Stanovení stability	33
4.5.2	Spektrofotometrické stanovení enkapsulační aktivity.....	34
4.5.3	Enkapsulační účinnost.....	34
4.5.4	Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z připravených liposomů	37
4.6	Příprava nanovláken pomocí odstředivého zvlákňování.....	37
4.7	Charakterizace nanovláken.....	38
4.7.1	Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanovláken	38
4.8	Příprava kombinovaných nanomateriálů	38
4.8.1	Sledování morfologie připravených kombinovaných nanomateriálů	39
4.8.2	Stanovení množství účinné látky v kombinovaných nanomateriálech	39
4.8.3	Postupné uvolňování aktivních látek z kombinovaných nanomateriálů	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	Stanovení antioxidační aktivity	40
5.1.1	Antioxidační aktivita vybraných látek	41
5.2	Optimalizace metody pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek....	41
5.3	Charakterizace připravených částic	42
5.3.1	Stanovení stability částic.....	42
5.3.2	Enkapsulační účinnost.....	46
5.3.3	Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanočástic.....	47

5.4	Charakterizace připravených nanovláken.....	49
5.4.1	Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanovláken	49
5.5	Charakterizace připravených kombinovaných nanomateriálů	54
5.5.1	Vazba liposomů s přídavkem polyhydroxybutyrátu na PHB nanovlákná	54
5.5.2	Stanovené množství účinné látky enkapsulované v částicích	55
5.5.3	Postupné uvolňování aktivních látek z kombinovaných nanomateriálů	55
5.5.4	Stabilita připravených antimikrobiálních nanomateriálů a jejich aplikace	59
6	ZÁVĚR	61
7	POUŽITÁ LITERATURA	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72

1 ÚVOD

Nanomateriály jsou typické tím, že alespoň jeden jejich rozměr je menší než 100 nanometrů. Jejich mimořádné vlastnosti z nich dělají atraktivní perspektivu pro širokou škálu aplikací, včetně lékařství.

V lékařství se stále více prohlubuje problém rezistence k různým druhům antibiotik. Antibiotická rezistence je schopnost bakterií, které umí odolávat účinkům antimikrobiální léčby, což vede ke snížení její účinnosti. V posledních letech se rozvíjejí v rámci nových druhů léčby rovněž inovované antimikrobiální nanomateriály, které se staly předmětem pro intenzivní výzkum i v oblasti biotechnologií. Jejich schopnost potlačovat růst mikroorganismů a inhibovat šíření infekcí z nich dělá cenné nástroje v boji proti bakteriálním a virovým patogenům. Tyto materiály mají mnoho výhod, patří mezi ně vysoká povrchová reaktivita, která umožňuje účinnější interakci s mikroorganismy a možnost různých modifikací povrchu, díky čemuž mohou zlepšit jejich biokompatibilitu a stabilitu. Jejich potenciál v oblasti biomedicíny, potravinářství a dalších odvětví je značný, ale pro jejich úspěšné použití je zásadní porozumět jejich účinkům a stabilitě v různých prostředích.

Sledování stability a postupného uvolňování aktivních látek enkapsulovaných v nanomateriálech hraje důležitou roli při pochopení funkce a potenciální aplikace těchto materiálů. Zajišťuje to minimalizování rizika nežádoucích změn, a je to klíčové pro zajištění dlouhodobé spolehlivosti pro různé aplikace, například v lékařství. Vytváření kombinovaných nanomateriálů a zajištění synergie antimikrobiálních látek je důležité pro předcházení vzniku rezistence.

Tato diplomová práce se zabývá přípravou nanomateriálů a zkoumáním jejich stability pomocí kapalinové chromatografie. Tato metoda je klíčovou analytickou technikou, která umožňuje detailní charakterizaci látek v roztocích. Její využití ve spojení s analýzou stability nanomateriálů poskytuje důležité informace o jejich chování v různých prostředích, což má zásadní význam pro jejich praktické využití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanomateriály

Nanomateriály představují zajímavou skupinu materiálů s širokým spektrem praktických aplikací. Jsou charakterizovány svou velikostí v rozmezí nanometrů. Mohou být organické, anorganické nebo organokovové, jejich vlastnosti fyzikální, tak i chemické se mění v závislosti na velikosti a tvaru. V současné době nacházejí nanomateriály komerční uplatnění v povrchových nátěrech, elektronice, kosmetice a sportovním vybavení. Nanomateriály lze klasifikovat podle velikosti a rozměrů. Podle těchto parametrů je dělíme na tzv. nulové, jednorozměrné a vícerozměrné. Nanomateriály s nulovým rozměrem mají všechny rozměry v nanoměřítku, nejčastěji se jedná o částice. Nanomateriály, které mají jediný rozměr v makroměřítku a zbývající dva rozměry v nanoměřítku, jsou označovány jako jednorozměrné. Druhou kategorií jsou vícerozměrné nanomateriály, zahrnující dvourozměrné a třírozměrné varianty, které se vyznačují tím, že nejméně dva rozměry přesahují nanoměřítko [1][2].

2.1.1 Klasifikace nanomateriálů

Podle původu rozdělujeme nanomateriály do dvou hlavních skupin, konkrétně na přírodní a umělé. Přírodní nanomateriály zahrnují různé formy nacházející se v přírodě, jako jsou viry, proteiny, minerály a přírodní koloidy. Na druhé straně jsou umělé nanomateriály, které zahrnují vytvořené struktury, jako jsou uhlíkové nanotrubičky a polovodičové nanočástice. Tato skupina nanomateriálů je vyráběná podle přesných mechanických a výrobních postupů [3].

Další klasifikace nanomateriálů je podle povahy složek. Podle tohoto kritéria se dělí na fyzikální a chemické. Na základě této klasifikace lze nanomateriály rozdělit na kovové nanomateriály a slitiny. Kovové nanočástice jsou složeny z čistých kovových prekurzorů. Dalším typem jsou nanomateriály na bázi oxidů kovů. Oxidy kovů vykazují široký rozsah krystalinity a vazby kov-kyslík, přičemž tyto vazby mohou sahát od téměř iontových až po kovalentní. Oxidy kovů mají vynikající optické, elektrické a magnetické vlastnosti. Příkladem je oxid titaničitý a oxid zinečnatý. Další třídou jsou polovodičové nanočástice. Tento typ kombinuje vlastnosti kovů a nekovů. Jsou složeny z různých sloučenin, příklady zahrnují oxid zinečnatý, sulfid zinečnatý, sulfid kademnatý a selenid kademnatý. Následujícím typem jsou nanosilikáty. Jsou to anorganické dvourozměrné materiály. Častým využívaným silikátem je jíel, který představuje křemičitan hořečnato-hlinitý. Další skupinou jsou keramické nanočástice, které jsou anorganické a tepelně odolné. Keramické nanostruktury slouží k aplikacím v oblastech biomedicíny. Posledním typem jsou kompozitní nanomateriály, které představují kombinaci nanočástic s jinými nanočásticemi nebo nanočástic s materiály většího rozměru, jako jsou nanovlákná. Tyto nanomateriály jsou již využívány k posílení mechanických, tepelných a nehořlavých vlastností v širokém spektru výrobků, od autodílů po obalové materiály [3][4].

2.1.2 Využití nanomateriálů v kosmetickém a lékařském průmyslu

Nanotechnologie má v posledních letech rozsáhlé uplatnění rovněž v medicíně. Některé nanočástice mají možné využití v cílených léčivých přípravcích, farmaceutických produktech, biomedicínských implantátech a tkáňovém inženýrství. V současné době jsou nanotechnologie využívány v oblasti diagnostiky, především pro přesné a rychlé identifikace onemocnění. Nanotechnologie má potenciál změnit diagnostiku ve zdravotnictví tím, že zvýší přesnost, citlivost a rychlost lékařských testů. Nanočástice jsou používány k dodávání léčiv na specifická místa. Cílené dodávání léků minimalizuje farmaceutické náklady a terapeutické výdaje jsou sníženy, což snižuje náklady na zdravotní péči pro pacienty. Díky využití nanostruktur jsou v současné době umožněny terapeutické aplikace mnoha léků s omezenou permeabilitou, které nelze podávat orálně. Dalším využitím v medicíně je použití v moderní kardiologii, kde nanomateriály umožňují objev nových možností a zdokonalení léčby složitých kardiovaskulárních onemocnění. Použití nanomateriálů, jako jsou mikrovlákná z grafitu může usnadnit ukládání minerálních usazenin obsahujících vápník na protézy. Vzhledem k těmto výsledkům představují nový směr výzkumu, který by mohl zvýšit přilnavost implantátu ke tkáním kosti. To pomůže zvýšit efektivitu umělých kloubů u pacientů. Díky své malé velikosti mohou nanočástice být mimořádně užitečné při léčbě karcinomu. Částice, zejména ty používané v detekci, mohou být výjimečně užitečné v onkologickém výzkumu díky svým malým rozměrům. V současné době umožňují pokroky v oblasti nanotechnologií aplikovat toxické léčebné postupy, jako jsou například chemoterapeutické protirakovinné látky, s větší mírou bezpečnosti a efektivitu. Byly dokumentovány situace, kdy nanomateriály umožnily provádět diagnostické analýzy, které by jinak byly prakticky nemožné [5][6].

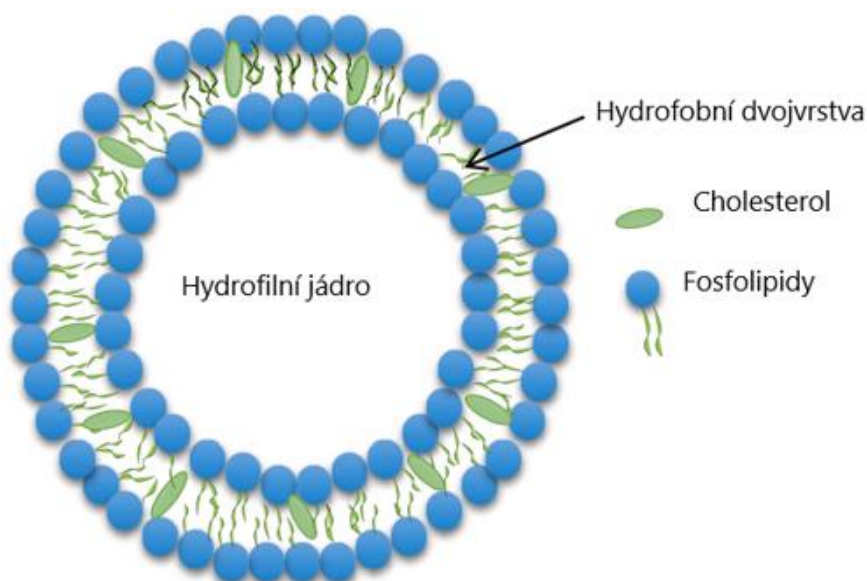
Nanomateriály patří do skupiny materiálů, které si získaly velkou pozornost díky významným specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Jejich výhodou je vysoká povrchová plocha, což umožňuje efektivnější transport složek skrz kůži a zlepšuje biologickou dostupnost, což nachází uplatnění v kosmetickém průmyslu. V dnešní době jsou nanomateriály nejčastěji využívány v kosmetice, zejména v produktech pro péči o pleť, a jejich běžné použití je zaznamenáno především v opalovacích krémech, kde slouží mimo jiné jako UV filtry. Nanotechnologické produkty vyrobené pro přímý kontakt s pokožkou obličeje by však měly být důkladně dermatologicky testovány [7][8][9].

2.2 Nanočástice

Nanočástice jsou malé materiály, jejichž rozměry se pohybují v rozmezí nanometrů. Tyto částice jsou rozděleny do různých skupin v závislosti na jejich tvaru, velikosti a fyzikálně - chemických vlastnostech. Existuje několik tříd nanočástic, které se liší svými charakteristikami, včetně nanočástic na bázi uhlíku, kovových nanočástic, keramických nanočástic, polovodičových nanočástic, polymerních nanočástic a nanočástic na bázi lipidů. Nanočástice mohou mít různé tvary, velikosti a struktury [10][11].

2.2.1 Liposomy

Liposomy představují nejvíce prozkoumané nanorozměrové nosiče v oblasti cíleného podávání léčiv. Jedná se o sférické lipidové vezikuly složené z jedné nebo více lipidových dvojvrstev. Poprvé byly objeveny v 60. letech minulého století a od té doby se staly jedním z nerozšířenějších systémů pro dodávání léků. Liposomy jsou složeny z přírodních nebo syntetických fosfolipidů. Jejich základní strukturu tvoří fosfolipidy, dále cholesterol, který moduluje propustnost membrán, mění tekutost a zvyšuje stabilitu dvojvrstevých membrán. Dvojvrstvá membrána fosfolipidů obsahuje hydrofobní řetězce zbytků mastných kyselin a hydrofilní hlavičku [12][13].



Obrázek 1: Schématické znázornění liposomů [12]

Hlavní výhodou liposomů, jako nosičů léčiv je jejich složení, které je činí biokompatibilními, biodegradabilními, netoxickými a schopnými enkapsulovat jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva. Hydrofilní léčiva jsou přítomna ve vodném jádře (viz Obrázek 1), zatímco lipofilní léčiva jsou zachycena v lipidové dvojvrstvě. Liposomy se používají jako transportní systém pro mnoho bioaktivních materiálů, jako jsou cytostatika, proteiny, peptidy, enzymy, DNA nebo vakcíny. Zapouzdřením sloučeniny do liposomu je léčivo chráněno před časnou inaktivací a před enzymatickými procesy, které se běžně vyskytují v těle. Ačkoli lze liposomy použít k transportu široké škály látek, jejich využití v praxi je méně obvyklé. Hlavními důvody jsou jejich fyzikálně-chemická nestabilita způsobená oxidací a hydrolýzou fosfolipidů, nízká rozpustnost ve vodných roztocích a krátká doba cirkulace v lidském těle způsobená rychlou detekcí imunitním systémem [14].

2.2.2 Složky liposomů

Lecitin je hlavní složkou tuků, nachází se v buněčných membránách, kde podporuje mezibuněčnou komunikaci. Jedná se o žlutou až hnědou látku, která může být získávána z rostlin, ale také zvířat. Získává se ze sójových bobů a řepkových semen ve velkém množství,

a to zejména pro komerční účely. Lecitin lze nalézt i v dalších zdrojích, jako je květák, cizrna, arašíd, mléko a ořechy. V potravinářském průmyslu bývá používán jako emulgátor. Charakteristické vlastnosti lecitinu jsou převážně způsobeny povrchovou aktivitou fosfolipidů. Fosfolipidy se skládají z glycerolu s navázanými dvěma mastnými kyselinami a fosfátovou skupinou prostřednictvím esterové vazby [15].

Cholesterol je látka přirozeného původu, která má strukturu skládající se ze čtyř uhlovodíkových kruhů a jednoho postranního řetězce, který má osm uhlíků. Chemicky se řadí mezi steroidy a díky hydroxylové skupině, která je navázaná v poloze C3, se řadí do podskupiny sterolů, konkrétně jako zoosterol. Mezi hlavní zdroje cholesterolu patří vaječný žloutek, krevety, hovězí a vepřové maso [16][17].

2.2.3 Klasifikace liposomů

Liposomy jsou nejčastěji klasifikovány podle jejich velikosti a počtu fosfolipidových dvojvrstev v liposomu (Obrázek 2).

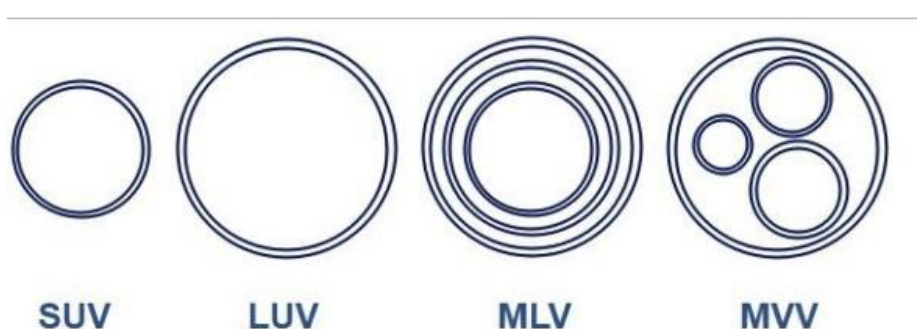
Na základě počtu lamel se liposomy dělí na:

- unilamelární (jednoduchá fosfolipidová dvojvrstva),
- multilamelární (vícenásobné fosfolipidové dvojvrstvy, průměr větší než 0,5 μm),
- multivezikulární systémy (menší váčky uvnitř hlavního váčku, průměr větší než 1 μm).

Liposomy s jednou fosfolipidovou dvojvrstvou se pak dělí na:

- malé unilamelární vezikuly (SUV) o průměru 20–200 nm,
- velké unilamelární vezikuly (LUV) o průměru 100–1000 nm,
- obří unilamelární vezikuly (GUV) o průměru větší než 1000 nm.

Multilamelární vezikuly (MLV) obvykle obsahují 5–25 fosfolipidových dvojvrstev, a proto jsou vhodnější pro zapouzdření hydrofobních léčiv. Na druhou stranu jsou LUV vhodnější pro enkapsulaci hydrofilních léčiv, protože mají pouze jednu fosfolipidovou dvojvrstvu a mnohem větší objem vodného roztoku v liposomech než SUV [14].



Obrázek 2: Typy vezikul v závislosti na velikosti a lamelaritě [18]

2.2.4 Příprava nanočástic typu liposomů

Obvyklý postup přípravy zahrnuje dispergaci lipidických látek ve vodném prostředí, následované purifikací a analýzou vytvořených liposomů. Mezi často využívané metody patří sonikace, metoda odpařování reverzní fáze nebo hydratace lipidického filmu [19].

Hlavním principem sonikace je působení ultrazvuku na kapalinu. Frekvence ultrazvukových vln je aplikována na roztok s cílem homogenně rozptýlit nanočástice do základní tekutiny. Tento akustický energetický tok, pronikající skrze roztok, ovlivňuje částice v jeho složení a indukuje změny v jejich uspořádání či struktuře. Tímto způsobem je rušena mezimolekulární síla, což následně snižuje tvorbu shluků nanočástic. Sonikace je nepoužívanější metodou pro přípravu malých SUV vezikul. Jsou známy dvě možnosti provedení tohoto procesu. V prvním případě se využívá sonikační sondy, která je ponořena do roztoku, který obsahuje všechny potřebné složky pro přípravu liposomů. Tato sonda předává do roztoku velké množství energie, tím dochází k jeho zahřívání a přenosu tepla do roztoku. Z tohoto důvodu je potřeba chlazení na vodní lázni. Druhou možností je sonikace přímo ve vodní lázni. Při této variantě je liposomální roztok umístěn do uzavřené nádoby a celý tento systém je ponořen do sonikační lázně [19][20].

2.2.5 Charakterizace připravených nanočástic s aktivní látkou

2.2.5.1 Stabilita nanočástic

Termín stabilita nanočástic se široce používá k popisu zachování konkrétních vlastností nanostruktury, jako je agregace, složení, krystalinita, tvar a velikost [21].

Liposomální stabilita je důležitým ukazatelem potenciální účinnosti a užitečnosti v klinickém použití. Stabilita je často hodnocena provedením fyzikálního hodnocení struktury liposomů v několika časových bodech (např. dny, týdny nebo měsíce). Nežádoucí změny ve fyzikálních charakteristikách liposomové formulace zahrnují agregaci částic a fyzikální degradaci lipidové membrány v průběhu času. Liposomální průměr a povrchový náboj lze určit pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) [22].

Zeta potenciál nebo ζ potenciál je zkratka pro elektrokinetický potenciál v koloidních systémech. Z teoretického hlediska je zeta potenciál elektrický potenciál v mezifázové dvojité vrstvě. Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje zeta potenciál, je pH média. Mezi další faktory patří iontová síla a teplota [23].

Zeta potenciál je důležitý pro fyzikální stabilitu emulzí. Vysoký pozitivní nebo negativní zeta potenciál znamená elektrickou stabilitu díky odpudivým silám, které převažují nad přitažlivými silami. To udržuje částice v emulzi rozptýlené a zabraňuje jejich koagulaci nebo flokulaci. Naopak nízký kladný nebo záporný zeta potenciál vede k převažujícím přitažlivým silám, což může vést ke špatné fyzikální stabilitě emulze [23].

2.2.5.2 Velikost částic

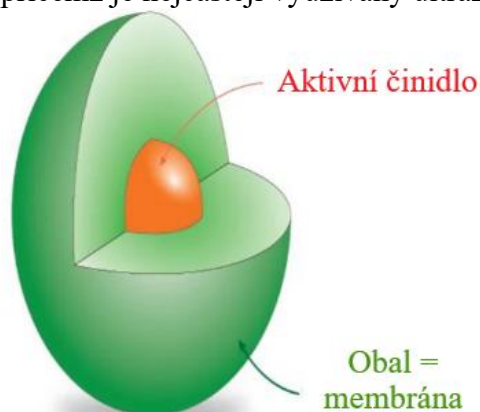
Pro měření velikosti částic se používá metoda, které je známá jako dynamický rozptyl světla. Tato technika je často využívána pro analýzu distribuce velikosti liposomů [24]. Princip této metody je podrobněji popsán v bodě 2.10.1.

2.2.6 Enkapsulace

Enkapsulace, neboli zapouzdření je cenná metoda používaná k ochraně účinných látek a zlepšení jejich fyzikálně-chemických vlastností. Také ji lze využít k ochraně před nežádoucími vůněmi, chutěmi nebo nepříznivými podmínkami prostředí [25].

Některé látky mají významné zdravotní přínosy a mohou sloužit jako léčiva, avšak není možné je přímo používat ani skladovat dlouhodobě, což může být způsobeno jejich nízkou rozpustností, nízkou biologickou dostupností, sklonem k oxidaci apod. Látka je obvykle uzavřena potahovým materiálem, který tvoří bariéru pro ochranu látky před prostředím a chemickou interakcí (Obrázek 3). Potahový materiál se nazývá plášťový nebo stěnový materiál. Zapouzdření lze použít pro zlepšení vlastností různých látek a také pro ochranu aktivní látky například před světlem, vlhkostí a změnami pH. Kromě ochrany aktivní látky může enkapsulace také prodloužit uvolňování, což může být užitečné při postupném a kontrolovaném uvolňování léčiv [25].

Zapouzdření do liposomů usnadňuje dodání léčiva do specifického místa, jako je například mozkový parenchym, zvyšuje stabilitu molekul léčiva, prodlužuje farmakologickou aktivitu prostřednictvím kontinuálního lokálního uvolňování aktivních molekul a snižuje vedlejší účinky, čímž zlepšuje účinnost a bezpečnost terapií. Vzhledem k obrovskému množství léčiv s velmi specifickými a odlišnými vlastnostmi existuje mnoho typů biopolymerů (částice na bázi proteinů) a umělých polymerů (kyselina polymléčná-ko-glykolová, poly- ϵ -kaprolakton, kyselina polymléčná, poly(butylkyanoakrylát) nebo želatina, které se používají pro jejich zapouzdření. Existují dvě hlavní kategorie enkapsulačních technik. První kategorií jsou chemické metody, kam řadíme techniky koacervace a kokystalizace. Druhou skupinou jsou fyzikální postupy, které zahrnují rozprašování, chlazení rozprašováním, extruze nebo emulgační techniky, přičemž je nejčastěji využíván ultrazvuk jako zdroj energie [26].



Obrázek 3: Zapouzdřená aktivní látka [25]

Při výrobě liposomálních částic s enkapsulovanými aktivními látkami je klíčové pečlivě sledovat poměr mezi enkapsulovaným léčivem v liposomech a zbylým neenkapsulovaným léčivem. Tato kontrola umožňuje určit účinnost enkapsulace v liposomech. K vyhodnocení enkapsulovaného a neenkapsulovaného léčiva v liposomech se používají analytické metody,

jako například HPLC, UV/VIS spektrofotometrie, dynamický rozptyl světla (DLS), elektronová mikroskopie (EM) a fluorescenční spektroskopie [27].

2.3 Nanovlákná

Nanovlákná jsou jednorozměrné nanomateriály, které se využívají pro širokou škálu výzkumných a komerčních aplikací. Nanovlákná vykazují několik zajímavých vlastností. Mezi tyto vlastnosti patří průměr, který je až 1000krát menší než průměr lidského vlasu, velký povrch s nastavitelnou porézností, flexibilní povrchové funkce a lepší mechanické vlastnosti než kterýkoli jiný běžně používaný materiál. Významný dopad technologie nanovláken spočívá v možnosti využití široké škály materiálů, které lze použít pro výrobu nanovláken, včetně přírodních a syntetických polymerů, kovů a oxidů kovů, uhlíkových a kompozitních nanomateriálů [28].

Nanovlákná mají široké využití v lékařství, využívají se jako obvazy na rány, nosiče pro tkáňové inženýrství, různé diagnostické nástroje, dentální protézy a náplasti. Jsou využívány k prevenci, detekci, měření a diagnostice nebo léčbě nemocí. Další využití nanovláken je v kosmetickém průmyslu. Nanovlákná se také používají v opalovacích krémech, pleťových krémech, vlasových produktech a produktech pro ústní hygienu [29][30].

Jednofázová nanovlákná jsou takové materiály, které mají homogenní chemické složení a strukturu po celé délce vlákna. Kompozitní nanovlákná jsou složená alespoň ze dvou nebo více složek, které mají odlišné fyzikální nebo chemické vlastnosti. Příkladem kompozitního materiálu mohou být nanovlákná s integrovanými částicemi. V biomedicínských aplikacích jsou tato kompozitní nanovlákná upřednostňována pro své výjimečné strukturální vlastnosti a variabilitu ve srovnání s monofázovými nanovláknami. Jsou relativně novým a unikátním typem nanomateriálů s řadou využití. Přístup s kompozitními nanovláknami výrazně zlepšil přilnutí buněk a jejich funkce ve srovnání s jednoduchými nanovláknami. Většina kompozitních nanovláken je navržena s cílem zlepšit mechanické, strukturální a buněčné vlastnosti oproti monofázovým nanovláknům [31].

2.3.1 Materiály pro přípravu nanovláken

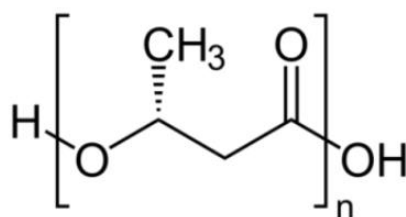
Nanovlákná se díky svým mimořádným technickým vlastnostem stala významná v téměř všech průmyslových odvětvích, zejména v obalovém, čistícím, textilním, farmaceutickém a biomedicínském sektoru. Nanovlákná se vyrábějí z různých polymerů v závislosti na jejich zamýšlené funkci. Většina z těchto nanovláken byla objevena jako biologicky odbouratelná a biokompatibilní a mají schopnost vytvořit vysoce porézní strukturu s vynikajícími vlastnostmi, díky čemuž jsou vhodné pro širokou škálu aplikací [32].

Nanovlákná mohou být vyrobena z přírodních polymerů, jako je kolagen, celulóza, fibroin, želatina, keratin, chitosan, a syntetických polymerů, jako je polyuretan, kyselina polymléčná, kopolymer kyseliny mléčné a glykolové a polykaprolakton. Přírodní polymery nabízejí lepší biokompatibilitu a biologickou aktivitu než syntetické polymery díky své přirozené bioaktivitě. Přírodní biomateriály jsou omezeny ve své použitelnosti v oblasti biomedicíny kvůli jejich nevyváženým mechanickým vlastnostem a stabilitě. Navzdory skutečnosti, že syntetické

biomateriály jsou biologicky neaktivní, jejich mechanické vlastnosti a biologická stabilita mohou být přizpůsobeny různým aplikacím. Spojení přírodních materiálů se syntetickými složkami s cílem vytvořit komplexy je vnímáno jako efektivní strategie pro dosažení vysoké biologické účinnosti a současně pro dosažení snadno kontrolovatelných mechanických charakteristik a biostability [32].

2.3.1.1 Polyhydroxybutyrát

Polyhydroxybutyrát (PHB) je polyester, který produkují bakterie a slouží jako zdroj ukládání uhlíku a energie (Obrázek 4). Tento materiál, který má podobné termoplastické vlastnosti jako polyethylen a polypropylen, je biologicky rozložitelný, inertní a biokompatibilní, což ho činí vhodným pro použití v medicíně a biomedicíně. Díky své vysoké krystalinitě, teplotě tání a hydrolytické stabilitě lze PHB využít pro biomedicínské aplikace, a to včetně kostních implantátů a nanočástic pro dodávání léčiv. Syntéza PHB může probíhat různými způsoby, včetně syntetické polymerace, získávání z rostlin nebo bakteriální fermentace. Bakterie jako *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata* a *Escherichia coli* jsou schopné produkovat PHB, a to jak v přírodním prostředí, tak i v laboratoři [33][34][35].



Obrázek 4: Chemická struktura polyhydroxybutyrátu [33]

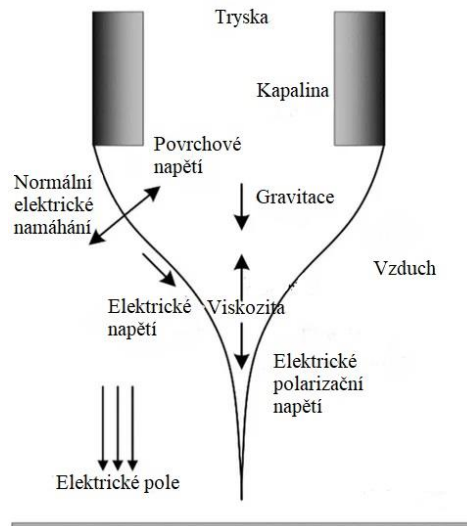
2.3.2 Metody pro přípravu nanovláken

Existuje několik metod pro přípravu nanovláken, které se používají v různých odvětvích, jako je například biomedicína nebo elektronika. Mezi hlavní metody patří postupy označované jako elektrospinning, forcespinning, wet spinning, dry spinning, gel spinning a melt spinning.

2.3.2.1 Elektrospinning

Elektrostatické zvlákňování je všestranná a životaschopná technika pro generování ultratenkých vláken. Základní nastavení pro elektrostatické zvlákňování je poměrně jednoduché, a proto je přístupné téměř každé laboratoři. Mezi hlavní součásti patří vysokonapěťový napájecí zdroj, injekční pumpa, zvlákňovací tryska a vodivý kolektor. Je to proces, při kterém se vytvářejí vlákna malého průřezu z roztoku nebo taveniny za pomoci elektrického pole. Princip elektrostatického zvlákňování začíná tím, že se polymerní roztok vytlačí na hranu jehly pomocí dávkovacího zařízení. Při zvýšeném elektrickém napětí v roztoku polymeru je kapka zužována do tvaru, který se nazývá Taylorův kužel. Tento jev vzniká vždy, když je vodivá kapalina vložena do elektrického pole, kde coulombovská síla působí opačným směrem než vektor síly povrchového napětí kapky a tečného napětí, což ji prodlužuje.

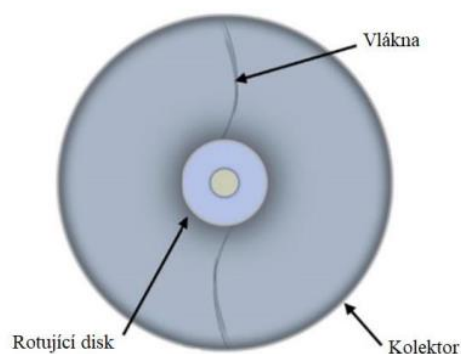
Ve vrcholu Taylorova kužele jsou koncentrovány částice, které mají stejný náboj, díky tomu dochází k elektrostatické repulzi. Jakmile dojde k dosažení kritického potenciálu, tato repulze překoná sílu povrchového napětí a proud roztoku začne unikat z vrcholu [36][37]. Tento jev je znázorněn na Obrázek 5.



Obrázek 5: Popis Taylorova kužele [38]

2.3.2.2 Forcespinning

Forcespinning, neboli odstředivé zvlákňování je metoda, která využívá mechanickou sílu jako hnací sílu k natahování taveniny na vlákna. Základní nastavení se skládá ze dvou částí: trysky držené v rotátoru, kde hnací síla pochází z odstředivé síly a kolektoru (Obrázek 6). Při této metodě překonává odstředivá síla povrchové napětí roztoku v centrální rotační trysce, což umožňuje vytlačení kapaliny. Odstředivé a vzduchové třecí síly prodlužují paprsek, který následně prochází procesem natahování, aby se nakonec zachytil na kolektorech [39].



Obrázek 6: Schéma forcespinningu [39]

Odstředivé zvlákňování dosahuje vynikající produktivity vláken díky vysoké účinnosti vysokorychlostní odstředivé síly. Této vysoké účinnosti je dosaženo bez potřeby vysokonapěťového elektrického pole. Odstředivé zvlákňování snadno produkuje zarovnaná

nanovlákná, protože paprsek je natahován odstředivou silou v jednom směru. Odstředivé zvlákňování však produkuje vlákna s vyššími středními průměry ve srovnání s elektrostatickým zvlákňováním [39].

2.3.2.3 Wet spinning

Další často uplatňovaná metoda, která je používána pro výrobu nanovláken, se nazývá „wet spinning“, jinak také „vlhké“ zvlákňování. Tato technika se aplikuje na polymery, které je nutné rozpustit v rozpouštědle, aby mohly být zvlákňovány. Zvlákňovací tryska je ponořena do koagulační lázně, v níž dojde k vysrážení vlákna, které poté ztuhne. Mezi nevýhody této metody patří nízká rychlost přípravy [40].

2.3.2.4 Dry spinning

Suché zvlákňování je další způsob výroby polymerních vláken. V suchých zvlákňovacích zařízeních je roztok polymerního roztoku přiváděn konstantní a regulovatelnou rychlostí tryskami do zvlákňovacího potrubí, kde se sprádaná vlákna suší proudem zahřátého vzduchu. Během tohoto procesu sušení se rozpouštědlo odpařuje z trysek a vede ke ztenčování a tunutí vláken [41].

2.3.2.5 Gel spinning

Jedním z hlavních výrobních postupů pro výrobu vláken s velkou pevností a mechanickými vlastnostmi je gelové zvlákňování. Po vytlačení roztoku polymeru ze zvlákňovacích trysek se tento roztok ochladí v rozpouštědle nebo vodě a poté se natáhne na gelové vlákno. Gelové zvlákňování může účinně podporovat molekulovou hmotnost, stupeň orientace, krystalinitu a hustotu vlákna polymeru, což přispívá ke zvýšení pevnosti vlákna [42].

2.3.2.6 Melt spinning

Melt spinning představuje efektivní metodu pro výrobu polymerních vláken. Během tohoto procesu je polymer rozpuštěn a vytlačen ze zvlákňovací trysky, čímž vznikají dlouhá vlákna polymeru. Zvlákňovací tryska může obsahovat libovolný počet otvorů v závislosti na konkrétní aplikaci. Materiál je často vytlačován do jednovláknových a mnohovláknových nití, které jsou následně tahány a ochlazeny (typicky pomocí vzduchu), čímž dochází k jejich ztuhnutí. Poté jsou navinuty na cívky, nebo podrobeny dalším procesům, jako je texturování, tkaní nebo splétání [43].

2.4 Kombinované nanomateriály na bázi nanočástic a nanovláken

Nanovlákná jsou často vytvářena technikami elektrostatického zvlákňování a nacházejí uplatnění u dodávání léků, obvazových materiálů, ve tkáňovém inženýrství a dalších oblastech. Mají několik omezení, která lze vyřešit vývojem technik dodávání tzv. „nano-v-nano“ způsobem. V systémech „nano-v-nano“ jsou do nanovláken zabudovány nanočástice, a díky tomu nabízejí mnoho výhod oproti jiným nanosystémům. Mezi tyto výhody patří ochrana léčiva

před fyzikálním poškozením, schopnost poskytovat prodloužené uvolňování léčiva, možnost kombinace více aktivních látek při jedné aplikaci. Souhrnně lze říct, že kombinací obou uvedených typů nanomateriálů se dosahuje optimalizace jejich výhod a eliminace jejich nevýhod, mezi které patří například rychlé uvolňování. Kombinované nanomateriály mohou být vyrobeny třemi různými způsoby. První možností je enkapsulace nanočástic do nanovláken, dalším způsobem je zachycování nanočástic mezi nanovláčky a poslední metodou je adsorpce [44].

Jedním ze způsobů začlenění nanočástic do nanovláken je jejich enkapsulace do nanovláken. Je to výhodné pro dosažení řízeného uvolňování léčiva nebo bioaktivní molekuly. Tato metoda je výhodná také proto, že snižuje ztráty léčiva. V první fázi vývoje takového systému probíhá příprava nanočástic s enkapsulovaným léčivem pomocí jakékoli techniky. Tyto připravené nanočástice se řádně smíchají s polymerním roztokem, dokud nedojde k vytvoření homogenního roztoku. Polymerní roztok zcela obalí nanočástice a poté se pomocí elektrostatického zvlákňování vytvoří nanovláčka s enkapsulovanými nanočásticemi. Druhou možností je zachycení. Tato metoda je nejméně využívaná. Principem je pronikání nanočástic do pórů bez tvorby jakékoli vazby s nanovláčkou. Poslední možností je adsorpce nanočástic do nanovláken. Ve srovnání s jinými metodami je velmi jednoduchá. Nanočástice se adsorbují na nanovláčka pouhým ponořením nanovláčka do disperze nanočástic [44].

Budoucí perspektivy v této oblasti nosičů léků mohou znamenat výrazná zlepšení v oblastech nanotechnologií, nanobiotechnologií a nanomedicíny. Úspěchy dosažené v experimentálním výzkumu jsou klíčové pro převod tohoto systému do klinické praxe. S podporou nadějných klinických důkazů může dojít k výrazně efektivnější terapeutické účinnosti tohoto přístupu při léčbě různých onemocnění. Předpokládá se, že systémy nanočástic inkorporovaných v nanovláčkách může být velmi efektivní při léčbě vážných onemocnění, kdy překonají omezení stávajících terapeutických metod [45].

2.5 Synergický účinek antimikrobiálních látek

Synergický účinek je definován jako proces, při kterém spolupracují dvě antimikrobiální činidla tak, aby dosáhly kombinovaného účinku, který je větší než jejich součet. Lze ho považovat za přímou strategii, která se přirozeně vyvinula k dosažení vyšší účinnosti při nízkých nákladech. V tomto ohledu lze pozorovat synergické účinky při interakci mezi rostlinnými produkty a konvenčními léčivy nebo biochemickými sloučeninami. Je důležité identifikovat a využít tyto interakce, protože jakékoli zlepšení, které takový druh procesu přinese, lze s výhodou použít k léčbě lidských chorob [46].

2.6 Antioxidační účinek

Volný radikál může být definován jako jakákoliv molekula schopná samostatné existence, která obsahuje nepárový elektron v atomovém orbitalu. Radikály jsou nestabilní a vysoce reaktivní. Mohou buď darovat elektron nebo přijmout elektron z jiných molekul, a proto se chovat jako oxidační, nebo redukční činidla. Jedná se o vysoce reaktivní druhy, schopné v jádře a v membránách buněk poškozovat biologické molekuly, jako je DNA, proteiny, sacharidy

a lipidy. Volné radikály napadají důležité makromolekuly, což vede k poškození buněk a narušení rovnováhy. Volné radikály a další reaktivní formy kyslíku pocházejí buď z normálních základních metabolických procesů v lidském těle, nebo z vnějších zdrojů, jako je vystavení rentgenovým paprskům, ozónu, kouření cigaret, látkám znečišťujícím ovzduší a průmyslovým chemikáliím. Tvorba volných radikálů probíhá v buňkách nepřetržitě jako důsledek enzymatických i neenzymatických reakcí [47].

Antioxidanty jsou látky, které jsou schopny zachytávat volné radikály a mohou pomoci potlačit nerovnováhu, která vzniká při oxidativním stresu. Hrají klíčovou roli při ochraně rostlin před poškozením, znečištěním a chorobami. Přírodní antioxidanty jsou široce rozšířené v léčivých rostlinách. Tyto přírodní antioxidanty, zejména polyfenoly a karotenoidy, vykazují širokou škálu biologických účinků, včetně těch protizánětlivých. Dále působí proti stárnutí, proti ateroskleróze, a proti rakovině. Efektivní extrakce a správná izolace antioxidantů z potravin a léčivých rostlin jsou klíčové pro prozkoumání potenciálních zdrojů antioxidantů [48][49].

2.7 Antibiotika

Zavedení antibiotik do klinické praxe bylo nejvýznamnějším lékařským průlomem 20. století. Slouží k léčbě infekčních onemocnění, ale umožnily i mnoho moderních lékařských postupů, včetně léčby rakoviny a transplantací orgánů. Nesprávné užívání antibiotik vedlo ke vzniku rezistence. Antibiotika jsou jedny z nejčastěji předepisovaných léků a používají se k léčbě bakteriálních a plísňových infekcí. Zatímco některé z těchto léků jsou dostupné v perorálních formulacích, řada z nich se podává intravenózní nebo intramuskulární injekcí [50][51].

Antibiotika jsou cytotoxická, nebo cytostatická. Umožňují imunitnímu systému, aby bakterie eliminovala. Antibiotika působí na bakterie několika mechanismy: inhibicí syntézy buněčné stěny, inhibicí translace – syntézy proteinů, replikace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a tvorby ribonukleové kyseliny (RNA) [52][53].

Příklady antibiotik podle způsobu působení jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Příklady některých antibiotik podle typu účinku [53]

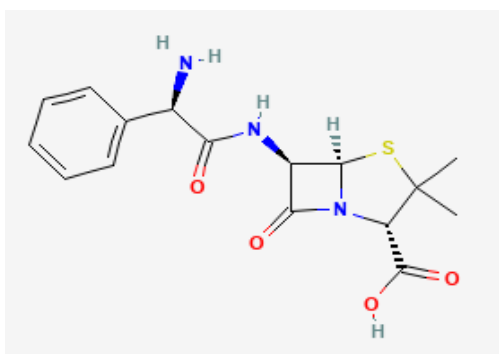
ATB inhibující syntézu buněčné stěny	beta-laktamová karbapenemy
ATB inhibující syntézu proteinů	aminoglykosidy tetracykliny
ATB inhibující syntézu NK	chinoliny fluorochinoliny

Antibiotická rezistence je schopnost bakterií odolávat účinkům antimikrobiálních léčiv, což ztěžuje usmrcení mikroorganismů a snižuje účinnost léčby. Tento jev je považován za klíčový

problém v léčbě infekcí, protože bakterie mohou být odolné vůči jak přírodním, tak syntetickým antibiotikům. K tomuto jevu přispívá primárně nesprávné užívání nízkých dávek antibiotik nebo nedostatečná doba užívání, což umožní adaptaci mikroorganismu a nepomůže pak ani nadměrné užívání antimikrobiálních látek. Dalším problémem je nedůsledné předepisování antibiotik, což v souhrnu vede k vytvoření rezistentních organismů. Bakterie mohou vyvinout rezistenci několika způsoby, včetně modifikace cíle léčiva, inaktivace léčiva, omezení jeho příjmu a aktivního transportu z buňky. Problém rezistence má vážné důsledky pro léčbu infekcí a vyžaduje komplexní opatření pro jeho zvládnutí. Zabránit rozvíjející se rezistenci k dalším antibiotikům může vývoj nových antimikrobiálních látek, dále je důležitým prvkem způsob účinku a kombinace preparátů schopných synergie, například mezi antibiotiky a dalšími léčivy [54][55][56].

2.7.1.1 Ampicilin

Ampicilin je semisyntetický derivát penicilinu (Obrázek 7). Je to účinné antibiotikum proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Je odolné vůči kyselinám, takže jej lze podávat perorálně. Ampicilin má baktericidní účinek díky své schopnosti blokovat syntézu buněčné stěny bakterií, což vede k jejich následné bakteriolýze. Má velmi dobré hodnoty minimální inhibiční koncentrace proti většině mikroorganismů. Ampicilin se také používá ve spojení s dalšími antimikrobiálními látkami za účelem zlepšení jejich účinnosti, rozšíření spektra antimikrobiálního působení a snížení vývoje rezistence. Tyto kombinace jsou užitečné při empirickém léčení široké škály komplikovaných infekcí, včetně aerobních, anaerobních a smíšených infekcí. Ampicilin se používá k léčbě infekcí horních a dolních cest dýchacích, infekcí kůže a kožních struktur, infekcí močových cest a zánětů středního ucha [57][58][59].

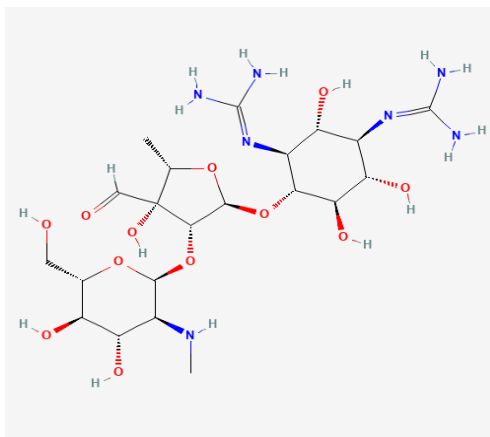


Obrázek 7: Vzorec ampicilinu [60]

2.7.1.2 Streptomycin

Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum (Obrázek 8), které bylo objeveno jako lék užitečný v boji proti tuberkulóze. Podává se intramuskulárně. Streptomycin špatně proniká do mozkomíšního moku a dalších vzdálených tkání (např. prostaty a oka). Léčivo působí jako inhibitor syntézy proteinů tím, že se váže na 16S rRNA a narušuje proces translace. Streptomycin má široké spektrum antibakteriální aktivity. Je účinný proti většině gramnegativních a grampozitivních bakterií, proti stafylokokům, streptokokům, pneumokokům, gonokokům, meningokokům. Používá se při léčbě různých dalších

onemocněných, které jsou způsobeny mikroorganismy, například při bakteriální endokarditidě, peritonitidě, meningitidě, infekcích močových cest, žaludečních infekcích. Hlavními vedlejšími účinky aminoglykosidů jsou ototoxicita a nefrotoxicita [61][62][63].



Obrázek 8: Vzorec streptomycinu [60]

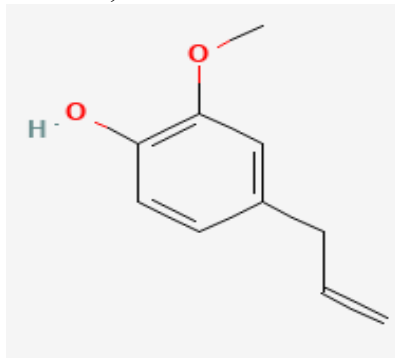
2.8 Přírodní látky s antioxidační aktivitou a antimikrobiálním účinkem

Jedná se o bioaktivní sloučeniny rostlinného původu produkované rostlinami pro jejich ochranu. Jsou to obvykle rostlinné sekundární metabolity. Mezi látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu se řadí fenoly a polyfenoly, terpenoidy, alkaloidy, lektiny a polypeptidy. Fytochemikálie mohou působit na mikroorganismy několika způsoby, jako je narušení mikrobiálních membrán nebo buněčného metabolismu. Rostliny jsou považovány za cenný zdroj unikátních přírodních látek pro vývoj antidiabetických, protizánětlivých, protirakovinných a antimikrobiálních léků. V dnešní době se rozšiřuje a zrychluje zejména výzkum rostlinných antimikrobiálních látek, a to z důvodu stále častěji se vyskytující rezistence mikroorganismů na antibiotika. Některé fytochemikálie mají přirozený výrazný antimikrobiální účinek a jejich kombinace s antibiotiky může vykazovat synergický efekt [64][65][66].

2.8.1 Eugenol

Eugenol (Obrázek 9) je přírodní aromatická látka, která se přirozeně vyskytuje hlavně v esenciálních olejích. Jedním z hlavních zdrojů eugenolu je esenciální olej z hřebíčku, přičemž eugenol je látka odpovědná za jeho typickou vůni. Jde o průhlednou až nažloutlou olejovitou tekutinu, která je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech. Je známá díky své antibakteriální a antiplísňové aktivitě, protizánětlivým účinkům a antioxidačním vlastnostem. Eugenol může být extrahován rovněž z mnoha rostlin a jeho antimikrobiální aktivita je založena na jeho propustnosti přes buněčnou membránu a schopnosti interagovat s proteiny. Je léčivý a zároveň se používá také ve výrobcích, jako jsou parfémy a cigarety s příchutí hřebíčku. V lékařství se eugenol využívá jako antiseptikum a anestetikum, protože zmírňuje bolest. Ve stomatologii se často používá při vyplňování dutin před zhotovením výplně a při výrobě intermediálních náhrad, kdy se do těchto náhrad vtírá eugenol, aby znecitlivěl měkké tkáně v dutině ústní po extrakci zubů. Současně napomáhá lepšímu zhojení post-extrakčních ran. Navzdory svému rozmanitému použití může být eugenol nebezpečný, zvláště pokud se užívá

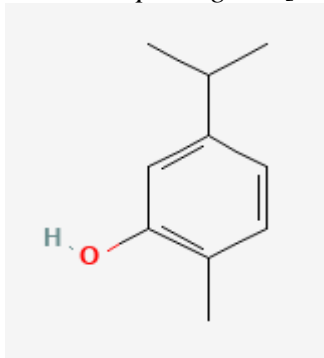
více než doporučené dávkování. V takových případech může způsobit křeče, nevolnost, rychlý srdeční tep a závratě. Některé výzkumné studie ukazují, že eugenol může být toxický pro imunitní systém a řada studií také uvádí, že může vést k mutacím v DNA těla [67][68][69].



Obrázek 9: Vzorec eugenolu [60]

2.8.2 Karvakrol

Karvakrol (Obrázek 10) je fenolický monoterpenoid, který se nachází v esenciálních olejích z oregána, tymiánu, peprnice, divokého bergamotu a dalších rostlin. Karvakrol má širokou škálu biologických aktivit, které jsou užitečné pro klinické aplikace, jako jsou antimikrobiální, antioxidantní a protirakovinné aktivity. Antimikrobiální aktivita karvakrolu je vyšší než u jiných těkavých sloučenin přítomných v esenciálních olejích, a to díky přítomnosti volné hydroxylové skupiny. Karvakrol snižuje oxidační stres prostřednictvím odstraňování volných radikálů a ROS. Je účinný proti patogenům přenášeným potravinami včetně *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* a *Bacillus cereus*. Karvakrol má vysokou antioxidantní aktivitu a byl úspěšně používán hlavně ve spojení s tymolem, se kterým vykazují synergický účinek. Bylo také zjištěno, že karvakrol vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Enterococcus sp.* *Shigella* [70][71][72].

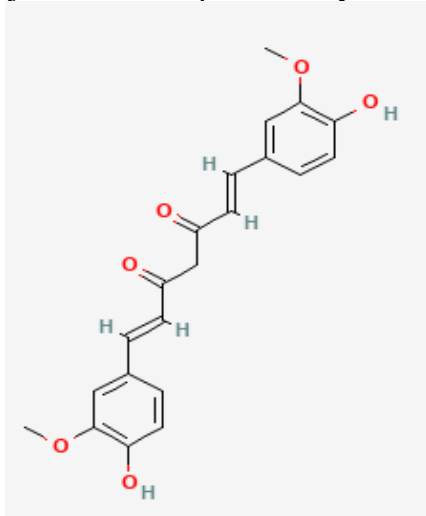


Obrázek 10: Vzorec karvakrolu [60]

2.8.3 Kurkumin

Kurkumin (Obrázek 11) je hlavní kurkuminoid, který je získávaný z kurkumy. Kurkuma je koření, které je dlouhou dobu uznáváno pro své léčivé vlastnosti. Používá se nejen v lékařství, ale taky je používána v gastronomii. Je hlavním zdrojem kurkuminu. Pomáhá při zvládnání oxidačních a zánětlivých stavů, metabolického syndromu, artritidy, úzkosti a hyperlipidémie.

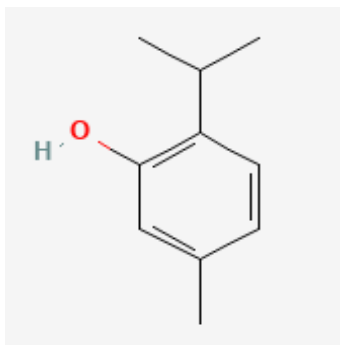
Může také pomoci při zvládnání zánětu způsobeného cvičením a bolestí svalů, a tak u aktivních lidí zlepšuje regeneraci a výkon. Většina z těchto výhod lze přičíst jeho antioxidačním a protizánětlivým účinkům. Samotným problémem kurkuminu je jeho výrazně nízká absorpce v těle. Všechny kurkuminoidy jsou tučných rozpustné látky [73][74][75].



Obrázek 11: Vzorec kurkuminu [60]

2.8.4 Tymol

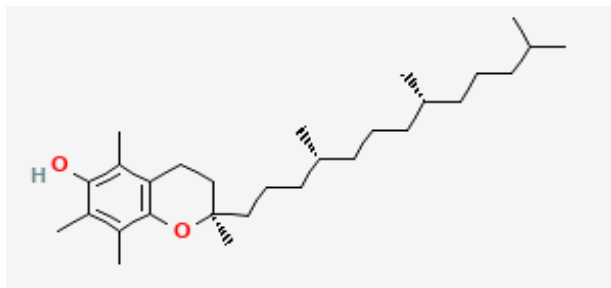
Tymol (Obrázek 12) je přírodní těkavý monoterpenoid, který je hlavní aktivní složkou oleje extrahovaného z rostliny *Thymus vulgaris* L., běžně známého jako tymián. Jedná se o všestrannou molekulu s širokou škálou praktických aplikací v lékařství, stomatologii, veterinárním lékařství, potravinách a agrochemikáliích. Jeho farmakologické aplikace byly nejvíce prozkoumány v souvislosti s jeho antimikrobiálními, antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi. Zvýšila se jeho aplikace v zemědělství, kde se používá jako přírodní agrochemikálie. Přesněji se používá při desinfekci půdy, ochraně proti škůdcům a jako alternativa k chemickým pesticidům. Tymol je chemicky podobný karvakrolu, liší se v poloze hydroxylové skupiny na fenolovém kruhu, díky čemuž je jeho izomerem. Tymol ovlivňuje propustnost membrány, a to následně způsobuje ztrátu membránového potenciálu, únik K^+ iontů, ATP a karboxyfluoresceinu. Jedná se o všestrannou molekulu s širokou škálou praktických aplikací [76][77].



Obrázek 12: Vzorec tymolu [60]

2.8.5 Vitamin E

Vitamin E (Obrázek 13) je jedním ze čtyř vitaminů rozpustných v tucích, je esenciální pro lidský organismus a má zásadní význam pro zdraví lidského těla. Vitamin E je nejúčinnějším antioxidantem, který chrání polynenasycené mastné kyseliny v membránách před oxidací a reguluje produkci reaktivních forem kyslíku. Existuje osm různých molekulárních forem vitaminu E s antioxidační aktivitou, přesto tělo přednostně využívá α -formu vitaminu E. Má široké využití v potravinářském průmyslu, vyskytuje se v potravinách jako je špenát, ořechy, máslo, dále v ovoci, například v černém rybízu, jahodách a malinách, jeho příjem je tedy každodenní [78][79].



Obrázek 13: Vzorec vitaminu E [60]

2.9 Systémy pro postupné uvolňování aktivních látek

Při vývoji nanočásticového transportního systému je důležité vzít v úvahu uvolňování léčiva, které je enkapsulované uvnitř nanočástice. Rychlost uvolňování enkapsulovaného léčiva závisí na několika faktorech. Prvním z nich je schopnost léčiva rozpouštět se, dále hraje roli desorpce neboli uvolňování léčiva. Podstatným faktorem je také schopnost léčiva difundovat skrze nanočásticovou matici a důležitá je i eroze, či degradace samotné matrice částic. Celková dynamika uvolňování léčiva může být výsledkem kombinace těchto procesů. Proces uvolňování tedy řídí rozpustnost, difúze a biodegradace matrice částic. Membrána slouží jako bariéra pro uvolňování léčiva, a proto se rozpustnost a difúze léčiva v polymerní membráně, nebo skrz ni, stávají klíčovými faktory pro uvolňování léčiva. Kromě toho může být rychlost uvolňování také ovlivněna iontovými interakcemi mezi léčivem a pomocnými složkami. Když zachycené léčivo interaguje s pomocnými složkami, může se vytvořit komplex méně rozpustný ve vodě, který může zpomalit uvolňování léčiva [80].

2.10 Instrumentální metody využívané při analýze nanostruktur a jejich vlastností

Pro studium struktury, charakteristik a stability připravených nanomateriálů lze využít různé instrumentální analytické metody, které umožňují posoudit fyzikální, chemické a strukturní vlastnosti těchto materiálů. Mezi tyto metody patří například dynamický rozptyl světla (DLS), UV/VIS spektrofotometrie, elektronová mikroskopie (TEM, SEM) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

2.10.1 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla, také známý jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazielastický rozptyl světla je technika, která primárně měří Brownův pohyb makromolekul částic v roztoku, který vzniká v důsledku srážek s molekulami rozpouštědla, a dává tento pohyb do souvislosti s velikostí částic. Takový pohyb makromolekul závisí na jejich velikosti, teplotě a viskozitě rozpouštědla. Znalost přesné teploty je klíčová pro správné měření na zařízení pro dynamický rozptyl světla, protože viskozita rozpouštědla je teplotě závislá. Pozorováním pohybu částic v čase lze získat informace o velikosti makromolekul. Velké částice difundují pomaleji, což vede k podobným polohám v různých časových bodech, na rozdíl od malých částic, které se pohybují rychleji [81].

2.10.2 UV/VIS spektrometrie

Ultrafialová a viditelná spektrometrie je technika, která slouží k provádění jak kvantitativních, tak kvalitativních analýz vzorků. Ultrafialové záření zaujímá spektrální oblast o vlnové délce 100–400 nm a viditelné oblast 400–800 nm. Spektrometrické metody se zaměřují na sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou za účelem studia struktury nebo stanovení koncentrace. Za klíčová kritéria spektrometrických metod jsou považovány skutečnosti, jestli dochází k absorpci nebo emisi záření ze strany zkoumané látky. V rámci absorpčních metod se pro kvantitativní vyhodnocení využívá vztah mezi měřenou veličinou (obvykle absorbancí A), počtem částic N (které absorbují monochromatické záření) v jednotkovém objemu a tloušťkou absorbujícího prostředí l [82][83].

Tento vztah je popsán v rovnici (1), kde ε_λ představuje konstantu známou jako monochromatický absorpční koeficient [84].

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

2.10.3 Chromatografie

Chromatografie je soubor metod, které se používají k oddělování složek obsažených ve vzorku. Umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. Základem této metody je použití dvou fází, z nichž jedna zůstává nepohyblivá (stacionární fáze) a druhá se pohybuje (mobilní fáze). Vzorek se aplikuje na start stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je vzorek unášen. Vzorky, které jsou stacionární fází poutány silněji, jsou separovány později než složky méně zadržované [85].

2.10.3.1 Typy chromatografie

Chromatografie se dělí podle několika kritérií. Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme plynovou chromatografii, kde mobilní fází je plyn a kapalinovou, kde mobilní fází je kapalina. Další dělení je podle uspořádání stacionární fáze, kde rozlišujeme kolonovou chromatografii, kde stacionární fáze je umístěna v koloně, dalším typem je papírová chromatografie,

kde stacionární fáze je součástí chromatografického papíru. Posledním typem je tenkovrstvá chromatografie, kde je stacionární fáze umístěna na pevném plochém podkladu.

Další dělení je podle děje, který probíhá při separaci. Podle tohoto dělení rozlišujeme chromatografii na adsorpční, kde při separaci rozhoduje schopnost složek adsorbovat se na povrchu stacionární fáze. Další známou formou je iontově-výměnná chromatografie, kde o separaci rozhodují přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku. Při gelové chromatografii se složky separují podle velikosti. Posledním typem je afinitní chromatografie, kde stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku specificky jen určité složky. Tato složka může být protein, enzym, DNA, RNA, malá molekula nebo jakákoliv jiná molekula s konkrétní afinitou k ligandu vázanému na stacionární fázi [86].

2.10.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie je v současné době považována za jednu z nejpoužívanějších analytických technik a nachází široké využití v různých odvětvích. Její všestrannost spočívá v tom, že umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu složek směsi během separace. Tato metoda je vysoce selektivní, citlivá a umožňuje rychlé provádění různých analýz. Pro analýzu je potřeba pouze malé množství vzorku a současně díky automatickému dávkovači lze celý postup plně automatizovat. Výstup z této analýzy se nazývá chromatogram, který poskytuje informace o obsahu a čistotě analyzované aktivní látky. V současné době je HPLC často využívána k separaci a čištění různých látek v oblastech farmacie, biotechnologie, ochrany životního prostředí a potravinářského průmyslu [87].

2.10.4.1 Instrumentace HPLC

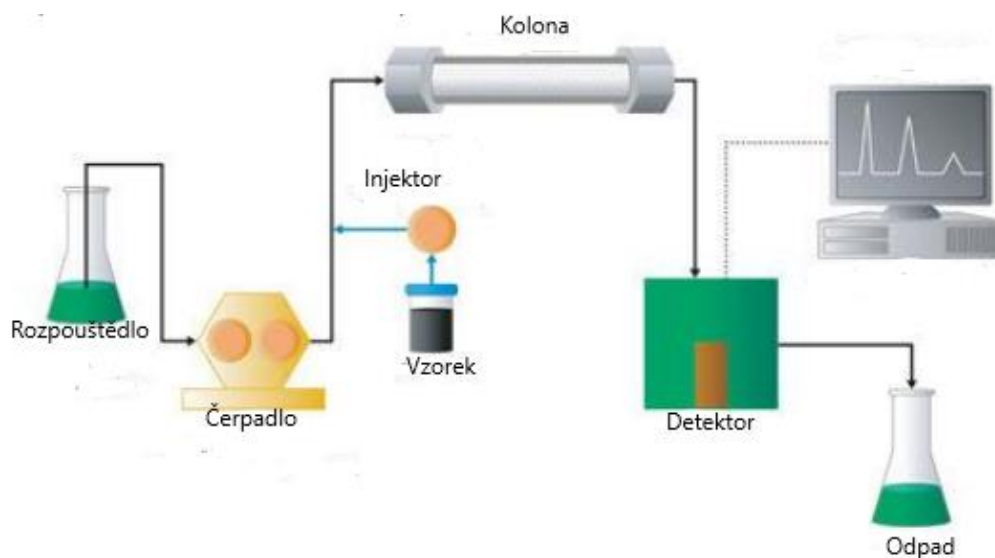
Základní sestava kapalinového chromatografu (Obrázek 14) zahrnuje části, které jsou odpovědné za transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, detekci, zaznamenávání signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu [89].

Čerpací systém neboli pumpa poskytuje přesný tok mobilní fáze do systému. Složení mobilní fáze může být během celé analýzy stálé, nebo se během separace může měnit [90].

Vzorkovač vnese směs vzorku do proudu mobilní fáze, který ji unáší do kolony. V dnešní době existují automatické dávkovače, které umí dávat vzorek do kolony bez přerušování toku mobilní fáze a zároveň s vysokou přesností objemu [91].

Předkolona je umístěná před hlavní chromatografickou kolonou. Slouží k předběžné separaci vzorku, odstranění nečistot a zbytků, které by mohly poškodit hlavní kolonu nebo zhoršit výsledky analýzy. Má velmi malé množství adsorbentu a zlepšuje životnost analytické kolony. Je ze stejného materiálu jako kolona a nepřispívá k separaci. Kvalita chromatografických metod a celého procesu nezáleží pouze na kvalitě použitého sorbentu, ale také na délce kolony, materiálu, ze kterého je vyroben a dalším faktorům. Kolony jsou obvykle vyrobeny z leštěné nerezové oceli, skla a polyethylenu nebo polyetheretherketonu. Délka kolony je obvykle kolem 50 mm až 300 mm a má vnitřní průměr kolem 2 mm až 5 mm [88][92].

Efektivita celé analýzy je ovlivněna volbou vhodného detektoru, který by měl splňovat požadavky, jako je vysoká citlivost a reprodukovatelnost. Detektory používané u kapalinové chromatografie mají nižší citlivost než detektory u plynové chromatografie. Mezi nejčastěji využívané detektory při kapalinové chromatografii patří UV detektory. Tyto detektory měří absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky, které projde celým detektorem spolu s eluátem. Při detekci léčiva je především využívána UV oblast spektra, následně viditelná a v minimální míře infračervená oblast spektra. Mezi další využívané detektory při kapalinové chromatografii patří fluorescenční detektor, refraktometrický detektor, elektrochemický detektor a hmotnostní detektor. Fluorescenční detektor je jeden z nejcitlivějších detektorů, zatímco detektor indexu lomu je nejméně citlivý. Ve speciálních aplikacích (např. analýza sacharidů) roste popularita detektoru rozptylu světla, ale bohužel, ačkoliv je tento typ detektoru univerzální, má citlivost jen o něco málo lepší než detektor indexu lomu [87][88][93].



Obrázek 14: Schéma HPLC [94]

3 CÍLE PRÁCE

V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Literární rešerše zaměřená na nanomateriály, jejich přípravu a charakterizaci, stabilitu, postupné uvolňování aktivních látek a instrumentální metody (HPLC)
- 2) Příprava nanomateriálů (částice a vlákna) z přírodních polymerů s enkapsulovanou aktivní antimikrobiální složkou
- 3) Optimalizace metody pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek z materiálů do různých modelových prostředí
- 4) Srovnání stability nosičových materiálů a použitelnosti funkcionalizovaných nanostruktur

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité na charakterizaci aktivních látek

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS, Sigma-Aldrich (Německo)
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma Aldrich (Německo)
Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)
Acetonitril, Penta (Česká republika)
Ethanol pro UV/VIS, Lach-ner (Česká republika)
Methanol, Honeywell (Německo)

4.1.2 Použité chemikálie na přípravu nanočástic

Chloroform, Penta (Česká republika)
Cholesterol, Sigma-Aldrich (Německo)
Lecithin, Sigma-Aldrich (Německo)
Polyhydroxybutyrát, Fakulta chemická (Česká republika)

4.1.3 Vybrané aktivní látky

Ampicilin, Sigma-Aldrich (Německo)
Carvacrol, Sigma-Aldrich (Německo)
Curcumin, Sigma-Aldrich (Německo)
Eugenol, Sigma-Aldrich (Německo)
Streptomycin, Sigma-Aldrich (Německo)
Thymol, Sigma-Aldrich (Německo)
 α -Tocopherol, Sigma-Aldrich (Německo)

4.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (Německo)
Centrifuga Mikro 120, Hettich (Německo)
Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf (Německo)
Fixed Speed Vortex Mixer, Ohaus (Čína)
Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific, Laboserv (Česká republika)
Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (Anglie)
Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat-Verkon (Česká republika)
Program Chromeleon 7
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Rotační zvlákňovací přístroj (prototyp)
Spektrofotometr Helios γ , Unicam (Anglie)
Třepačka Promax 1020, Heidolph (Německo)

Ultrazvukový homogenizátor, Bandelin Sonopuls HS3200, Sonorex Technik (Německo)
Vortex, TK3S, Kartellspa (Spojené státy americké)

Vysokotlaký kapalinový chromatograf UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (Spojené státy americké)

- Předkolona Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer C18, AJ0 – 4287, Phenomenex
- Kolona Kinetex C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2,6 μ m, Phenomenex
- DAD Vanquish, Thermo Fischer
- Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

Zetasizer ZS, Malvern (Velká Británie)

4.3 Stanovení antioxidační aktivity vybraných látek

ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l, společně s ABTS byl v destilované vodě rozpuštěn $K_2S_2O_8$ na koncentraci 2,45 mmol/l. Roztok byl ponechán stát ve tmě 12 hodin, díky čemuž se vytvořil roztok radikalkationu $ABTS^+$. Před použitím byl tento roztok zředěn ethanolem pro UV-VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při 734 nm. Jako blank byl použit ethanol. Z takto naředěného roztoku byl pipetován 1 ml do kyvety a k němu přidáno 10 μ l destilované vody a byla ihned změřena absorbance při 734 nm oproti ethanolu, což nám dalo absorbanci A_0 . Poté byl napipetován 1 ml roztoku $ABTS^+$ do zkumavky typu Eppendorf a přidáno 10 μ l vzorku. Zkumavka s roztokem byla promíchána a ponechána 10 minut ve tmě. Po uplynutí této doby byl roztok přelit do kyvety a byla změřena absorbance A_{10} při 734 nm. Pokles absorbance byl vypočten z rozdílu A_0 a A_{10} . Celková antioxidační aktivita byla vypočtena dosazením poklesu absorbance do kalibrační křivky Troloxu v rozmezí koncentrací 0,099 – 0,396 mg/ml. Trolox byl rozpuštěn v 60% ethanolu pro UV-VIS na předem vypočtené koncentrace a proměřen stejně jako vzorky. Vzorky i kalibrační roztoky byly analyzovány v triplicátech a hodnocena byla průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

4.4 Příprava částic

Byly připraveny liposomy prázdné i s enkapsulovanými aktivními látkami. Dále byl připraven 4% roztok polyhydroxybutyrátu na nanovlákná a na hybridní liposomy, které byly obohacené tímto roztokem, také byly připraveny částice prázdné i s enkapsulovanými aktivními látkami.

4.4.1 Příprava roztoku polyhydroxybutyrátu

Byl připravený roztok 4% PHB v chloroformu. Bylo navážené určité množství polyhydroxybutyrátu, které bylo rozpuštěné v daném množství chloroformu. Směs byla dána na magnetickou míchačku při 70 °C až do úplného rozpuštění polyhydroxybutyrátu. Takto připravený roztok PHB byl použit při dalším měření.

4.4.2 Příprava liposomů

Liposomové částice (prázdné, kontrolní) byly připravovány z lecitinu a cholesterolu. Bylo naváženo 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu, tyto navážky byly přidány k 1 ml chloroformu. Tato směs byla přidána k 10 ml destilované vody.

Při přípravě liposomů s aktivní látkou byla k této směsi přidána odpovídající navážka kurkuminu, karvakrolu, eugenolu, tymolu, vitamínu E, ampicilinu a streptomycinu. Aktivní látky byly přidány ve třech různých koncentracích, konkrétně 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml.

Připravená směs byla ultrazvukována při chlazení ve vodní lázni, a pak dána na magnetickou míchačku z důvodu odpaření chloroformu. Zbylý obsah byl dán do centrifugy při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl supernatant odlit a dále zcentrifugovaný při 11 000 otáčkách po dobu 1 hodiny. Supernatant byl odpipetovaný a byly získány liposomy.

4.4.3 Příprava liposomů s polyhydroxybutyrátem

Při přípravě hybridních liposomových částic s PHB byl připravený roztok 4% PHB, jak je uvedeno v kapitole 4.4.1. Při přípravě liposomů bylo naváženo 60 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu, tyto navážky byly přidány ke 4% roztoku PHB, tak aby roztok PHB představoval 30% podíl z celkové hmotnosti liposomů.

U liposomů s aktivní látkou byly k této směsi naváženy kurkumin, karvakrol, eugenol, tymol, vitamin E a ampicilin. Tyto látky byly přidány ve třech různých koncentracích, a to 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml. Takto připravená směs byla přidána k 10 ml destilované vody a byl proveden stejný postup, jako v kapitole 4.4.2.

4.5 Charakterizace částic

U připravených liposomů byl měřen zeta potenciál, enkapsulační aktivita, účinnost a byla sledována jejich stabilita v různém prostředí.

4.5.1 Stanovení stability

Stanovení stability připravených liposomů bylo provedeno na přístroji Malvern Zetasizer. Stabilita byla určována pomocí zeta potenciálu. Připravené liposomy byly také rozsuspendovány ve dvou prostředích (destilovaná voda a fyziologický roztok), před samotným měřením byly 100krát zředěny destilovanou vodou. Takto připravený vzorek s liposomy byl dán do Dip cely, která byla poté vložena do přístroje. Z naměřené hodnoty zeta potenciálu byla určena stabilita částic. Liposomy, které měly hodnotu zeta potenciálu menší než -30 mV a větší než 30 mV byly vyhodnoceny jako stabilní. Zeta potenciál byl změřen nejprve v čase nula, ihned po přípravě liposomů.

4.5.1.1 Stanovení dlouhodobé stability

Za účelem stanovení dlouhodobé stability byl po dvou týdnech změřen znovu Zeta potenciál připravených liposomů podle postupu, který se uveden v bodě 4.5.1. a byl porovnán se Zeta potenciálem, který měly liposomy bezprostředně po jejich přípravě.

4.5.2 Spektrofotometrické stanovení enkapsulační aktivity

Byly připraveny liposomy (s 30% PHB i bez PHB) s koncentrací aktivních látek 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml podle postupu v bodě 4.4.3. Připravené liposomy byly ponechány v lyofilizátoru po dobu 24 h. Poté byly rozpuštěny v chloroformu a u takto upravených vzorků byla změřena absorbance. Ze získaných hodnot byla pomocí kalibrační křivky vypočítána enkapsulační aktivita.

Poněvadž spektrofotometrická analýza sloužila v této práci pouze jako srovnávací, absorpční maxima a kalibrační křivky jednotlivých aktivních látek byly převzaty z předchozí diplomové práce [97], na kterou předložená práce bezprostředně navazovala (Tabulka 2).

Tabulka 2: Absorpční maxima a kalibrační přímky aktivních látek [97]

Látka	Absorpční maximum λ [nm]	Koncentrační rozsah	Rovnice přímky	R
Eugenol	281	5,0 - 2 $\mu\text{g/ml}$	$y = 0,0199 \cdot x$	0,9987
Tymol	275	10 - 70 $\mu\text{g/ml}$	$y = 0,0148 \cdot x$	0,9922
Kurkumin	419	1 - 6,5 $\mu\text{g/ml}$	$y = 0,1522 \cdot x$	0,9997
Karvakrol	276	10 - 80 $\mu\text{g/ml}$	$y = 0,0125 \cdot x$	0,9988

4.5.3 Enkapsulační účinnost

Byly připraveny liposomy podle postupu, který je uveden v bodě 4.4.3. Po centrifugaci při 11 000 ot./min po dobu jedné hodiny byl odebraný supernatant, který byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie. Veškeré vzorky bylo nutno před analýzou vhodně naředit a přefiltrovat přes nylonový filtr s póry o velikosti 0,45 μm . Vzorky byly poté připraveny do vialek.

Parametry chromatografické analýzy jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 3; Tabulka 4; Tabulka 5; Tabulka 6) a sestrojené kalibrační křivky v tabulce (Tabulka 7). Podmínky analýzy byly optimalizovány pro jednotlivé látky, kalibrační křivky byly sestrojeny s využitím kalibračních standardů čistých látek v adekvátním koncentračním rozmezí.

Tabulka 3: Parametry HPLC metody pro stanovení eugenolu, karvakrolu a tymolu

Doba analýzy	20 minut		
Kolona	Kinetex C18; 2,5 µm; 100 Å; 150 mm x 4,6 mm		
Teplota	25 °C		
Objem nástřiku	20 µl		
Mobilní fáze	A: 0,01% trifluoroctová kyselina v MiliQ		
	B: acetonitril		
Eluce	gradientová		
	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	75	25
	1	75	25
	5	60	40
	10	45	55
	12	30	70
	20	75	25
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min		
Detektor	UV-VIS 280 nm		

Tabulka 4: Parametry HPLC metody pro stanovení vitamínu E

Doba analýzy	25 minut		
Kolona	Kinetex C18; 2,5 µm; 100 Å; 150 mm x 4,6 mm		
Teplota	25 °C		
Objem nástřiku	20 µl		
Mobilní fáze	A: ACN:MeOH:Tris HCl (84:2:14)		
	B: MeOH:Ethylacetát (60:40)		
Eluce	gradientová		
	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	13	0	100
	19	0	100
	20	100	0
	25	100	0
Průtok mobilní fáze	1,2 ml/min		
Detektor	UV-VIS 285 nm		

Tabulka 5: Parametry HPLC metody pro stanovení kurkuminu

Doba analýzy	20 minut		
Kolona	Kinetex C18; 2,5 µm; 100 A; 150 mm x 4,6 mm		
Teplota	25 °C		
Objem nástřiku	20 µl		
Mobilní fáze	A: 0,01% trifluoroctová kyselina v MiliQ		
	B: acetonitril		
Eluce	gradientová		
	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	45	55
	1	30	70
	5	0	100
	10	0	100
	12	45	55
	20	45	55
Průtok mobilní fáze	1 ml/min		
Detektor	UV-VIS 425 nm		
Doba promývání	0 minut		

Tabulka 6: Parametry HPLC metody pro stanovení ampicilinu

Doba analýzy	20 minut
Kolona	Kinetex C18, 2,6 µm, 100 A, 150 mm x 4,6 mm
Teplota	25 °C
Objem nástřiku	20 µl
Mobilní fáze	A: 0,01% trifluoroctová kyselina v MiliQ B: acetonitril
Eluce	izokratická poměr 80:20 (A:B)
průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Detektor	UV-VIS 210 nm
Doba promývání	1 minuta

Naměřené hodnoty byly vyhodnocovány pomocí programu Chromeleon 7, kde byly integrovány plochy pod křivkou jednotlivých píků. Podle obsahů a rovnic kalibračních přímk (Tabulka 7) byly vypočítány odpovídající koncentrace aktivních látek ve vzorcích.

Tabulka 7: Rovnice kalibračních přímek optimalizovaných metod kapalinového chromatografu (ponz. A [mAU·min], c [mg/ml])

Aktivní látka	Rovnice kalibrační přímky
ampicilin	$A=8408,5 \cdot c$; $R=0,9830$
eugenol	$A=5610,4 \cdot c$; $R=0,9998$
karvakrol	$A=1963,2 \cdot c$; $R=0,9999$
tymol	$A=3767,6 \cdot c$; $R=0,9997$
kurkumin	$A=37441 \cdot c$; $R=0,9950$
vitamin E	$A=640,9 \cdot c$; $R=0,9999$

4.5.4 Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z připravených liposomů

Postupné uvolňování aktivních látek z liposomů bylo sledováno metodou kapalinové chromatografie. Množství uvolněných látek u připravených liposomů bylo sledováno ve třech prostředích, konkrétně uvolnění do destilované vody a do fyziologického roztoku při laboratorní teplotě (25 °C) a při teplotě 37 °C na třepačce.

Z připravených suspenzí liposomových částic vytvořených pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru byl vždy 1 ml odebrán do zkumavky typu Eppendorf. Roztoky byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při 6 000 ot/min. Následně byl přelit supernatant, který byl centrifugován 1 hodinu při 11 000 ot/min. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a k precipitátu tvořeném částicemi byl přidán 1 ml daného prostředí (destilovaná voda nebo fyziologický roztok). Částice byly v daném prostředí rozsuspendovány a takto ponechány po potřebnou dobu. Částice v prostředí fyziologického roztoku byly ponechány na třepačce při teplotě 37 °C. Další částice ve fyziologickém roztoku a destilované vodě byly ponechány při laboratorní teplotě. Časově intervaly měření byly 1, 10 hodin, dále 1, 2 a 3 dny. Po uplynutí určené doby byly liposomy s obsahem aktivní látky dány do centrifugy (60 minut, 11 000 ot/min) a supernatant byl ponechán k analýze na HPLC.

Analýza uvolněného množství aktivní látky proběhla na kapalinovém chromatografu (HPLC). Byla optimalizovaná metoda na stanovení eugenolu, tymolu a karvakrolu, podle které byly látky poté stanoveny (Tabulka 3). Parametry metody jsou uvedeny tabulce (Tabulka 3). Kalibrační křivky pro výpočet jsou v tabulce (Tabulka 7).

4.6 Příprava nanovláken pomocí odstředivého zvlákňování

Nanovlákná byla získána ze 4% roztoku PHB, jehož příprava je popsána v kapitole 4.4.1. Bylo odebráno 20 ml tohoto roztoku, který byl pomocí automatické pipety postupně přikapáván na očištěný rotor aparatury na odstředivé zvlákňování (prototyp, FCH VUT v Brně). Byla

připravena vlákna ze samotného PHB a dále vlákna, která byla obohacena o antimikrobiální látku (eugenol, karvakrol, tymol), přidanou v množství, které odpovídalo 5 % a 10 % PHB. Takto připravená vlákna byla uchována ve tmě a při laboratorní teplotě v plastových Petriho miskách pro další měření.

4.7 Charakterizace nanovláken

Byly připravená nanovlákna s enkapsulovanou aktivní látkou (5% a 10%) podle postupu, který je uveden v bodě 4.6. U připravených nanovláken bylo proměřeno postupné uvolňování aktivních látek.

4.7.1 Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanovláken

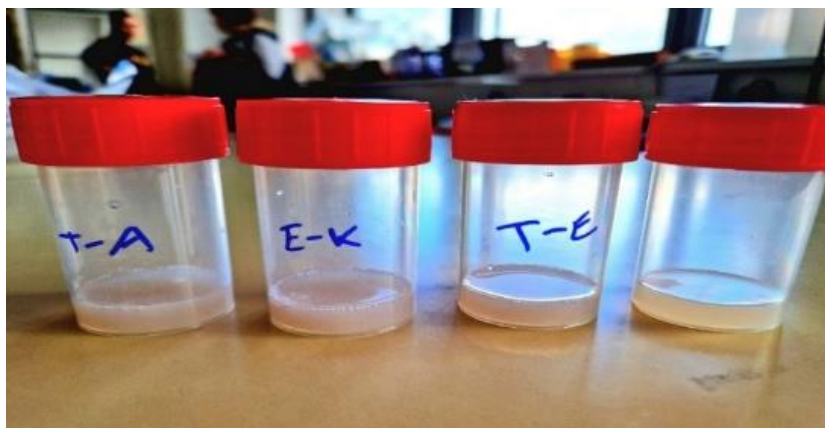
Uvolňování aktivních látek probíhalo ve třech různých prostředích, a to v destilované vodě, ve fyziologickém roztoku při laboratorní teplotě (25 °C) a zahřátém fyziologickém roztoku na teplotu 37 °C. Do zkumavky typu Eppendorf byl vložen 1 cm² připraveného nanomateriálu a následně byl přidán 1 ml prostředí. Takto připravené vzorky byly ponechány buď ve skřínce nebo na vyhřáté třepačce.

Bylo stanoveno krátkodobé uvolňování, v řádu hodin a minut, konkrétně po 5, 15, 30 minutách, 1 hodině a 2 hodinách. Další stanovení bylo dlouhodobé, a to v rámci dnů - po 1, 2, 3, 4 a 5 dnech. Ze zkumavky po uplynuté době bylo vyjmuto vlákno a získaný roztok byl přefiltrován a nachystán jako vzorek do skleněné vialky.

Analýza uvolněného množství aktivní látky proběhla na vysokotlakém kapalinovém chromatografu (HPLC). Parametry metody jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3). Pro výpočet koncentrace uvolněné látky byly použity kalibrační přímky, které jsou uvedené ve v tabulce výše (Tabulka 7).

4.8 Příprava kombinovaných nanomateriálů

Pro přípravu kombinovaných nanomateriálů byly vystřiženy čtverce nanovláken o velikosti 1 cm², které byly předem zváženy. Byly připraveny liposomy s 30% PHB a enkapsulovanými aktivními látkami (ampicilin, eugenol, karvakrol, tymol) podle postupu uvedeného v bodě 4.4.3. Připravené liposomy byly rozsuspendovány v destilované vodě. Takto připravený roztok liposomů byl přelit do plastové nádoby k nanovláknům. Tyto nádoby byly ponechány na třepačce při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly nanovlákna vyndána a sušena do úplného vysušení. Vysušená kombinovaná nanovlákna byla následně použita na analýzu uvolňování aktivních látek.



Obrázek 15: Příprava kombinovaných nanomateriálů

4.8.1 Sledování morfologie připravených kombinovaných nanomateriálů

Navázání PHB částic na PHB vlákna bylo pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem. Byl připraven 0,1% roztok Nilské červení v destilované vodě. Do tohoto roztoku byl přidán připravený kombinovaný materiál a vše bylo po dobu 5 minut inkubováno ve tmě. Po následném promytí destilovanou vodou bylo sledováno navázání částic na vlákna prostřednictvím fluorescence vyvolané vazbou barviva na nanostruktury. Druhé měření probíhalo ponořením nanomateriálu do 0,025% roztoku Bodipy. Emise byla očekávaná při 504 nm pro Bodipy a při 557 nm u Nilské červení. Pro měření byl použit excitační filtr B - 2A, který má rozmezí vlnových délek 450 – 490 nm.

4.8.2 Stanovení množství účinné látky v kombinovaných nanomateriálech

Byly připravené kombinované nanomateriály podle postupu, který je uveden v bodě 4.8. Do vláken nebyla enkapsulovaná žádná aktivní látka a do částic byly enkapsulované aktivní látky v koncentraci 1 mg/ml (eugenol, karvakrol, tymol). Byl připraven čtvereček o rozměrech 1 cm². Takto připravený materiál byl rozpuštěn v chloroformu a připravený roztok byl proměřen na spektrofotometru.

4.8.3 Postupné uvolňování aktivních látek z kombinovaných nanomateriálů

Byly připravené kombinované nanomateriály podle postupu v bodě 4.8. Takto připravené nanomateriály byly vloženy do dvou modelových prostředí, konkrétně do fyziologického roztoku při laboratorní teplotě (25 °C) a fyziologického roztoku při teplotě 37 °C. Bylo sledováno postupné uvolňování v pěti intervalech (1 hodina, 10 hodin, 1 den, 2 dny a 3 dny). Po uplynutí potřebné doby byl kombinovaný nanomateriál vytažen z modelového prostředí, to bylo přefiltrováno a zředěno podle potřeby k analýze na HPLC. Takto připravený roztok byl proměřen na HPLC, kde bylo sledované postupné uvolňování enkapsulovaných látek. Parametry měření jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 3; Tabulka 6) a kalibrační křivky v tabulce (Tabulka 7).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním nově připravených antimikrobiálních nanomateriálů na bázi nanočástic (liposomů a PHB-liposomů) a nanovláken (PHB) a sledováním jejich stability v různých prostředích pomocí kapalinové chromatografie. Během experimentální části byla proměřena též antioxidační aktivita pěti aktivních látek (eugenol, karvakrol, kurkumin, tymol a vitamin E).

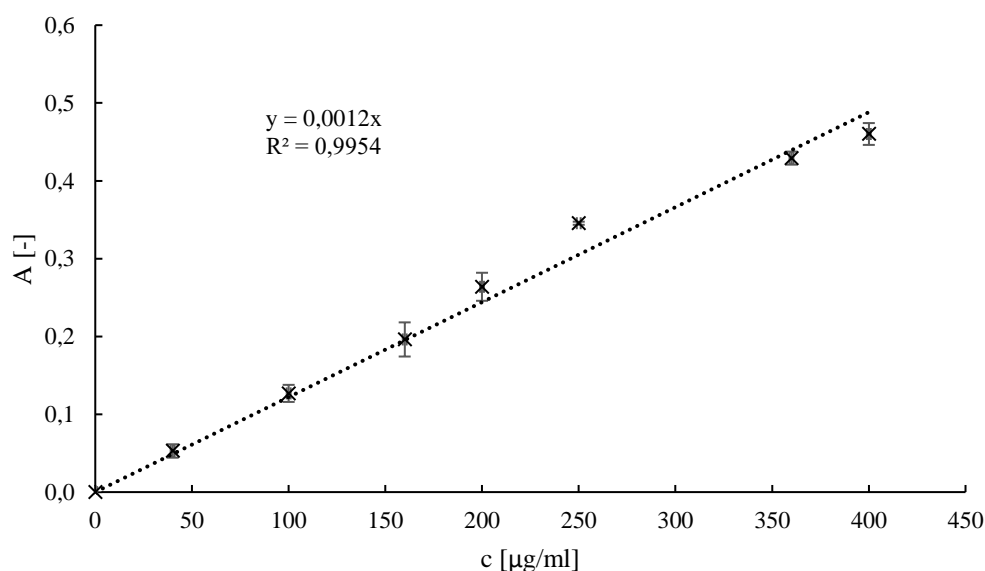
Dále byly připraveny nanočástice s a bez polymeru PHB (polyhydroxybutyrát) s enkapsulovanými aktivními látkami. Tyto připravené částice byly analyzovány z hlediska koloidní stability pomocí zeta potenciálu, dále byla proměřena enkapsulační účinnost. Poté bylo analyzováno postupné uvolňování enkapsulovaných látek.

Dalším krokem byla příprava PHB nanovláken pomocí forcespinningu, do kterých byly enkapsulovány aktivní látky, konkrétně eugenol, karvakrol a tymol, vždy ve dvou koncentracích (5% a 10%). Bylo sledováno postupné uvolňování těchto látek do třech modelových prostředí.

Nakonec byly vybrány tři varianty kombinací pro přípravu kombinovaných nanomateriálů částice/vlákná: tymol-eugenol, tymol-ampicilin a eugenol-karvakrol. U těchto připravených nanomateriálů bylo opět zkoumáno postupné uvolňování enkapsulovaných látek jak z částic, tak z vláken.

5.1 Stanovení antioxidační aktivity

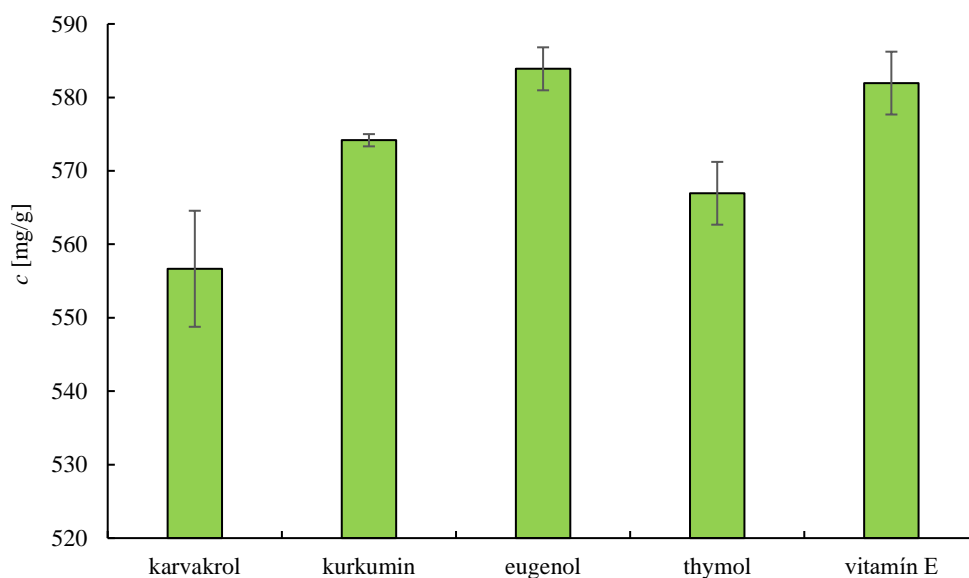
Prvně byla sestavena kalibrační řada vzorků Troloxu, pomocí které byla vytvořena kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci (Obrázek 16). Kalibrační závislost byla použita ke stanovení antioxidační aktivity vybraných studovaných látek.



Obrázek 16: Kalibrační křivka antioxidační aktivity

5.1.1 Antioxidační aktivita vybraných látek

Antioxidační aktivita byla změřena podle postupu uvedeného v bodě 4.3. Pro výpočet obsahu antioxidačních látek byla použita kalibrační křivka Troloxu (viz Obrázek 16).



Obrázek 17: Grafické znázornění antioxidační aktivity vybraných látek

Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u eugenolu, kde nabývala hodnoty $583,89 \pm 2,93$ mg/g. Druhou nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vitamín E s hodnotou $581,94 \pm 4,28$ mg/g. Antioxidační aktivita mezi těmito dvěma látkami se moc nelišila, proto lze obě považovat za dva nejlepší antioxidanty z vybraných látek. Z grafu (Obrázek 17) je patrné, že tymol je o něco lepším antioxidantem než karvakrol. Tato skutečnost je způsobena větší sterickou zábranou fenolové skupiny v tymolu než v karvakrolu. K podobným výsledkům došla i studie od *Yanishlieva a kol.* [95].

5.2 Optimalizace metody pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek

Optimalizace metody pro sledování kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek z materiálů do různých prostředí představuje klíčovou roli pro výzkum zaměřený na využití těchto materiálů ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Tato optimalizace přispívá k rozvoji nových antimikrobiálních nanomateriálů, které mohou přispět v boji proti rozvíjející se antibiotické rezistenci.

V této práci byly použity metody spektrofotometrie, vysokoúčinné kapalinové chromatografie a mikroskopie. Byly použity vždy tři modelová prostředí, konkrétně destilovaná voda, fyziologický roztok při teplotě 25 °C a fyziologický roztok při teplotě 37 °C. Výběr prostředí pro studium kinetiky uvolňování enkapsulovaných látek byl proveden

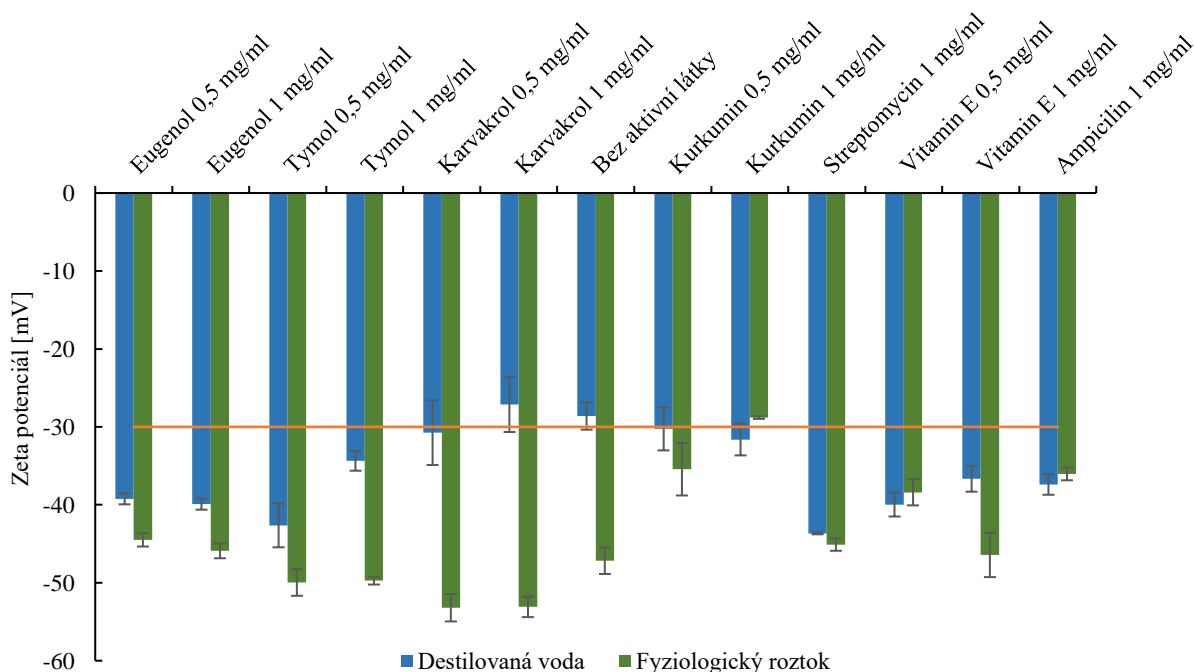
s ohledem na simulaci různých reálných podmínek, ve kterých by mohly být tyto látky uvolněny. Destilovaná voda byla zvolena jako modelové prostředí, které představuje minimální obsah iontů a nečistot, což umožnilo sledovat základní procesy uvolňování bez ovlivňování od ostatních látek. Fyziologický roztok při teplotě 25 °C byl zvolený, protože simuluje podmínky přibližné teploty povrchu těla. Fyziologický roztok při teplotě 37 °C byl zahrnut jako modelové prostředí, které přesně simuluje teplotu lidského těla. Tato teplota hraje důležitou roli při experimentech, protože většina biologických procesů probíhá právě při této teplotě. Bylo pozorováno postupné uvolňování a stabilita enkapsulovaných aktivních látek z připravených nanomateriálů do uvedených prostředí kinetickým měřením pomocí kapalínové chromatografie. V závěru této práce jsou přehledně shrnuty výsledky experimentální části.

5.3 Charakterizace připravených částic

Byly připraveny dva druhy nanočástic, a to liposomy s přídavkem 30% PHB a bez jeho přídavku. Nanočástice byly připraveny s enkapsulovanou aktivní složkou podle postupu uvedeného v bodě 4.4. U takto připravených částic byla stanovena stabilita a enkapsulační účinnost. Dále bylo analyzováno postupné uvolňování enkapsulované látky pomocí HPLC.

5.3.1 Stanovení stability částic

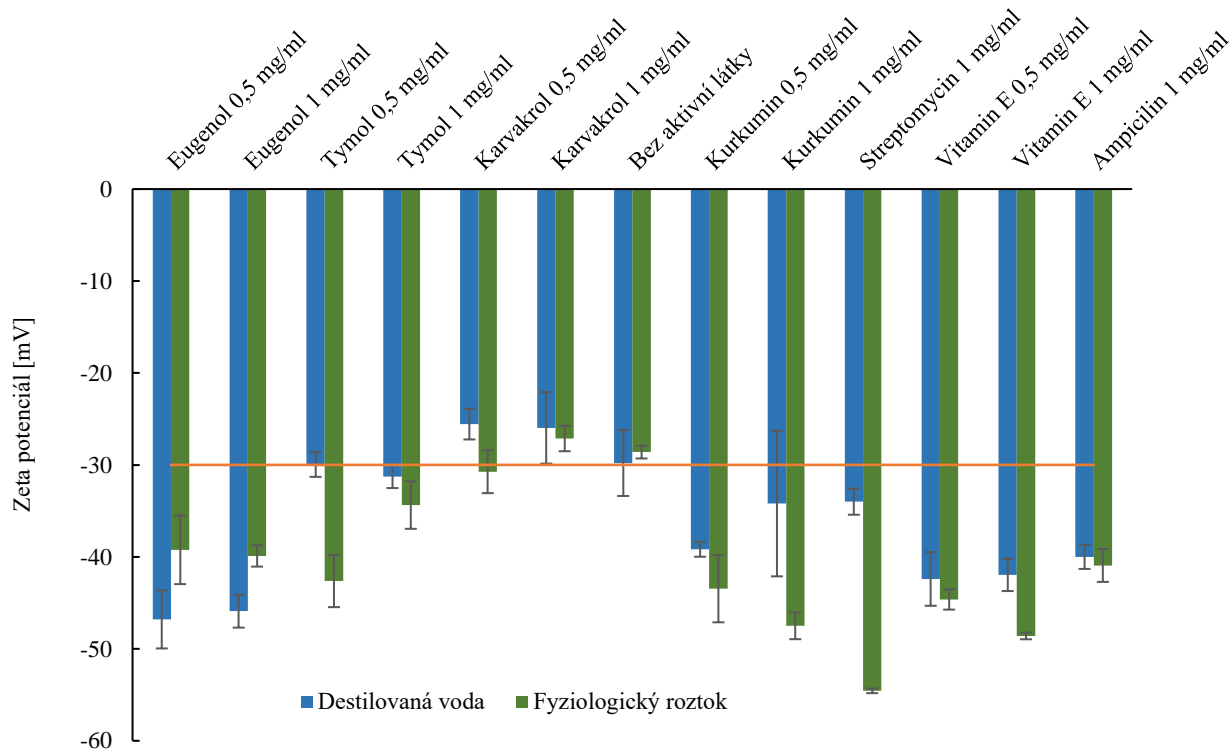
Stabilita nanočástic byla stanovena pomocí vyhodnocení zeta potenciálu, který byl měřen na přístroji ZetaSizer, jak je uvedeno v bodě 4.5.1. Krátkodobá stabilita byla stanovena ihned po přípravě částic.



Obrázek 18: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů bez přídavku PHB

U připravených liposomů byl změřen zeta potenciál hned po přípravě. Výsledky měření připravených liposomů bez přídavku PHB jsou uvedeny v grafu (Obrázek 18). Stabilní částice

nabývají hodnoty zeta potenciálu vyšší nebo nižší než v intervalu od -30 do +30 mV. Naměřené hodnoty se nachází téměř všechny mimo toto rozpětí, proto je lze považovat za stabilní. Částice, které byly rozsuspendovány v destilované vodě byly méně stabilní než částice ve fyziologickém roztoku. Nejvíce stabilní byly částice, které měly enkapsulovanou aktivní látku karvakrol v obou koncentracích rozsuspendované ve fyziologickém roztoku, jejichž hodnoty bylo kolem -50 mV. Naopak v destilované vodě byly tyto liposomy s touto aktivní látkou stabilní méně.

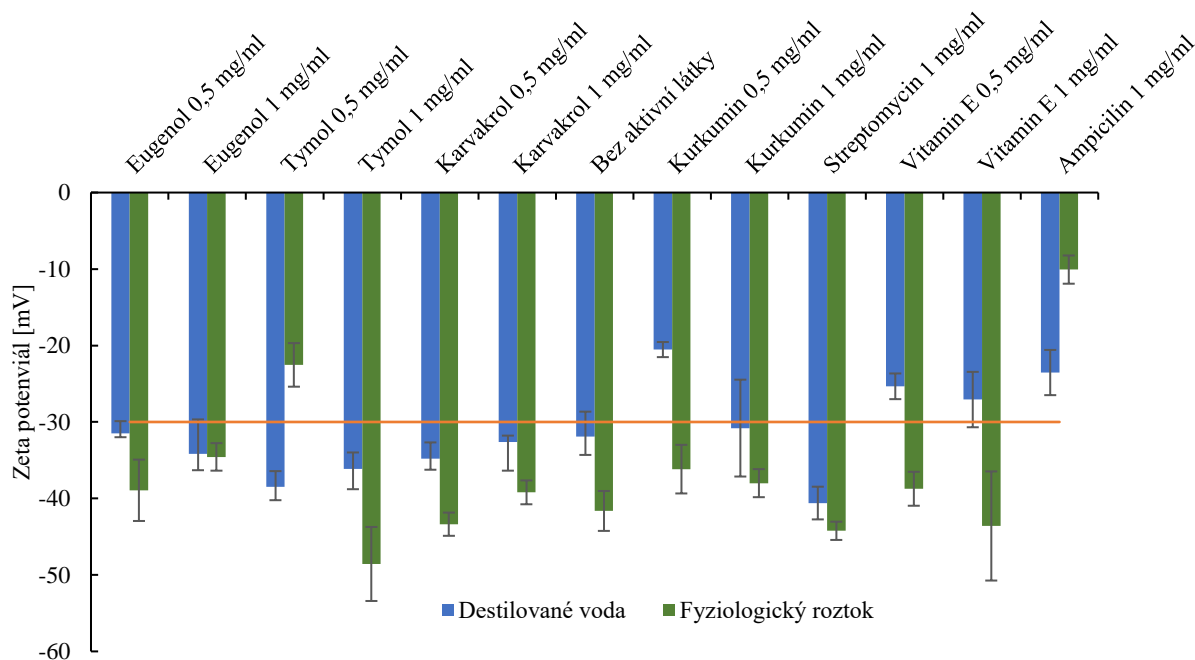


Obrázek 19: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů s přidavkem PHB

V grafu (Obrázek 19) jsou zobrazeny hodnoty zeta potenciálu u liposomových částic s přidavkem 30% PHB změřené hned po přípravě. Z grafu je patrné, že vyšší stabilitu vykazovaly liposomy rozsuspendované ve fyziologickém roztoku, až na částice obsahující aktivní látku eugenol, ty byly stabilnější v destilované vodě. Částice s přidavkem PHB vykazovaly podobnou stabilitu jako liposomy bez PHB až na částice, které měly enkapsulovaný karvakrol, ty byly s přidavkem polyhydroxybutyrátu méně stabilní než bez přidavku PHB.

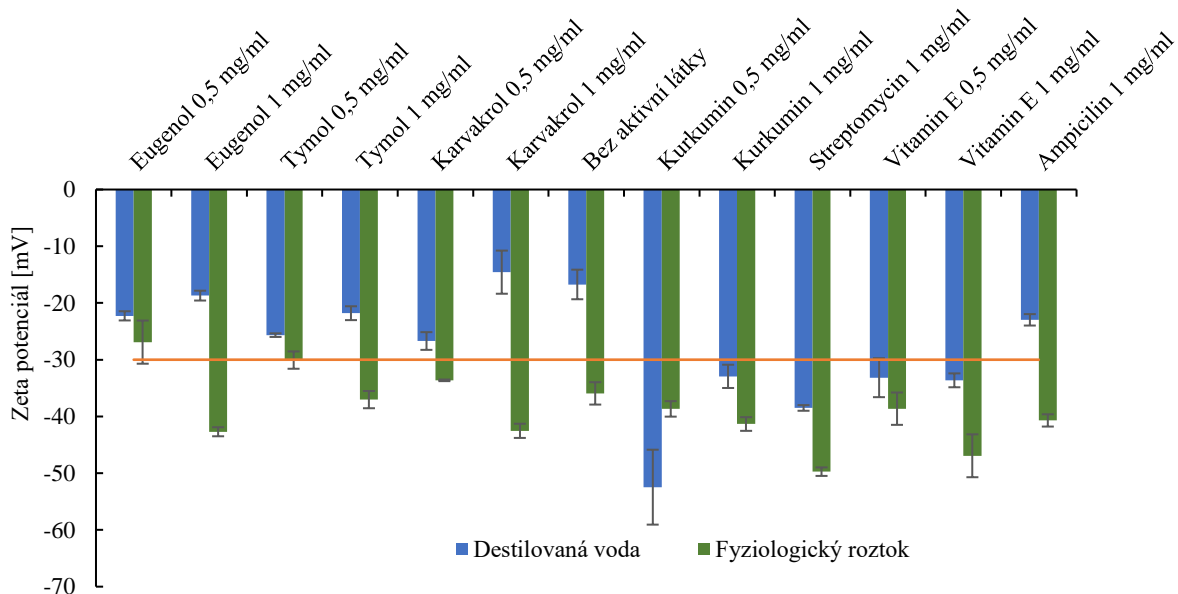
5.3.1.1 Dlouhodobá stabilita

Dlouhodobá stabilita byla změřena po dvou týdnech, kdy byly částice po dobu dvou týdnů ponechány při laboratorní teplotě a na třepačce při teplotě 37 °C ve dvou různých modelových prostředích.



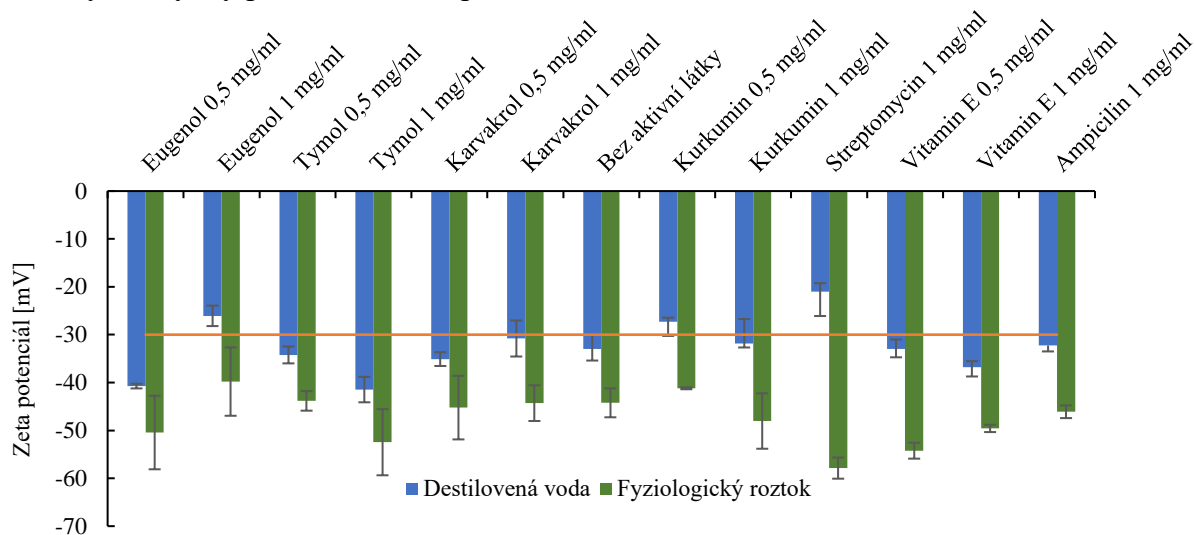
Obrázek 20: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů bez přídavku PHB po 2 týdnech při laboratorní teplotě

Po uplynutí doby dvou týdnů byly jednotlivé liposomy, které byly ponechány při laboratorní teplotě stanovené opět na přístroji ZetaSizer. Výsledky jsou uvedené v grafu (Obrázek 20). Hodnota jejich zeta potenciálu mírně klesla, ale stále se držela mimo rozpětí 30mV až +30 mV, z čehož vyplývá, že liposomy je možné považovat za stabilní i po dvou týdnech. Liposomy rozsuspendované ve fyziologickém roztoku byly stabilnější než v destilované vodě. Je možné pozorovat, že částice, které měly enkapsulovaný ampicilin po dvou týdnech stabilní už nebyly, zatímco ostatní zůstaly stabilní.



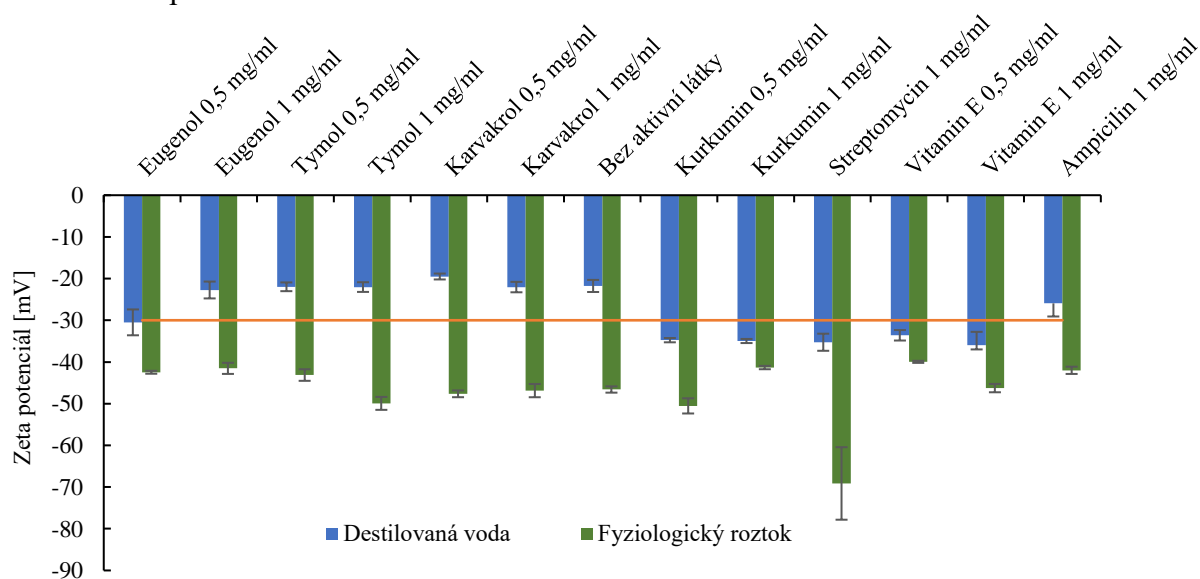
Obrázek 21: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů bez přídavku PHB po 2 týdnech při teplotě 37 °C

Liposomy bez přídavku PHB byly po dobu dvou týdnů ponechány při teplotě 37 °C na třepače. Výsledky měření lze vidět v grafu (Obrázek 21). V prostředí destilované vody spadá jejich hodnota do rozpětí -30 mV až 30 mV a nejsou považovány za stabilní, na rozdíl od těch, které byly inkubovány při laboratorní teplotě. Liposomy ve fyziologickém roztoku byly stále stabilní, avšak hodnota jejich zeta potenciálu byla nižší než u liposomů, které byly ponechány dva týdny při laboratorní teplotě.



Obrázek 22: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů s přídavkem PHB po 2 týdnech při laboratorní teplotě

V průběhu měření bylo zjištěno, že částice s přídavkem PHB byly stabilní i po uplynutí doby dvou týdnů, a to jak v destilované vodě, tak ve fyziologickém roztoku (Obrázek 22). Hodnoty zeta potenciálu byly vyšší u částic, které byly rozsuspendovány ve fyziologickém roztoku, stejně jako hned po přípravě. Přídavek PHB tedy přispívá k vyšší dlouhodobé stabilitě částic při laboratorní teplotě.



Obrázek 23: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu u liposomů s přídavkem PHB po 2 týdnech při teplotě 37 °C

Po uplynutí doby dvou týdnů byly proměřeny i liposomy, které byly ponechány při teplotě 37 °C s přídatkem PHB. V grafu (Obrázek 23) je možné pozorovat, že liposomy ve fyziologickém roztoku byly stabilní i po této době, ale hodnota jejich zeta potenciálu byla opět nižší než u liposomů, které byly ponechány při laboratorní teplotě. Naopak částice, které byly rozsuspendovány v destilované vodě již stabilitu nevykazovaly, protože hodnota jejich zeta potenciálu byla kolem -20 mV.

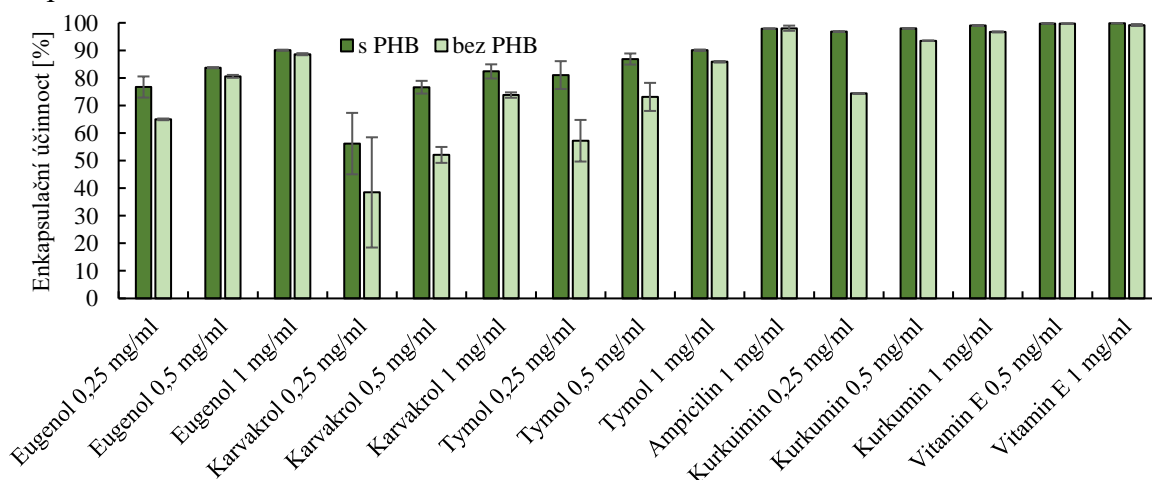
Z výše uvedených grafů výsledků naměřeného zeta potenciálu lze vyvodit závěr, že liposomy, které byly připraveny bez přídatku polymeru polyhydroxybutyrátu byly stabilní hned po přípravě, kdy hodnoty jejich zeta potenciálu se nacházely mimo rozpětí -30 až +30mV. Liposomy, které byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu dvou týdnů prokazovaly vyšší stabilitu než ty, které byly inkubovány na třepačce při teplotě 37 °C. V grafu (Obrázek 23) lze pozorovat stabilitu liposomů, které byly inkubovány při teplotě 37 °C. Jejich stabilita klesla, a to zejména v prostředí destilované vody.

Liposomy, které byly připraveny s přídatkem PHB byly změřeny opět hned po přípravě a poté po 2 týdnech. Přídatek polyhydroxybutyrátu měl na stabilitu liposomů různý vliv. Hodnota zeta potenciálu se lišila při použití různých aktivních látek. Částice, které měly enkapsulovaný karvakrol, vykazovaly hned po přípravě nižší stabilitu než ty bez PHB. Částice s ostatními aktivními látkami vykazovaly naopak stabilitu vyšší s přídatkem PHB.

Liposomy, které byly rozsuspendované ve fyziologickém roztoku, měly obecně vyšší stabilitu než ty v destilované vodě. Toto zjištění naznačuje, že prostředí má významný vliv na stabilitu částic. Liposomy, které byly inkubovány na třepačce při teplotě 37 °C měly o něco nižší hodnotu zeta potenciálu než ty, které byly ponechány ve fyziologickém roztoku při teplotě 25 °C. To mohlo být způsobené mechanickým zatížením liposomů při inkubaci na třepačce, což mohlo vést ke snížení jejich stability.

5.3.2 Enkapsulační účinnost

Byla stanovena enkapsulační účinnost pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Postup měření je uveden v bodě 4.5.4. Všechny vzorky byly připraveny a analyzovány v duplikátech.



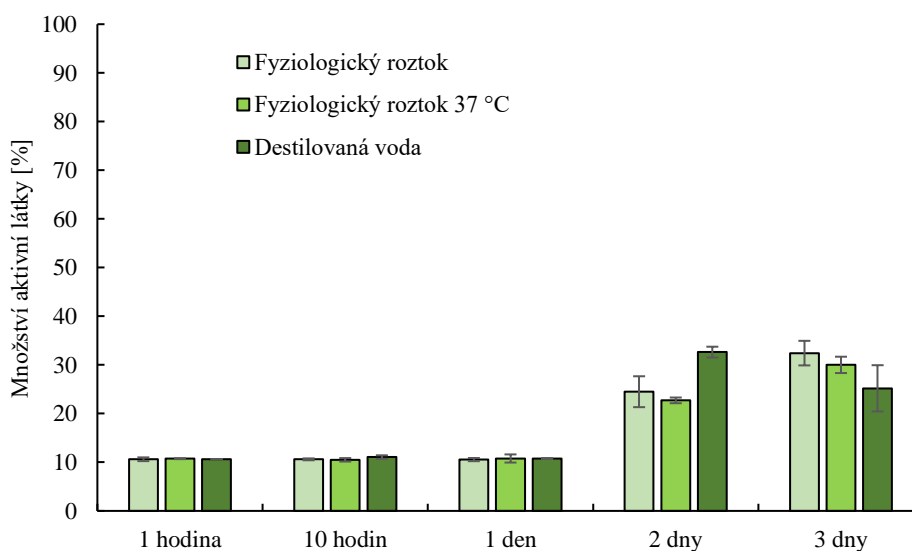
Obrázek 24: Enkapsulační účinnost připravených liposomů

Enkapsulační účinnost byla proměřena u liposomů které měly enkapsulovaných šest různých aktivních látek, většinou ve třech koncentracích (0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml), ampicilin byl pouze v koncentraci 1 mg/ml a vitamin E ve dvou (0,5mg/ml; 1 mg/ml). Byly analyzovány liposomy s přídatkem PHB i bez něj. Vyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u liposomů s přídatkem PHB, kromě ampicilinu a vitaminu E, kde byla téměř shodná. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zjištěna u vitaminu E, a to 99,69 %±0,10 %. Výsledná enkapsulační účinnost naznačuje optimální interakci mezi vitaminem E a liposomální membránou, která vedla k efektivní enkapsulaci. Naopak nejnižší enkapsulační účinnost byla změřena u liposomů bez PHB s aktivní látkou karvakrol, a to 38,47 %±20,00 %.

Z výše uvedených výsledků byly pro další analýzy kinetiky uvolňování vybrány liposomy s přídatkem PHB, a s enkapsulovanými látkami eugenol, karvakrol a tymol. Tyto aktivní látky byly přidávány vždy v koncentraci 1 mg/ml, z důvodu dostatečně citlivé detekce těchto látek na HPLC.

5.3.3 Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanočástic

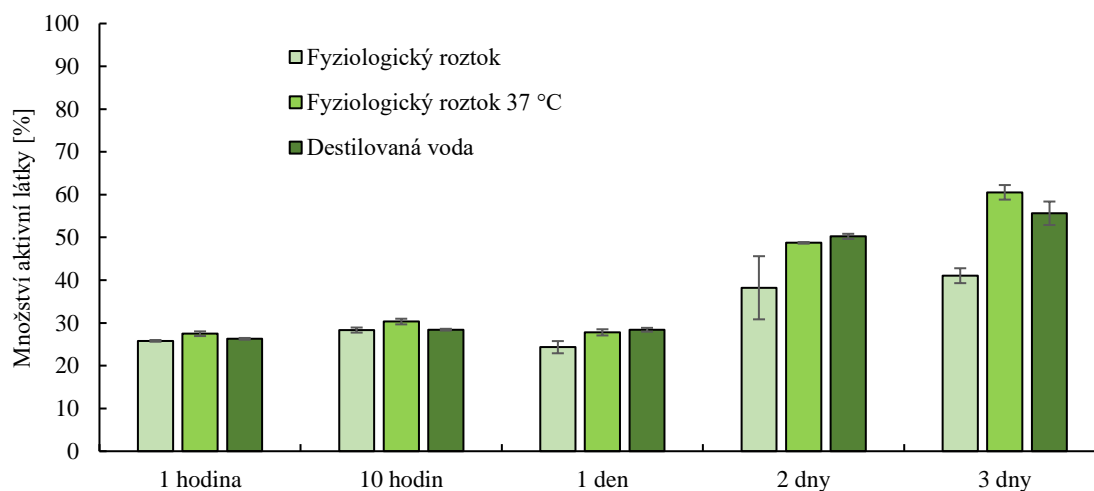
Kinetické analýze postupného uvolňování enkapsulovaných látek byly podrobeny částice s přídatkem PHB a s aktivními látkami – eugenol, karvakrol a tymol v koncentraci 1 mg/ml. Látky byly vybrány kvůli dobrým antimikrobiálním vlastnostem a zároveň pro jejich dobrou antioxidační aktivitu. U těchto látek byla dále zjištěna synergie [97]. Hlavním cílem analýzy kinetiky postupného uvolňování bylo zjistit, jakým způsobem se aktivní látky uvolňují z připravených liposomů. Vybranou technikou byla vysokotlaká kapalinová chromatografie, postup je uveden v bodě 4.5.4.



Obrázek 25: Postupné uvolňování eugenolu z liposomů

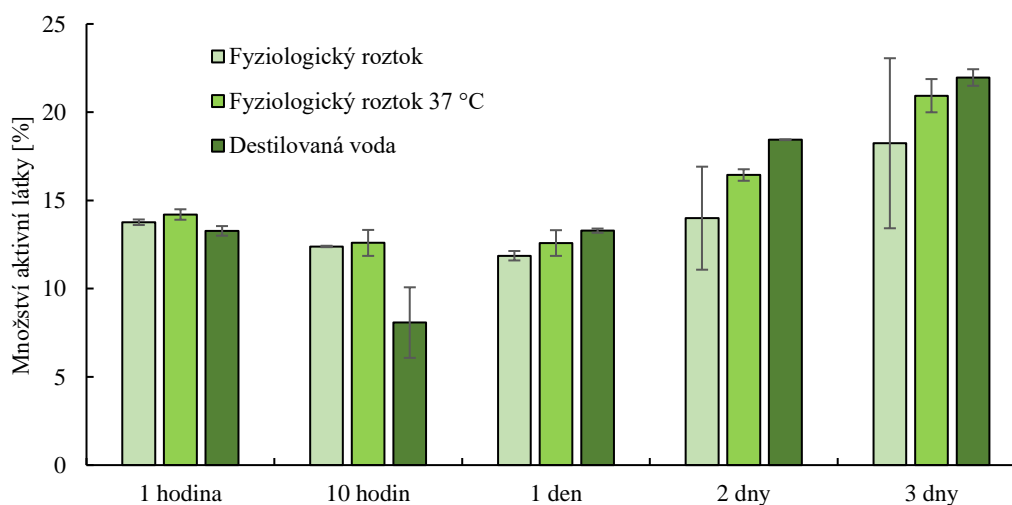
Částice s enkapsulovanou aktivní látkou eugenol byly připraveny podle postupu, který je uvedený v bodě 4.4.3. Vzorky byly připraveny a proměřeny vždy v duplikátech. Výsledky postupného uvolňování eugenolu z připravených liposomů lze vidět ve výše uvedeném grafu

(Obrázek 25). Připravené liposomy byly umístěny do třech modelových prostředí, konkrétně fyziologický roztok při teplotě 25 °C, fyziologický roztok při teplotě 37 °C a destilovaná voda. Z grafu je patrné, že množství uvolněného eugenolu se zvyšuje v čase. V prvních 24 hodinách se uvolnilo vždy kolem 10 % ve všech třech prostředích. Po dvou a třech dnech se množství uvolněné aktivní látky zvýšilo na cca 20 % v závislosti na prostředí.



Obrázek 26: Postupné uvolňování karvakrolu z liposomů

Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 26) jsou uvedeny výsledky z postupného uvolňování karvakrolu z připravených částic. Všechny vzorky byly připravené v duplikátech podle postupu, který je uveden v bodě 4.4.3. Stejně jako u liposomů s eugenolem (Obrázek 25) lze vidět, že v prvním dnu se uvolnilo téměř stejné množství aktivní látky ve všech třech modelových prostředích, a to kolem 28 %. Ve druhém a třetím dnu lze pozorovat lineární nárůst koncentrace ve všech třech modelových prostředích. Nejvíce uvolněného karvakrolu bylo po třetím dnu do fyziologického roztoku, který byl zahřátý na teplotu 37 °C, konkrétně 60,5 % ± 1,7 %.



Obrázek 27: Postupné uvolňování tymolu z liposomů

V následujícím grafu (Obrázek 27) jsou prezentovány výsledky postupného uvolňování z liposomů s enkapsulovanou aktivní látkou tymol. Všechny vzorky byly opět připravovány v duplikátech podle postupu v bodě 4.4.3. Stejně jako u předchozích aktivních látek se v prvním dni uvolnilo téměř stejné množství enkapsulované látky do všech modelových prostředí. Koncentrace uvolněného tymolu stoupala lineárně při druhém a třetím dnu uvolňování. Nejvíce uvolněné látky bylo do destilované vody ve třetí den, a to konkrétně 21,97 %±0,47 %.

Lze shrnout, že v předchozích experimentech byly připraveny částice typu PHB/liposomy s enkapsulovanou aktivní látkou (eugenol, karvakrol, tymol; 1 mg/ml) podle postupu v bodě 4.4.3 (Obrázek 25; Obrázek 26; Obrázek 27). U všech třech látek bylo zaznamenáno postupné uvolňování aktivních látek v průběhu času. Nejvyšší procentuální uvolnění bylo pozorováno u karvakrolu, a to po prvním dnu kolem 28 %. Po třech dnech dosáhlo uvolňování hodnot až kolem 60 %.

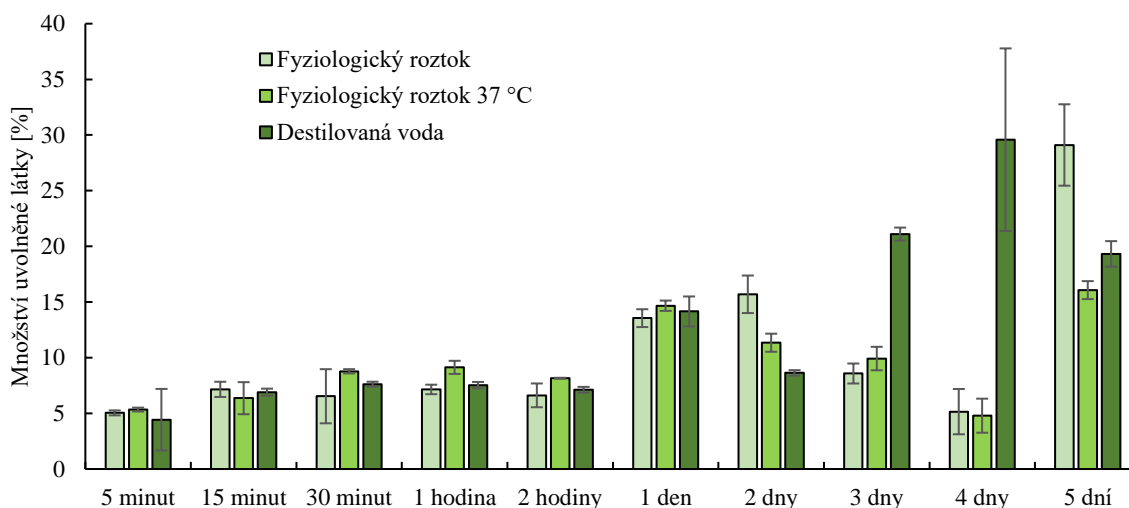
Výsledky ukazují, že takto připravené částice, které mají enkapsulované jako aktivní látky eugenol, karvakrol a tymol, se projevují stabilním chováním v průběhu času. Z naměřených dat vyplývá, že enkapsulace aktivních látek v částicích je poměrně stabilní a umožňuje jejich řízené uvolňování do okolního prostředí. Tato stabilita je důležitá pro potenciální aplikace v různých oblastech farmaceutického či kosmetického průmyslu. Z analýzy na DLS bylo zjištěno, že částice zůstávají stabilní i s enkapsulovanými aktivními látkami a výsledky nevykazují žádné známky degradace, což potvrzuje stabilitu a linearitu procesu enkapsulace a kinetiky uvolňování aktivních látek.

5.4 Charakterizace připravených nanovláken

U připravených nanovláken byla sledovaná kinetika postupného uvolňování aktivních látek enkapsulovaných v nich. Pro enkapsulaci byly vybrány podobně jako u nanočástic látky eugenol, karvakrol a tymol, které mají dobré antimikrobiální vlastnosti a dobrou antioxidační aktivitu, jako bylo zjištěno v předchozích měřeních. Tyto látky dále disponovaly synergickými interakcemi [97].

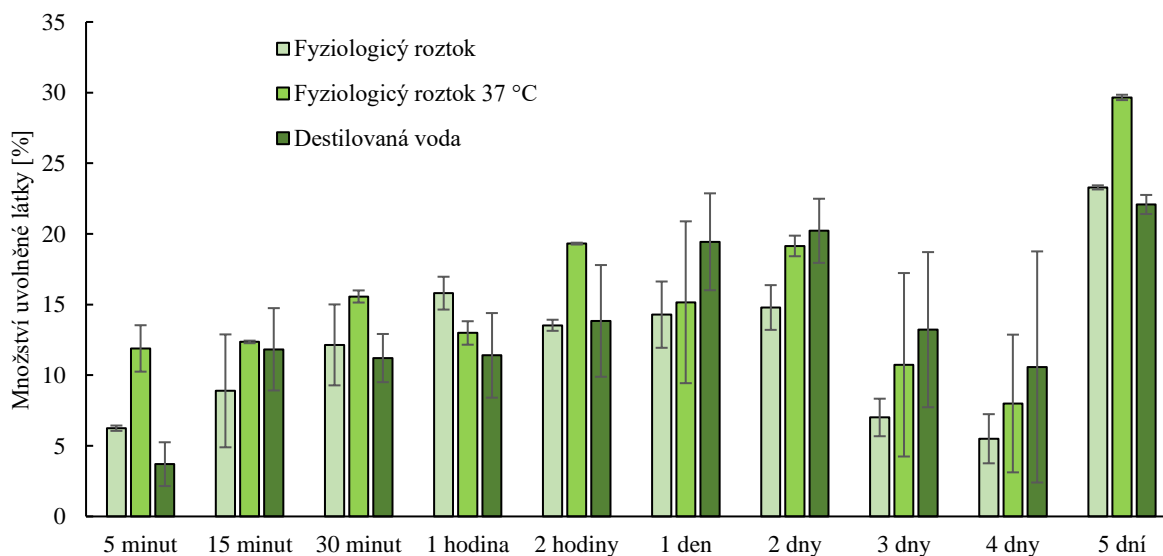
5.4.1 Postupné uvolňování aktivních látek z připravených nanovláken

Nanovlákná byla připravená podle postupu, který je popsán v kapitole 4.6. Následně bylo stanoveno uvolňování účinných látek z nanovláken podle postupu uvedeného v bodě 4.7.1. Pro přípravu byly použity tři aktivní látky – eugenol, karvakrol a tymol. Tyto látky byly přidávány vždy ve dvou koncentracích (5% a 10%). Byla použita pouze nanovlákná tvořená z roztoku PHB. Prostředí, do kterých se uvolňovaly aktivní látky byly: destilovaná voda, fyziologický roztok při laboratorní teplotě (25 °C) a fyziologický roztok při teplotě 37 °C.



Obrázek 28: Uvolňování eugenolu (5%)

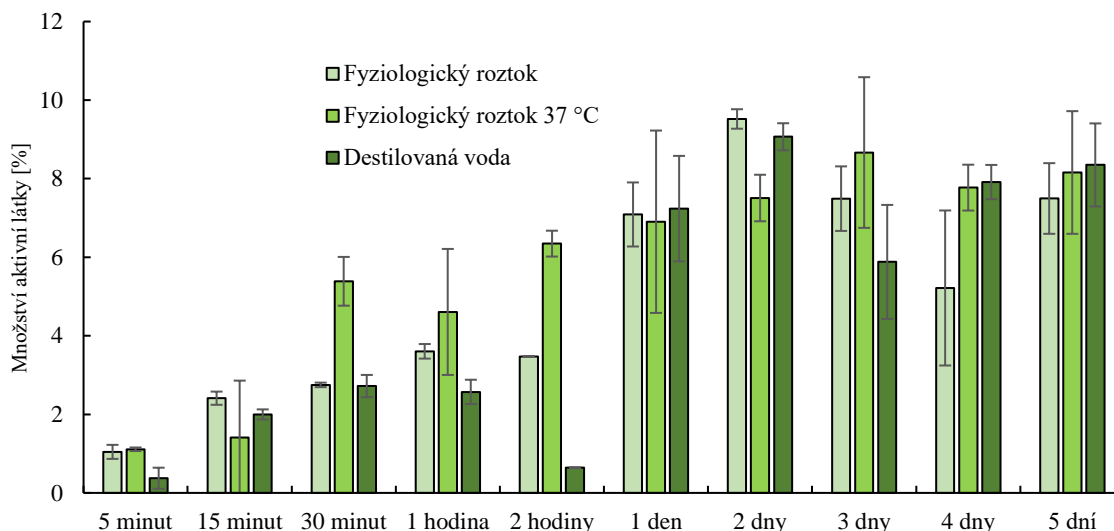
Graf (Obrázek 28) zobrazuje uvolňování eugenolu o 5% koncentraci z nanovláken do třech různých prostředí. U vláken, které byly umístěny do fyziologického roztoku lze vidět nárůst koncentrace uvolněného eugenolu, po 30 minutách došlo k mírnému poklesu, avšak po prvním a druhém dni se uvolnilo kolem 15 %. Poté mohlo dojít k částečné degradaci a množství uvolněné látky pokleslo a pátý den se opět začalo uvolňovat. Podobně tomu bylo i u fyziologického roztoku při teplotě 37 °C. V destilované vodě docházelo také v prvních hodinách k postupnému uvolňování kolem 10 % eugenolu. Po prvním dni množství uvolněné látky vzrostlo k 15 %. Poté došlo zřejmě opět k částečné degradaci látky, protože procento uvolnění kleslo. Nejvíce eugenolu se uvolnilo ve čtvrtém dni do prostředí destilované vody, konkrétně 29,58 %±8,20 %.



Obrázek 29: Uvolňování karvakrolu (5%)

Časový vývoj uvolněného množství karvakrolu o 5% koncentraci z nanovláken lze vidět na grafu (Obrázek 29). Můžeme sledovat rostoucí závislost množství uvolněného karvakrolu

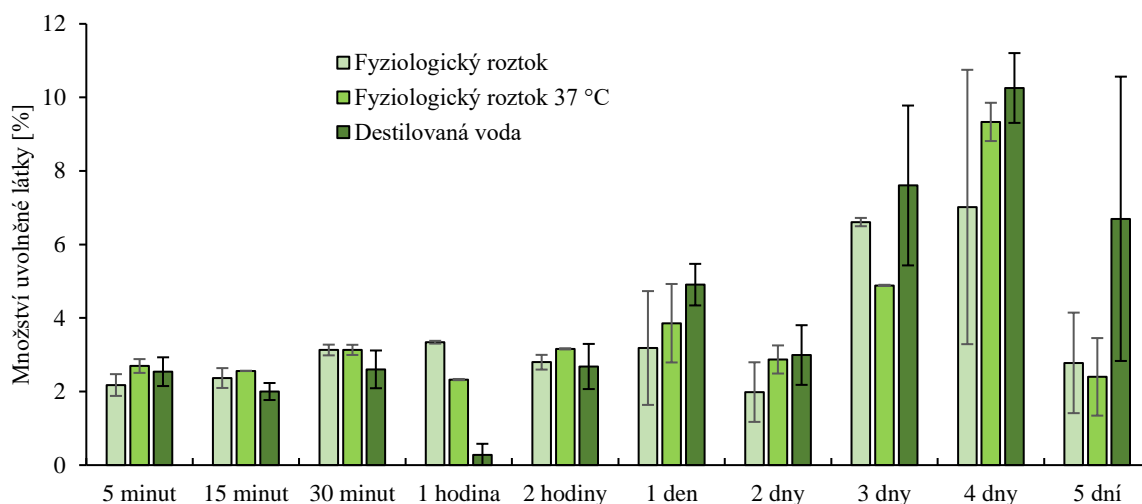
v čase s poklesy v určitých časových intervalech. V prvních třiceti minutách se uvolňovalo nejvíce karvakrolu do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C, a to okolo 15 %. Poté dojde k poklesu uvolnění, avšak po prvním dnu se množství uvolněné látky zvýšilo. Následně pokračuje obdobný trend, tyto poklesy mohou být způsobené částečnou degradací uvolněného karvakrolu, nebo nehomogenitou roztoku. Uvolnění do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C a do destilované vody má rostoucí trend až do třetího dne, kdy dojde k vychýlení a množství uvolněné látky klesne, což může být způsobeno, stejně jako u fyziologického roztoku při teplotě 37 °C, částečnou degradací uvolněného karvakrolu.



Obrázek 30: Uvolňování tymolu (5%)

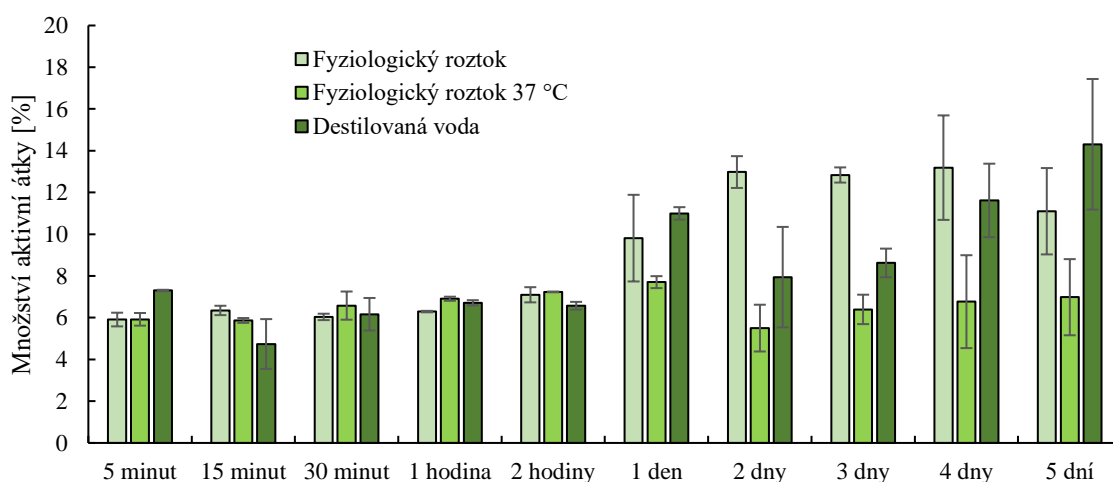
Uvolňování 5% tymolu bylo sledováno do třech prostředí (destilovaná voda, fyziologický roztok při dvou různých teplotách). Výše můžeme vidět grafické znázornění (Obrázek 30) postupného uvolňování. Množství uvolněné látky v prvních hodinách u fyziologického roztoku roste, u třetího a čtvrtého dne můžeme vidět vychýlení a pokles uvolněného léčiva, avšak pátý den můžeme pozorovat opět rostoucí trend. U destilované vody lze pozorovat v prvních třiceti minutách růst uvolněné látky, ale poté dojde k vychýlení od stoupajícího trendu. Při dlouhodobějším uvolňování (při vícedenním) můžeme opět vidět stoupající trend, výjimku tvoří třetí den, kde opět dochází k vychýlení, což mohlo být způsobené například částečným rozkladem uvolněného tymolu.

Ve výše uvedených grafech jsou znázorněny výsledky postupného uvolňování nanovláken s enkapsulovanými aktivními látkami (eugenol, karvakrol, tymol) o 5% koncentraci. Při uvolňování eugenolu a tymolu docházelo k podobnému chování. V prvních dnech docházelo k postupnému uvolňování s mírnými poklesy. U karvakrolu to bylo podobné, lze vidět trend uvolňování s periodickými poklesy, které byly zřejmě způsobeny opět částečnou degradací látky. Výrazné navýšení uvolněné látky, jako můžeme pozorovat u karvakrolu pátý den (Obrázek 29), může být způsobeno i částečnou degradací struktury nanovláken.



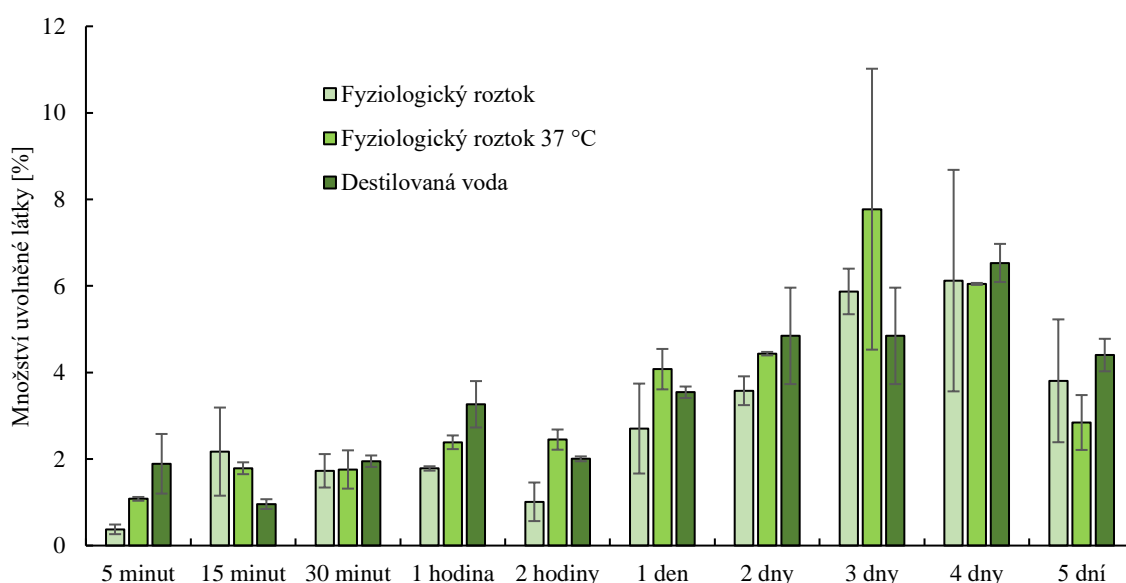
Obrázek 31: Uvolňování eugenolu (10%)

Dále byly připraveny PHB/nanovlákná s enkapsulovanou aktivní látkou v 10% koncentraci podle postupu uvedeném v bodě 4.7.1. Všechny vzorky byly analyzovány vždy v duplikátech. V grafu (Obrázek 31) jsou prezentovány výsledky postupného uvolňování eugenolu v časových intervalech od 5 minut po 5 dní ve třech modelových prostředích. Z grafu je patrné, že uvolňování do všech prostředí vykazuje časovou závislost s občasnými poklesy. V prvním dnu se uvolňovalo nejméně látky do prostředí destilované vody, ovšem během třetího dne stoupla koncentrace uvolněného eugenolu na nejvyšší, konkrétně nejvyšší uvolnění proběhlo během čtvrtého dne, poté došlo k mírnému poklesu. Uvolňování do fyziologického roztoku při obou teplotách (25 °C a 37 °C) mělo podobný trend. Během prvních dvou dnů se uvolnilo kolem 3 % eugenolu, během třetího a čtvrtého dne množství látky stoupla na hodnotu kolem 6 %. V průběhu pátého dne, stejně jako u destilované vody, koncentrace látky klesla, což mohla způsobit částečná degradace aktivní látky nebo nehomogenita připraveného roztoku.



Obrázek 32: Uvolňování karvakrolu (10%)

Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 32) jsou shrnuty výsledky postupného uvolňování aktivní látky karvakrol z připravených nanovláken. Postup měření je uveden v bodě 4.7.1. Z výsledků je patrné, že stejně jako u eugenolu má uvolňování časovou závislost. Celkově se 10% karvakrol uvolňoval nejlépe do prostředí fyziologického roztoku při teplotě 25°C. V prvních dvou hodinách se množství uvolněné látky pohybovalo kolem 7 %. Během prvních čtyř dnů vzrostlo uvolnění dvojnásobně na 14 %. Během pátého dne došlo k mírnému poklesu uvolněného eugenolu. U prostředí fyziologického roztoku při teplotě 37 °C se v prvním dnu pohybovalo opět kolem 7 %. V následujících čtyřech dnech došlo k poklesu. U prostředí destilované vody se v prvních dvou hodinách pohybovalo množství uvolněného karvakrolu také kolem 7 %. V prvním dnu stouplо množství k 11 %, v druhém dni byl zaznamenán pokles, avšak v dalších dnech opět došlo k nárůstu. K poklesu mohlo dojít kvůli částečné degradaci, špatnou homoginitou vzorku nebo se uvolnilo nárazově větší množství a více už se neuvolňovalo.



Obrázek 33: Uvolňování tymolu (10%)

V grafu (Obrázek 33) je možné sledovat uvolňování tymolu do třech různých prostředí. Z naměřených výsledků vyplývá, že uvolňování je závislé na čase, obdobně jako karvakrolu. V průměru se nejméně uvolnilo tymolu do fyziologického roztoku při 25 °C. Největší procento uvolnění bylo ve třetím dni do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C, což může být způsobeno například rychlostí reakce, kdy reakce častěji probíhají rychleji při vyšších teplotách.

Ve výše uvedených grafech jsou výsledky uvolňování aktivních látek (eugenol, karvakrol, tymol) o 10% koncentraci. Z jejich srovnání je patrné, že nejstabilnější byly nanovlákná s obsahem tymolu. Celkově lze uzavřít, že všechna připravená nanovlákná s enkapsulovanou aktivní látkou vykazují časově závislé uvolňování s občasnými poklesy. Uvolňování všech tří látek (eugenol, karvakrol a tymol) bylo provedeno do třech různých prostředí, přičemž všechny ukazují podobné trendy. V prvních dnech dochází k postupnému nárůstu uvolněné látky, avšak po dosažení určitého bodu dojde ke stabilizaci či mírnému poklesu. Všeobecně bylo nejefektivnější uvolňování do fyziologického roztoku při 25°C. Naopak nejméně účinné bylo

uvolňování bylo do destilované vody. Je pravděpodobné, že poklesy v množství uvolněné látky mohou být způsobeny částečnou degradací.

Celkově lze říci, že stabilita uvolňovaných látek je ovlivněna jak vlastnostmi látky samotné, tak prostředím, do kterého je uvolňována. Dále lze konstatovat, že všechny uvedené nanomateriály by se mohly osvědčit jako antimikrobiální kryty ran s krátkým (hodiny) až středně dlouhým (dny) účinkem a s postupným uvolňováním aktivních látek.

5.5 Charakterizace připravených kombinovaných nanomateriálů

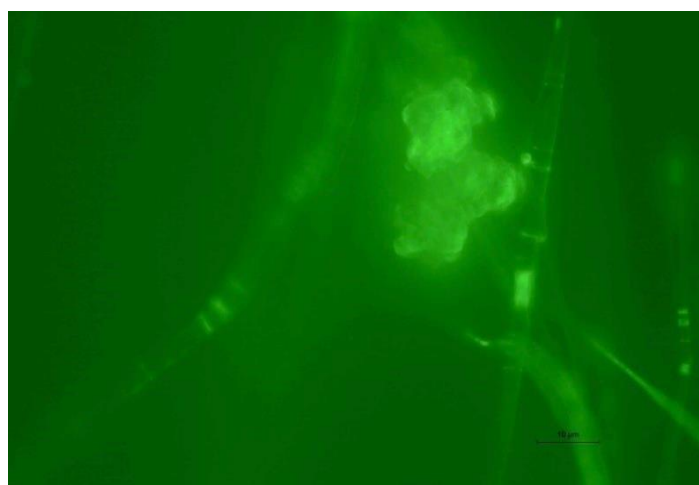
Pro přípravu kombinovaných nanomateriálů byla vybrána vlákna, která měla enkapsulovanou aktivní látku v 5% koncentraci, poněvadž 10% nanovlákna vykazovala vysokou cytotoxicitu [96]. Z tohoto důvodu by mohlo při použití nanovláknenných krytů docházet k poškození živých buněk, například poškozením buněčné membrány nebo narušením buněčného metabolismu, což je nežádoucí. Proto byla zvolena 5% koncentrace, aby se minimalizovalo riziko negativních účinků na buňky a zároveň zajistilo efektivní uvolňování aktivních látek z nanovláken [96].

Kombinované nanomateriály byly připraveny podle postupu, který je uveden v bodě 4.8. Takto připravená nanovlákna byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem, aby bylo zjištěno, zda a kolik částic se na vláknech uchytilo. Jako poslední bylo provedeno zkoumání kinetiky postupného uvolňování aktivních látek z kombinovaných materiálů.

5.5.1 Vazba liposomů s přídavkem polyhydroxybutyrátu na PHB nanovlákna

Fluorescenční mikroskopie se používá k pozorování struktury a morfologie nanomateriálů, přičemž fluorescenční značení umožňuje vizualizaci a sledování distribuce látek ve vzorku s vysokou citlivostí a rozlišením.

Kombinované nanomateriály byly připravovány podle postupu, který je uveden v bodě 4.8. Pod fluorescenčním mikroskopem bylo sledováno navázání prázdných liposomů na nanovlákna, které se přichytávají pomocí adsorpce. Pro pozorování takto připravených materiálů pod fluorescenčním mikroskopem byla použita fluorescenční sonda Bodipy.

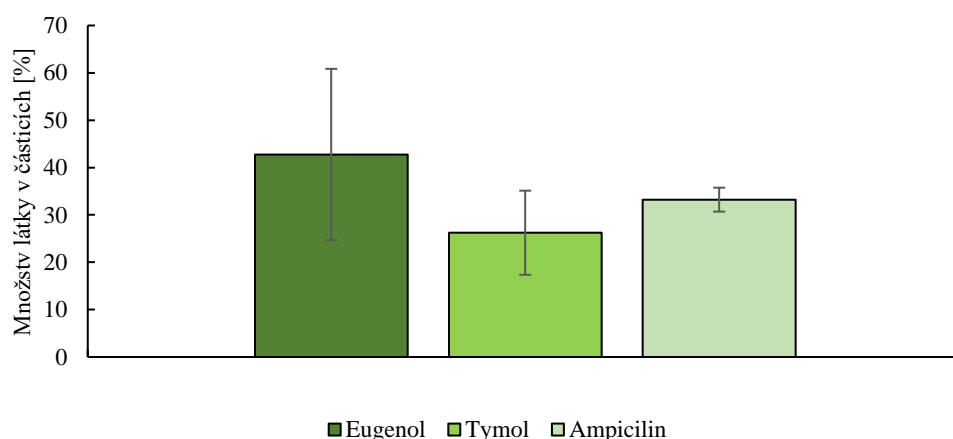


Obrázek 34: Snímek z fluorescenčního mikroskopu, zvětšení 100x

V prezentovaném snímku (Obrázek 34) lze vidět shluk částic, které vykazují morfologii našich připravených liposomů. Tyto částice jsou ukotveny ve struktuře připraveného nanovlákná, což nám potvrdilo, že se částice na vysušeném materiálu nacházely. Částice připomínají kulaté útvary, což je charakteristické pro liposomy. Připravená vlákna jsou tenká a mají vláknitou strukturu.

5.5.2 Stanovené množství účinné látky enkapsulované v částicích

Byly připraveny a proměřeny vzorky podle postupu, který je uveden v bodě 4.8.2.



Obrázek 35: Množství aktivní látky v částicích

V grafu jsou prezentovány výsledky enkapsulace aktivních látek do nanovláken s adsorbovanými nanočásticemi. Z grafu vyplývá, že v připravených nanovláčkách byly zachyceny částice s enkapsulovanou aktivní látkou. Největší množství aktivní látky obsahovaly částice s eugenolem, a to 42,76 % ± 18,08 %. Naopak nejhůř na tom byl tymol, konkrétně 26,24 % ± 8,89 %.

5.5.3 Postupné uvolňování aktivních látek z kombinovaných nanomateriálů

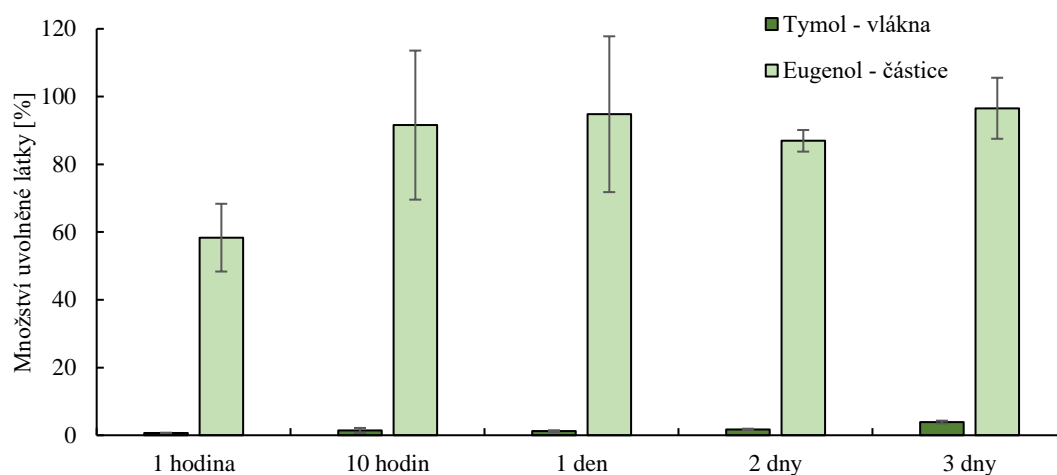
Byly připraveny kombinované nanomateriály podle postupu, který je uveden v bodě 4.8. Poté bylo analyzováno postupné uvolňování aktivních látek podle postupu v bodě 4.8.3. Každý vzorek byl připraven a analyzován v duplikátech.

Hlavním cílem postupného uvolňování bylo zjistit, jakým způsobem se aktivní látky uvolňují z kombinovaného nanomateriálu, a zároveň byla ověřena i úspěšnost jejich adsorpce, a tedy celkové přípravy. Pro stanovení byla, stejně jako v předchozích analýzách, použita kapalinová chromatografie.

Na základě naměřených výsledků byly pro přípravu kombinovaných nanomateriálů vybrány částice, které měly enkapsulovaný eugenol a karvakrol. Nanovlákná byla vybrána na základě

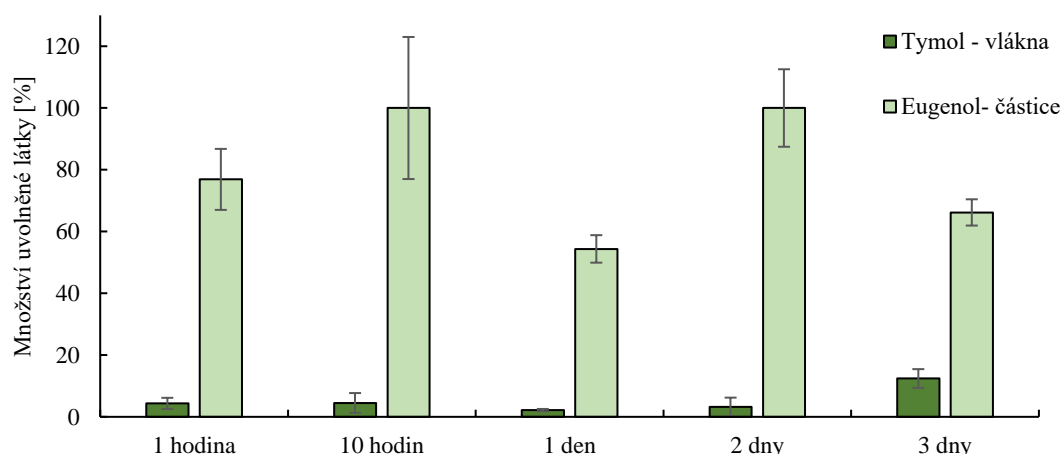
výsledků cytotoxicity, které jsou uvedeny v paralelní diplomové práci [96]. Pro přípravu byla vybrána 5% nanovláknna a částice s koncentrací látky 1 mg/ml.

Částice s ampicilinem byly vybrány na základě předchozích výsledků [97]. Tyto připravené kombinované nanomateriály byly uvolňovány do prostředí fyziologického roztoku při teplotě 25 °C a při teplotě 37 °C.



Obrázek 36: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu tymol-eugenol do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C

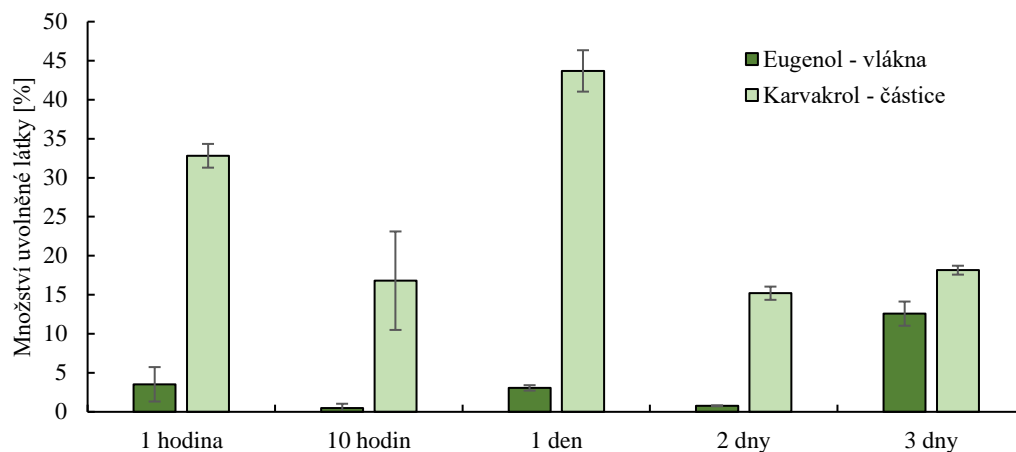
Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 36) jsou shrnuty výsledky z analýzy postupného uvolňování kombinovaných nanomateriálů, kdy ve vláknech byl tymol a v částicích byl enkapsulovaný eugenol, do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C. Z výsledků je patrné, že uvolněný tymol z vláken rostl s časem, maximum však bylo při třetím dni, kdy se uvolnilo 3,9 %±0,4 %. Naopak u eugenolu lze pozorovat postupný nárůst uvolnění do prvního dne, kdy se uvolnilo 94,7 %±23,0 %, kde pak dojde k mírnému poklesu.



Obrázek 37: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu tymol-eugenol do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C

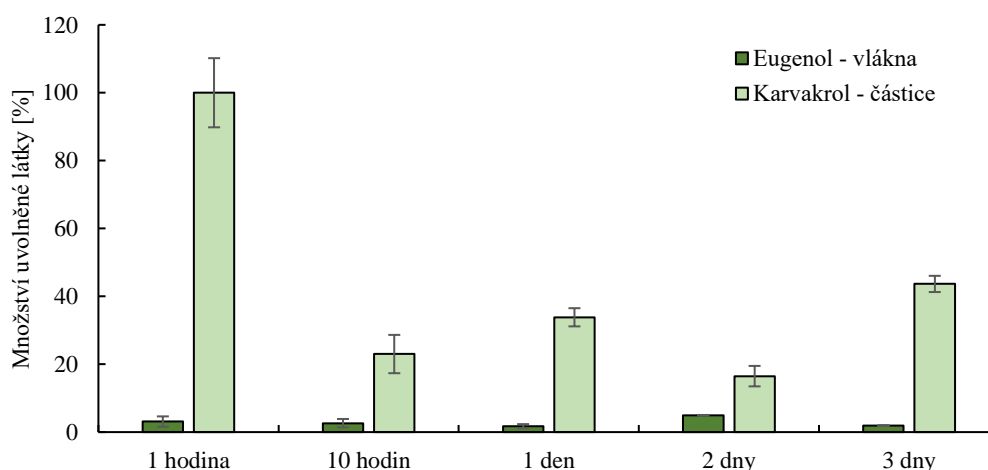
V grafu (Obrázek 37) jsou výsledky stejných nanomateriálů, ale inkubovány do fyziologického roztoku při teplotě 37°C. Stejně jako při 25 °C si můžeme povšimnout

rostoucího trendu u vláken obsahujících tymol, kdy se s časem uvolňuje více látky. U částic, které obsahují tymol lze vidět nárůst během prvních 10 hodin, a pak dojde ke značnému poklesu, který může být způsoben částečnou degradací uvolněné látky nebo nanostruktury. Třetí den dojde opět k poklesu uvolnění.



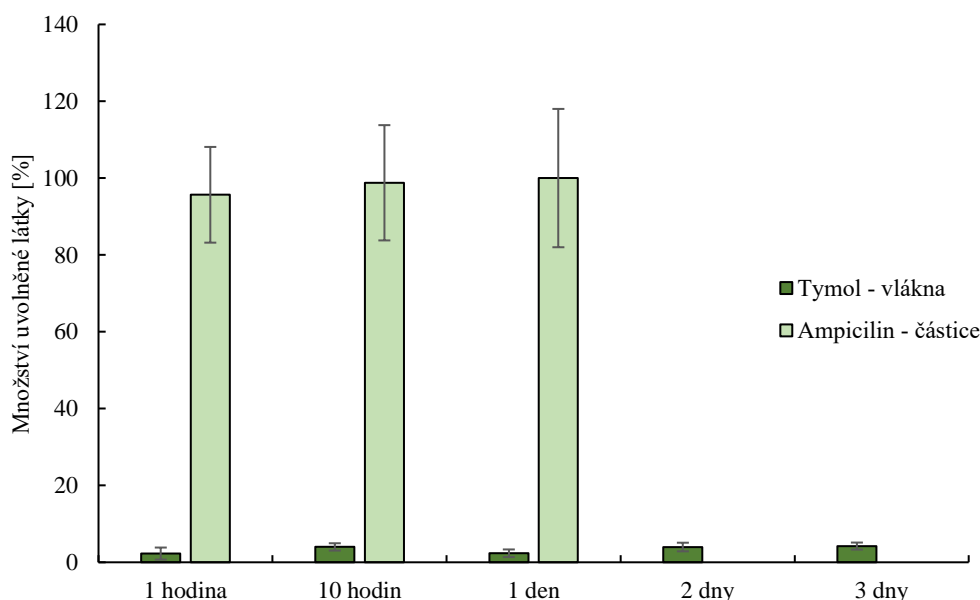
Obrázek 38: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu eugenol-karvakrol do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C

V prezentovaném grafu (Obrázek 38) jsou znázorněny výsledky postupného uvolňování aktivních látek z dalšího kombinovaného nanomateriálu, kdy ve vláknech je obsažen eugenol a v částicích karvakrol. Uvolňování probíhalo do prostředí fyziologického roztoku při teplotě 25 °C. Z grafu je patrné, že obě látky mají stoupající a klesající trend, možným vysvětlením jsou tepelná degradace přírodní látky nebo nehomogenita připravených vláken. Při první hodině se uvolnilo z vlákna 3,5 % ± 2,2 % eugenolu a z částic 32,8 % ± 1,5 % karvakrolu. Během dalších deseti hodin procento uvolněných látek kleslo a nejvíce uvolněného karvakrolu z částic proběhlo během prvního dne, kdy bylo detekováno 43,7 % ± 2,7 %. Nejvíce uvolněného eugenolu z vláken bylo změřeno třetí den, kdy se uvolnilo 12,6 % ± 1,5 %.



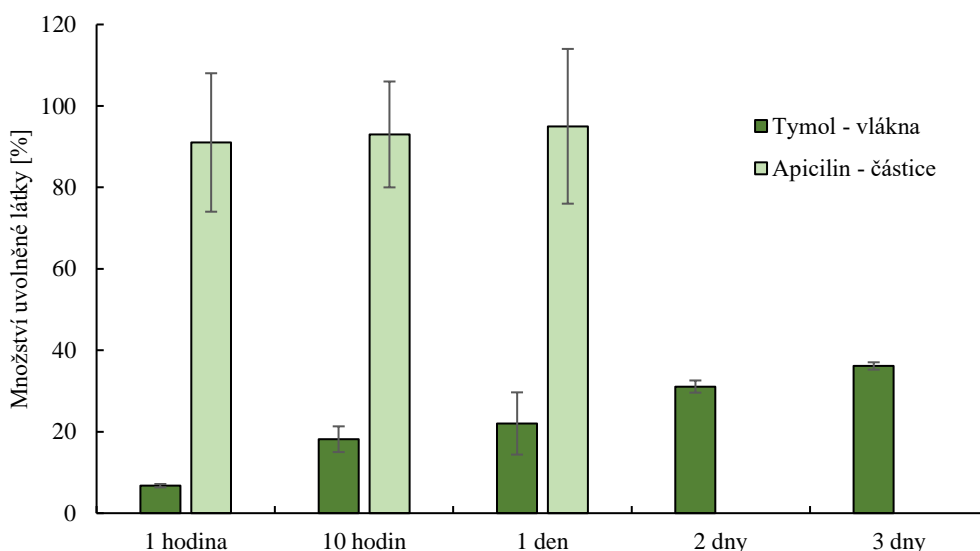
Obrázek 39: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu eugenol-karvakrol do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C

V grafu (Obrázek 39) lze vidět výsledky postupného uvolňování připraveného kombinovaného materiálu, kdy v částicích je obsažený karvakrol a ve vláknech eugenol. Postupné uvolňování probíhalo do modelového prostředí fyziologického roztoku, který byl zahřátý na teplotu 37 °C. Celkově lze říci, že uvolňování do zahřátého fyziologického roztoku bylo efektivnější než do fyziologického roztoku při 25 °C. Mohlo tomu tak být díky zvýšené difúzi při vyšší teplotě, kdy při zahřátí roztoku dochází ke zvýšení kinetické energie molekul, což může způsobit jejich rychlejší pohyb, a to může vést k rychlejší difúzi látky z nanomateriálu do roztoku. Karvakrol, který byl obsažený v částicích, se uvolnil v první hodině v množství 100,0 %±10,2 %. Poté došlo k výraznému poklesu, což bylo způsobeno zřejmě degradací aktivní látky. Naopak u eugenolu ve vláknech lze pozorovat rostoucí trend uvolňování, kdy maximum látky se uvolnilo druhý den, a to 4,9 %±0,1 %. Poté došlo, stejně jako u karvakrolu, k poklesu.



Obrázek 40: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu tymol-ampicilin do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C

Jako posledními vzorky byly připraveny kombinované nanomateriály, kdy ve vláknech byl obsažený tymol a v částicích byl enkapsulovaný ampicilin. Takto připravené materiály byly analyzovány podle postupu uvedeného v bodě 4.8.3. Na grafu (Obrázek 40) jsou prezentovány výsledky uvolňování do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C. Jak lze vidět, tak ampicilin, který byl obsažený v částicích se během prvního dne uvolnil na 100 %. Poté došlo pravděpodobně k jeho degradaci a nebyl detekován. Uvolňování tymolu má opět rostoucí trend, kdy nejvíce látky bylo uvolněno třetí den, a to 4,2 %±0,9 %.



Obrázek 41: Postupné uvolňování kombinovaného nanomateriálu tymol-ampicilin do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C

V grafu (Obrázek 41) lze vidět výsledky uvolňování aktivních látek ze stejného nanomateriálu (tymol – ampicilin), ale tentokrát do prostředí fyziologického roztoku, který byl zahřátý na teplotu 37°C. Stejně jako u uvolňování do fyziologického roztoku při teplotě 25 °C (Obrázek 40) lze vidět rostoucí trend, kdy ampicilin enkapsulovaný v částicích se během prvního dne uvolnil ze 100 %, zatímco tymol z vláken se uvolňoval v menším množství. Nejvíce tymolu se uvolnilo třetí den, a to konkrétně 36,2 %±0,9 %. Tymol se pak z vláken uvolňoval ještě další dva dny, což prodloužilo antimikrobiální efekt tohoto materiálu.

Závěrem lze říci, že zkoumané materiály prokazovaly trend postupného uvolňování aktivních látek v čase. Teplota prostředí a třepání má významný vliv na proces uvolňování. Bylo prokázáno, že vyšší teploty (37 °C) způsobují rychlejší a efektivnější uvolňování aktivních látek. Výsledky analýzy uvolňování látek z kombinovaných nanomateriálů naznačují, že použití kombinace vláken a částic může být efektivní strategií pro řízené uvolňování. Tento přístup byl zvolen i z důvodu možnosti vyšší koncentrace látek ve vláknech. Pozorovaný trend naznačuje, že synergický efekt mezi částicemi a vlákny mohl hrát klíčovou roli v uvolňování aktivních látek. První fáze tohoto procesu byla charakterizována synergickým účinkem těchto dvou látek, po uvolnění veškeré látky z částic pak následovalo uvolňování látek z vláken. Pro optimální využití tohoto principu je vhodné zvolit časové okno pro uvolňování obou látek s ohledem na konkrétní aplikace a stabilitu. Například pokud bychom měli materiál obsahující tymol a ampicilin, mohla by být navržena optimální doba expozice krytu 24 hodin, kdy by podle výsledků došlo k maximálnímu synergickému efektu při uvolňování.

5.5.4 Stabilita připravených antimikrobiálních nanomateriálů a jejich aplikace

Aktivní látka eugenol je citlivá na světlo a při dlouhodobém působení UV záření se může rozkládat. Při běžných teplotách skladování je eugenol poměrně stabilní, avšak při vyšších teplotách může dojít k jeho degradaci. Karvakrol a tymol jsou také citlivé na světlo, podobně jako eugenol. Stejně jako u eugenolu může při vyšších teplotách docházet k jejich rozpadu.

Ampicilin by měl být chráněn před přímým slunečním zářením a dlouhodobou expozicí UV záření, protože mohou způsobit jeho degradaci. Ampicilin je antibiotikum a vzhledem k jeho citlivosti na teplo a vlhkost je dobré ho skladovat v lednici. Nízká teplota pomáhá minimalizovat jeho rozklad a degradaci [98][99][100].

Na základě výše uvedených faktů a získaných výsledků můžeme konstatovat, že nanovlákná s enkapsulovanými aktivními látkami vykazují časově závislé uvolňování těchto látek. Tyto látky mají vysoký potenciál v medicíně a kosmetice, kde mohou být využity pro své antimikrobiální vlastnosti. Výsledky ukazují, že teplota prostředí má významný vliv na proces uvolňování. Připravené nanomateriály se v průměru nejlépe uvolňovaly do prostředí fyziologického roztoku při teplotě 25 °C, z čehož vyplývá, že připravené materiály by mohly být použity zejména na povrchová zranění na kůži.

Použití kombinovaných materiálů, které obsahují společně funkcionalizovaná nanovlákná i nanočástice, se ukázalo jako efektivní strategie pro řízené uvolňování aktivních látek. Synergický efekt mezi aktivními látkami může vytvářet nové vlastnosti a zároveň může předcházet rozvíjející se antibiotické rezistenci.

Další uplatnění takto připravených nanomateriálů můžeme hledat v kosmetickém průmyslu, kde mohou být použity jako nosiče pro různé aktivní látky, dále mohou sloužit k ochraně a regeneraci pokožky, mohou dodávat léčivé látky pro léčbu akné a kožních problémů a v neposlední řadě mohou být uplatněny i v oblasti líčení.

6 ZÁVĚR

Tato závěrečná práce je zaměřená na studium stability funkcionalizovaných antimikrobiálních nanomateriálů a kinetiky uvolňování aktivních látek v různém prostředí přednostně pomocí kapalinové chromatografie. V teoretické části byly charakterizovány nanomateriály, jejich příprava a použití. Dále byly probrány dvě hlavní skupiny antimikrobiálních látek. Jednou kategorií jsou přírodní antimikrobiální látky, které byly obecně popsány a následně bylo podrobně popsáno pět zástupců. Druhou skupinu představují antibiotika, která byla také podrobně popsána, včetně podstaty antibiotické rezistence. V poslední části byly vybrány a popsány instrumentální metody používané v této práci, zejména analytická metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

V praktické části byla prvně proměřena antioxidační aktivita vybraných přírodních antimikrobiálních látek. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval eugenol s hodnotou $583,89 \pm 2,93$ mg/g. Druhým nejlepším zástupcem byl vitamin E, jehož antioxidační aktivita byla $581,94 \pm 4,28$ mg/g.

V další části byly připraveny liposomy s přídavkem polymeru polyhydroxybutyrátu a také bez něj. Do liposomů byly enkapsulovány aktivní látky o různých koncentracích. U takto připravených liposomů byla proměřena enkapsulační účinnost připravených částic pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Metoda HPLC byla optimalizována pro analýzu výše uvedených aktivních látek. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zjištěna u vitamínu E, a to $99,69 \% \pm 0,10 \%$.

Připravené liposomy byly podrobeny měření dlouhodobé stability, přičemž bylo zjištěno, že PHB liposomy vykazovaly větší stabilitu než liposomy bez PHB. Nejvyšší stabilitu však vykazovaly PHB liposomy, které byly rozsuspendované ve fyziologickém roztoku. Pro další práci byly vybrány liposomy s PHB a aktivními látkami eugenol, karvakrol, tymol v koncentraci 1 mg/ml, z důvodu dobré detekce na HPLC.

U liposomů s přídavkem polymeru polyhydroxybutyrátu a s enkapsulovanými aktivními látkami (eugenol, karvakrol a tymol) byla sledována kinetika postupného uvolňování. Souhrnně lze říci, že největší množství látek se uvolňovalo do fyziologického roztoku při teplotě 37°C . Lze také pozorovat časovou závislost uvolňování. Nejvyšší procento uvolnění bylo detekováno u karvakrolu po prvním dni (cca 28 %), během následujících dvou dní množství uvolněné látky stoupl až k 60 % právě ve zmíněném fyziologickém roztoku při teplotě 37°C .

V další části byly pomocí odstředivého zvlákňování připravena nanovlákná, která obsahovala enkapsulované aktivní látky (eugenol, karvakrol, tymol) ve dvou koncentracích (5%; 10%). Tyto látky byly vybrány z důvodu dobrých antimikrobiálních vlastností a dále vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu. Kombinace těchto látek vykazovaly synergický efekt. U takto připravených nanovláken bylo pozorováno postupné uvolňování aktivních látek do třech modelových prostředí. Výsledky kinetiky uvolňování v obou koncentracích vykazovaly podobné trendy. Celkově lze shrnout, že stabilita je ovlivněna jak vlastnostmi látky samotné, tak prostředím, do kterého je uvolňována. Nejeftivnější uvolňování probíhalo do fyziologického roztoku při teplotě 25°C , naopak nejméně účinné bylo do destilované vody.

Po zhodnocení předchozích výsledků byly z PHB vláken s aktivními látkami a liposomů s přídatkem PHB vytvořeny kombinované nanomateriály, u kterých bylo následně analyzováno postupné uvolňování. Pro další měření byla použita vlákna, která měla enkapsulovanou aktivní látku v 5% koncentraci. Prvně bylo pomocí fluorescenčního mikroskopu prokázáno, že byla opravdu připravena vlákna s adsorbovanými částicemi, tedy kombinované nanomateriály. Poté byly kombinované nanomateriály podrobeny inkubaci v různých prostředích a sledována kinetika postupného uvolňování. Z naměřených hodnot vyplývá, že zkoumané materiály prokazovaly opět rostoucí trend postupného uvolňování aktivních látek v čase. Při těchto materiálech bylo nejefektivnější uvolňování do prostředí fyziologického roztoku zahřátého na teplotu 37 °C. U některých látek, zejména u ampicilinu, byla pozorována degradace po úplném uvolnění.

Závěrem této práce lze konstatovat, že studium stability antimikrobiálních nanomateriálů přináší důležité poznatky pro jejich praktické využití. Z provedených experimentů vyplývá, že nosičové materiály, zejména obohacené o polymer polyhydroxybutyrát, prokazují stabilitu a schopnost udržet integritu a účinnost aktivních látek, jako jsou přírodní nebo syntetické (antibiotika) antimikrobiální látky. Naopak funkcionalizované nanostruktury, jako jsou nanovlákna, efektivně uvolňují tyto látky do prostředí s ohledem na aplikaci. Kombinace testovaných nanomateriálů nám vytváří efektivní systém pro transport a uvolňování aktivních látek pro konkrétní aplikace, jako je například ochrana kůže. Propojení nosičových materiálů a funkcionalizovaných nanostruktur může být využito například k vytvoření kožních krytů, které nejen poskytují mechanickou ochranu, ale také aktivně bojují proti mikrobiálnímu znečištění a infekcím, což je zvláště důležité v prostředích s vysokým rizikem infekce, jako jsou nemocnice.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MALHOTRA, Bansi a ALI, Md. Nanomaterials in Biosensors. online. *Nanomaterials for Biosensors*. 2018, s. 1-74. ISBN 9780323449236. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>. [cit. 2024-01-08].
- [2] BAIG, Nadeem; KAMMAKAKAM, Irshad a FALATH, Wail. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. online. *Materials Advances*. 2021, roč. 2, č. 6, s. 1821-1871. ISSN 2633-5409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>. [cit. 2023-10-28].
- [3] MEKUYE, Bawoke a ABERA, Birhanu. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. online. *Nano Select*. 2023, roč. 4, č. 8, s. 486-501. ISSN 2688-4011. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/nano.202300038>. [cit. 2023-10-29].
- [4] SAHA, Shreya; BANSAL, Shikha a KHANUJA, Manika. Classification of nanomaterials and their physical and chemical nature. online. *Nano-enabled Agrochemicals in Agriculture*. 2022, s. 7-34. ISBN 9780323910095. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91009-5.00001-X>. [cit. 2024-01-08].
- [5] HALEEM, Abid; JAVAID, Mohd; SINGH, Ravi; RAB, Shanay a SUMAN, Rajiv. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. online. *Global Health Journal*. 2023, roč. 7, č. 2, s. 70-77. ISSN 24146447. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>. [cit. 2023-11-19].
- [6] MALIK, Shiza; MUHAMMAD, Khalid a WAHEED, Yasir. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 18. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28186624>. [cit. 2024-01-09].
- [7] RATHI, Samruddhi; RECHE, Amit; DHAMDHERE, Nutan a BOLENWAR, Akarsh. Perspectives on the Application of Nanomaterials in Medical and Dental Practices. Online. *Cureus*. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://doi.org/10.7759/cureus.43565>. [cit. 2024-01-18].
- [8] GUPTA, Vaibhav; MOHAPATRA, Sradhanjali; MISHRA, Harshita; FAROOQ, Uzma; KUMAR, Keshav et al. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. online. *Gels*. 2022, roč. 8, č. 3. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels8030173>. [cit. 2024-01-09].
- [9] FYTIANOS, Georgios; RAHDAR, Abbas a KYZAS, George. Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates. online. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 5. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano10050979>. [cit. 2024-01-09].
- [10] KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid a KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. online. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, roč. 12, č. 7, s. 908-931. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>. [cit. 2024-01-09].
- [11] JOUDEH, Nadeem a LINKE, Dirk. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022, roč. 20, č. 1. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>. [cit. 2023-10-29].

- [12] 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. 2024-01-09].
- [13] CASTAÑEDA-REYES, Erick; PEREA-FLORES, Maria; DAVILA-ORTIZ, Gloria; LEE, Youngsoo a GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. <p>Development, Characterization and Use of Liposomes as Amphipathic Transporters of Bioactive Compounds for Melanoma Treatment and Reduction of Skin Inflammation: A Review</p>. online. *International Journal of Nanomedicine*. 2020, roč. 15, s. 7627-7650. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S263516>. [cit. 2023-10-30].
- [14] TOMNIKOVA, Alice; ORGONIKOVA, Andrea a KRIZEK, Tomas. Liposomes: preparation and characterization with a special focus on the application of capillary electrophoresis. online. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2022, roč. 153, č. 9, s. 687-695. ISSN 0026-9247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00706-022-02966-0>. [cit. 2023-10-30].
- [15] EZZAT, Shahira; SALEM, Mohamed.; MAHDY, Nihal El a MAHFOUZ, Marwa, Lecithin. online. *Antioxidants Effects in Health*. 2022, s. 375-386. ISBN 9780128190968. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00060-4>. [cit. 2024-01-16].
- [16] SOLIMAN, Ghada. Dietary Cholesterol and the Lack of Evidence in Cardiovascular Disease. online. *Nutrients*. 2018, roč. 10, č. 6. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu10060780>. [cit. 2024-01-16].
- [17] ARNDT, TOMÁŠ. HDL cholesterol a „zlý“ LDL cholesterol. online. In: CelostniMedicina.cz. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/hodny-hdl-cholesterol-a-zly-ldl-cholesterol/>. [cit. 2024-01-16].
- [18] MAJA, Leitgeb; ŽELJKO, Knez a MATEJA, Primožič. Sustainable technologies for liposome preparation. online. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2020, roč. 165. ISSN 08968446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>. [cit. 2023-11-04].
- [19] AKBARZADEH, Abolfazl; REZAEI-SADABADY, Rogaie; DAVARAN, Soodabeh; JOO, Sang; ZARGHAMI, Nosratollah et al. Liposome: classification, preparation, and applications. online. *Nanoscale Research Letters*. 2013, roč. 8, č. 1. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>. [cit. 2023-11-05].
- [20] TIWARI, Arun; KUMAR, Amit a SAID, Zafar. Synthesis, characterization, and measurement techniques for the thermophysical properties of nanofluids. online. *Advances in Nanofluid Heat Transfer*. 2022, s. 59-93. ISBN 9780323886567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88656-7.00012-X>. [cit. 2024-01-09].
- [21] PHAN, Hoa a HAES, Amanda. What Does Nanoparticle Stability Mean?. online. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2019, roč. 123, č. 27, s. 16495-16507. ISSN 1932-7447. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00913>. [cit. 2023-11-02].
- [22] LARGE, Danielle; ABDELMESSIH, Rudolf; FINK, Elizabeth a AUGUSTE, Debra. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021, roč. 176. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>. [cit. 2023-12-28].

- [23] LU, Guang a GAO, Ping. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. online. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. 2010, s. 59-94. ISBN 9780815520252. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4>. [cit. 2023-11-26].
- [24] KANÁSOVÁ, Mária a NESMĚRÁK, Karel. Systematic review of liposomes' characterization methods. online. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2017, roč. 148, č. 9, s. 1581-1593. ISSN 0026-9247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1994-9>. [cit. 2024-01-15].
- [25] ŘEPKA, David; KURILLOVÁ, Antónia; MURTAJA, Yousef a LAPČÍK, Lubomír. Application of Physical-Chemical Approaches for Encapsulation of Active Substances in Pharmaceutical and Food Industries. online. *Foods*. 2023, roč. 12, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12112189>. [cit. 2023-11-19].
- [26] Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System. online. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-05369-4>. [cit. 2024-01-11].
- [27] NĚMCOVÁ, Irena; RYCHLOVSKÝ, Petr a ČERMÁKOVÁ, Ludmila. *Spektrometrické analytické metody*. 1. Praha: Karolinum, 1997-1998. ISBN 80-718-4365-2.
- [28] BARHOUM, Ahmed; PAL, Kaushik; RAHIER, Hubert; ULUDAG, Hasan; KIM, Ick et al. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. online. *Applied Materials Today*. 2019, roč. 17, s. 1-35. ISSN 23529407. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.06.015>. [cit. 2023-11-11].
- [29] HIWRALE, Abhijeet; BHARATI, Swati; PINGALE, Prashant a RAJPUT, Amarjitsing. Nanofibers: A current era in drug delivery system. online. *Heliyon*. 2023, roč. 9, č. 9. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18917>. [cit. 2024-01-09].
- [30] YILMAZ, Fulya; CELEP, Gizem a TETIK, Gamze. Nanofibers in Cosmetics. online. *Nanofiber Research - Reaching New Heights*. 2016. ISBN 978-953-51-2528-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/64172>. [cit. 2024-01-09].
- [31] RAMALINGAM, M. a RAMAKRISHNA, S. Introduction to nanofiber composites. online. *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*. 2017, s. 3-29. ISBN 9780081001738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100173-8.00001-6>. [cit. 2023-11-11].
- [32] ANUSIYA, Ganesan a JAIGANESH, Rengarajan. A review on fabrication methods of nanofibers and a special focus on application of cellulose nanofibers. online. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2022, roč. 4. ISSN 26668939. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100262>. [cit. 2023-11-11].
- [33] PEÑA, CASTILLO, GARCÍA, MILLÁN a SEGURA, Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. online. *Microbial Biotechnology*. 2014, roč. 7, č. 4, s. 278-293. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12129>. [cit. 2024-01-09].
- [34] HAMDY, Shereen; DANIAL, Amal; GAD EL-RAB, Sanaa; SHOREIT, Ahmed a HESHAM, Abd. Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology. online. *BMC*

- Microbiology*. 2022, roč. 22, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>. [cit. 2023-12-18].
- [35] BABOS, György; RYDZ, Joanna; KAWALEC, Michal; KLIM, Magdalena; FODOR-KARDOS, Andrea et al. Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Nanoparticles for Sorafenib and Doxorubicin Anticancer Drug Delivery. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 19. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21197312>. [cit. 2023-12-26].
- [36] SUBBIAH, Thandavamoorthy; BHAT, G.; TOCK, R.; PARAMESWARAN, S. a RAMKUMAR, S. Electrospinning of nanofibers. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2005, roč. 96, č. 2, s. 557-569. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.21481>. [cit. 2024-01-09].
- [37] XUE, Jiajia; WU, Tong; DAI, Yunqian a XIA, Younan. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. online. *Chemical Reviews*. 2019, roč. 119, č. 8, s. 5298-5415. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>. [cit. 2023-11-12].
- [38] PAN, Yanqiao a ZENG, Liangcai. Simulation and Validation of Droplet Generation Process for Revealing Three Design Constraints in Electrohydrodynamic Jet Printing. Online. *Micromachines*. 2019, roč. 10, č. 2. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi10020094>. [cit. 2024-01-20].
- [39] HUANG, Ya; SONG, Jianan; YANG, Cheng; LONG, Yuanzheng a WU, Hui. Scalable manufacturing and applications of nanofibers. online. *Materials Today*. 2019, roč. 28, s. 98-113. ISSN 13697021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2019.04.018>. [cit. 2023-12-27].
- [40] ROHANI SHIRVAN, Anahita; NOURI, Alireza a SUTTI, Alessandra. A perspective on the wet spinning process and its advancements in biomedical sciences. online. *European Polymer Journal*. 2022, roč. 181. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111681>. [cit. 2024-01-15].
- [41] WIELAND, Manuel; ARNE, Walter; MARHEINEKE, Nicole a WEGENER, Raimund. Modeling and simulation of curved fibers in dry spinning scenarios. online. *Results in Applied Mathematics*. 2019, roč. 3. ISSN 25900374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rinam.2019.100013>. [cit. 2024-01-15].
- [42] KUO, C.J. a LAN, W.L. Gel spinning of synthetic polymer fibres. online. *Advances in Filament Yarn Spinning of Textiles and Polymers*. 2014, s. 100-112. ISBN 9780857094995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857099174.2.100>. [cit. 2024-01-15].
- [43] KRAMSCHUSTER, Adam a TURNG, Lih-Sheng. Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. online. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. 2013, s. 427-446. ISBN 9781455728343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00017-3>. [cit. 2024-01-15].
- [44] SHETTY, Karishma; BHANDARI, Ayush a YADAV, Khushwant S. Nanoparticles incorporated in nanofibers using electrospinning: A novel nano-in-nano delivery system. online. *Journal of Controlled Release*. 2022, roč. 350, s. 421-434. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.035>. [cit. 2024-01-15].

- [45] ELSHERBINI, Asmaa a SABRA, Sally Nanoparticles-in-nanofibers composites: Emphasis on some recent biomedical applications. online. *Journal of Controlled Release*. 2022, roč. 348, s. 57-83. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.037>. [cit. 2024-01-16].
- [46] PEZZANI, Raffaele; SALEHI, Bahare; VITALINI, Sara; IRITI, Marcello; ZUÑIGA, Felipe et al. Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective. online. *Medicina*. 2019, roč. 55, č. 4. ISSN 1648-9144. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>. [cit. 2023-12-18].
- [47] LOBO, V; PATIL, A; PHATAK, A a CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. online. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, roč. 4, č. 8. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>. [cit. 2023-12-26].
- [48] COULIBALY, Ahmed; HASHIM, Rokiah; SULAIMAN, Shaida; SULAIMAN, Othman; ANG, Lily et al. Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components. online. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014, roč. 7, s. 553-559. ISSN 19957645. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60289-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60289-3). [cit. 2023-11-13].
- [49] XU, Dong-Ping; LI, Ya; MENG, Xiao; ZHOU, Tong; ZHOU, Yue et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, roč. 18, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>. [cit. 2023-11-13].
- [50] HUTCHINGS, Matthew; TRUMAN, Andrew a WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. online. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, roč. 51, s. 72-80. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>. [cit. 2024-01-10].
- [51] FRENCH, Deborah. Antibiotics. online. *Toxicology Cases for the Clinical and Forensic Laboratory*. 2020, s. 83-98. ISBN 9780128158463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815846-3.00007-7>. [cit. 2023-12-18].
- [52] ZAMAN, Sojib; HUSSAIN, Muhammed; NYE, Rachel; MEHTA, Varshil; MAMUN, Kazi et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. online. *Cureus*. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>. [cit. 2023-12-18].
- [53] C REYGAERT, Wanda. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. online. *AIMS Microbiology*. 2018, roč. 4, č. 3, s. 482-501. ISSN 2471-1888. Dostupné z: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>. [cit. 2024-01-16].
- [54] KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh a ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. online. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 2017, roč. 33, č. 3. ISSN 0970-9185. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15. [cit. 2023-12-18].
- [55] SAMUEL, Baron. *Medical Microbiology. 4th edition*. online. In: University of Texas Medical Branch. 1996. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/>. [cit. 2024-01-10].
- [56] SUN, Guojun; ZHANG, Qian; DONG, Zuojun; DONG, Dashun; FANG, Hui et al. Antibiotic resistant bacteria: A bibliometric review of literature. online. *Frontiers in Public*

- Health*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-2565. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1002015>. [cit. 2023-12-26].
- [57] SWAMICORRESPONDING, Onkar; DWARIKADHISH, Kaushik; MOHAN, Mudit a M BORADE, Dhammra. Ampicillin. online. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2014, roč. 8, č. 5, s. 1-3. ISSN 2249782X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8777.4356>. [cit. 2024-01-10].
- [58] PEECHAKARA V., Basil; BASIT, Hajira a GUPTA, Mohit. Ampicillin. online. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/>. [cit. 2023-11-13].
- [59] CASTLE, Sharon S. Ampicillin. online. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007, s. 1-6. ISBN 9780080552323. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61227-9>. [cit. 2023-12-09].
- [60] *PubChem*. online. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [cit. 2023-11-15].
- [61] HASSOUNAH, Ibrahim; SHEHATA, Nader; KIMSAWATDE, Gade; HUDSON, Amanda; SRIRANGANATHAN, Nammalwar et al. Designing and testing single tablet for tuberculosis treatment through electrospinning. online. *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials*. 2016, s. 335-365. ISBN 9780323415330. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41533-0.00011-8>. [cit. 2024-01-11].
- [62] VARDANYAN a HRUBY, Antibiotics. online. *Synthesis of Essential Drugs*. 2006, s. 425-498. ISBN 9780444521668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-044452166-8/50032-7>. [cit. 2024-01-11].
- [63] FRIEDLAND, Jon S. Tuberculosis and other mycobacterial infections. online. *Infectious Diseases*. 2010, s. 309-327. ISBN 9780323045797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00030-7>. [cit. 2023-12-19].
- [64] GINOVYAN, Mikayel; PETROSYAN, Margarit a TRCHOUNIAN, Armen. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. online. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017, roč. 17, č. 1. ISSN 1472-6882. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1573-y>. [cit. 2024-01-11].
- [65] ANGIOLELLA, Letizia; SACCHETTI, Gianni a EFFERTH, Thomas. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Natural Compounds. online. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018, roč. 2018, s. 1-3. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2018/1945179>. [cit. 2023-11-13].
- [66] KHAMENEH, Bahman; IRANSHAHY, Milad; SOHEILI, Vahid a FAZLY BAZZAZ, Bibi. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. online. 2019, roč. 8, č. 1. ISSN 2047-2994. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>. [cit. 2024-01-11].
- [67] ULANOWSKA, Magdalena a OLAS, Beata. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 7. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>. [cit. 2024-01-11].
- [68] ATAELI, Mahshid; MAGHSOUDI, Armin a HASSANI, Shokoufeh. Eugenol. online. *Encyclopedia of Toxicology*. 2024, s. 513-517. ISBN 9780323854344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00009-4>. [cit. 2023-11-13].

- [69] PAVITHRA, B. Eugenol. online. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014, roč. 6, č. 3, s. 153-154. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/287676963_Eugenol_-_A_review. [cit. 2023-11-13].
- [70] RATHOD, Nikheel; KULAWIK, Piotr; OZOGUL, Fatih; REGENSTEIN, Joe a OZOGUL, Yesim. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. online. 2021, roč. 116, s. 733-748. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.023>. [cit. 2024-01-11].
- [71] SHARIFI-RAD, Mehdi; VARONI, Elena; IRITI, Marcello; MARTORELL, Miquel; SETZER, William et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. online. *Phytotherapy Research*. 2018, roč. 32, č. 9, s. 1675-1687. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>. [cit. 2023-11-13].
- [72] IMRAN, Muhammad; ASLAM, Mahwish; ALSAGABY, Suliman; SAEED, Farhan; AHMAD, Ishtiaque et al. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. online. 2022, roč. 10, č. 11, s. 3544-3561. ISSN 2048-7177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2994>. [cit. 2023-12-09].
- [73] SHEHZAD, Adeeb; SHAHZAD, Raheem a LEE, Young. Curcumin. online. *Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids*. The Enzymes. 2014, s. 149-174. ISBN 9780128022153. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802215-3.00008-2>. [cit. 2023-11-13].
- [74] ŻYMAŃCZYK-DUDA, Ewa; SZMIGIEL-MERENA, Beata; BRZEZIŃSKA-RODAK, Małgorzata a KLIMEK-OCHAB, Magdalena. Natural antioxidants—properties and possible applications. online. 2018, roč. 5, č. 4. ISSN 25728466. Dostupné z: <https://doi.org/10.15406/jabb.2018.05.00146>. [cit. 2023-11-13].
- [75] HEWLINGS, Susan a KALMAN, Douglas. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. online. *Foods*. 2017, roč. 6, č. 10. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods6100092>. [cit. 2023-12-09].
- [76] JAFRI, Huma; ANSARI, Firoz a AHMAD, Iqbal. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. online. *New Look to Phytomedicine*. 2019, s. 203-236. ISBN 9780128146194. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00009-4>. [cit. 2023-11-13].
- [77] ESCOBAR, Angélica; PÉREZ, Miriam; ROMANELLI, Gustavo a BLUSTEIN, Guillermo. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. online. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020, roč. 13, č. 12, s. 9243-9269. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>. [cit. 2023-11-13].
- [78] XIONG, Zheyu; LIU, Linhu; JIAN, Zhongyu; MA, Yucheng; LI, Hong et al. Vitamin E and Multiple Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-Analyses. online. *Nutrients*. 2023, roč. 15, č. 15. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu15153301>. [cit. 2024-01-11].
- [79] TRABER, Vitamin E: Metabolism and Requirements. online. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2013, s. 383-389. ISBN 9780123848857. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00278-6>. [cit. 2023-11-13].

- [80] SINGH, Rajesh a LILLARD, James. Nanoparticle-based targeted drug delivery. online. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009, roč. 86, č. 3, s. 215-223. ISSN 00144800. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>. [cit. 2024-01-07].
- [81] STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean a PATEL, Trushar. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. online. *Biophysical Reviews*. 2016, roč. 8, č. 4, s. 409-427. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>. [cit. 2023-12-18].
- [82] NĚMCOVÁ, Irena; RYCHLOVSKÝ, Petr a ČERMÁKOVÁ, Ludmila. *Spektrometrické analytické metody*. 1. Praha: Karolinum, 1997-1998. ISBN 80-718-4365-2.
- [83] THAMBIRATNAM, Kavintheran; REDUAN, Siti Aisyah; TIU, Zian Cheak a AHMAD, Harith. Application of two-dimensional materials in fiber laser systems. Online. *Nano-Optics*. 2020, s. 227-264. ISBN 9780128183922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818392-2.00009-3>. [cit. 2024-01-18].
- [84] OHNISHI, Naozumi; YAMAMOTO, Eiichi; TOMIDA, Hiromasa; HYODO, Kenji; ISHIHARA, Hiroshi et al. Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC. online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, roč. 441, č. 1-2, s. 67-74. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.019>. [cit. 2024-01-13].
- [85] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [86] ABDU HUSSEN, Ali. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. online. *Annals of Advances in Chemistry*. 2022, roč. 6, č. 1, s. 010-020. ISSN 25763768. Dostupné z: <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>. [cit. 2023-12-18].
- [87] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrola léčiv II*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0818-9.
- [88] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [89] *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
- [90] SHOYKHET, ; BROECKHOVEN, a DONG, . Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practices. online. In: . s. 374-384. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/342902038_Modern_HPLC_Pumps_Perspective_s_Principles_and_Practices. [cit. 2024-01-11].
- [91] *Český lékopis ...: Pharmacopoea Bohemica ..* 1. Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [92] *Review on HPLC Method Development Validation and Optimization*. online. 2019. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: <https://globalresearchonline.net/journalcontents/v56-2/05.pdf>. [cit. 2023-12-27].
- [93] SCOTT, ESSENTIAL OILS. online. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2005, s. 554-561. ISBN 9780123693976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00147-3>. [cit. 2024-01-07].

- [94] SUBRAHMANYA, Swamy Kurra a SAHANA, Batthula. Comparative Study of New Trends in HPLC : A Review T Review. Online. 2013. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Comparative-Study-of-New-Trends-in-HPLC-%3A-A-Review-Kurra-Batthula/5051117ce64146e44da2c9c3e7b1065de94356cc>. [cit. 2024-04-07].
- [95] YANISHLIEVA, Nedyalka V; MARINOVA, Emma M; GORDON, Michael H a RANEVA, Violeta G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Online. *Food Chemistry*. 1999, roč. 64, č. 1, s. 59-66. ISSN 03088146. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00086-7). [cit. 2024-03-30].
- [96] KOZLÍČKOVÁ, Hana. Charakterizace cytotoxického efektu kombinovaných nanomateriálů s antimikrobiálním účinkem [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-19]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156999>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [97] KUNERTOVÁ, Aneta. *Kombinované nanomateriály s antimikrobiálním účinkem pro využití v kosmetice a farmacii*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149094>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [98] JAAFAR, Adila Mohamad; HASNU, Norafida; ZAINAL, Zulkarnain; MASARUDIN, Mas Jaffri; MD. AJAT, Mohd Mokrish et al. Preparation, Characterisation and Antibacterial Activity of Carvacrol Encapsulated in Gellan Gum Hydrogel. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 23. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13234153>. [cit. 2024-04-24].
- [99] SI, W.; GONG, J.; CHANAS, C.; CUI, S.; YU, H. et al. In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards Salmonella serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, roč. 101, č. 6, s. 1282-1291. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03045.x>. [cit. 2024-04-24].
- [100] HUSKEY, Mariah; LEWIS, Paul a BROWN, Stacy D. Stability of Ampicillin in Normal Saline Following Refrigerated Storage and 24-Hour Pump Recirculation. Online. *Hospital Pharmacy*. 2021, roč. 56, č. 5, s. 507-512. ISSN 0018-5787. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0018578720925389>. [cit. 2024-04-24].

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ACN	Acetonitril
DLS	Dynamic light scattering
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MeOH	Methanol
PHB	Polyhydroxybutyrát