

Nanostrukturované lipidové nosiče pro enkapsulaci esenciálních olejů

Sára Šebelová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Sára Šebelová
Osobní číslo:	T22110
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Nanostrukturované lipidové nosiče pro enkapsulaci esenciálních olejů

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Zpracujte literární rešerši na zadané téma. Představte lipidové nanočástice (SLN) a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) a popište jejich přípravu, vlastnosti a využití. Věnujte se rovněž esenciálním olejům, zejména těm, které vykazují bioaktivitu a antimikrobní aktivitu.

II. Praktická část

V praktické části připravte nanostrukturované lipidové nosiče s vybranými enkapsulovanými oleji. Vhodnými technikami stanovte fyzikálně-chemické charakteristiky připravených vzorků. Sledujte vztah mezi složením a vlastnostmi studovaných formulací. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Ghodrati, M; Farahpour, MR and Hamishehkar, H. Encapsulation of Peppermint essential oil in nanostructured lipid carriers: In-vitro antibacterial activity and accelerative effect on infected wound healing. COLLOIDS AND SURFACES A – PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS (2019), vol. 564, pp.161-169
2. de Meneses, AC; Marques, EBP; Leimann, FV; et al. Encapsulation of clove oil in nanostructured lipid carriers from natural waxes: Preparation, characterization and in vitro evaluation of the cholinesterase enzymes, COLLOIDS AND SURFACES A – PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS (2019), vol. 583, Article number 123879
3. Khezri, K; Farahpour, MR and Rad, SM. Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY (2019), 47 (1) , pp.980-988
4. Khezri, K; Farahpour, MR and Rad, SM. Efficacy of Mentha pulegium essential oil encapsulated into nanostructured lipid carriers as an in vitro antibacterial and infected wound healing agent. COLLOIDS AND SURFACES A – PHYSICO-CHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS (2020), vol. 589, Article number 124414

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....

podpis autora

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá lipidovými nosiči, se zaměřením na nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) pro enkapsulaci esenciálních olejů. Práce se věnuje jejich přípravě, charakterizaci a hodnocení stability. Dále se zaměřuje na vybrané esenciální oleje s prokázanou antimikrobiální aktivitou, jejich chemické složení a schopnost inhibovat růst bakterií. Cílem práce je zhodnotit potenciál NLC jako efektivního systému pro transport esenciálních olejů a jejich praktické využití.

Klíčová slova: nanostrukturované lipidové nosiče, esenciální olej, antimikrobiální aktivita

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on lipid carriers, with emphasis on nanostructured lipid carriers (NLC) for the encapsulation of essential oils. The work deals with their preparation, characterization, and stability evaluation. It also focuses on selected essential oils with proven antimicrobial activity, their chemical composition, and ability to inhibit the bacterial growth. The aim of the thesis is to assess the potential of NLC as an effective delivery system for essential oils and their possible applications

Keywords: nanostructured lipid carriers, essential oil, antimicrobial activity

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za odborné vedení, trpělivost a cenné rady během celého zpracování práce a čas který věnovala mé bakalářské práci. Dále děkuji paní prof. Mgr. Leoně Buňkové Ph.D., panu Ing. Ondřeji Rudolfovi Ph.D., panu Ing. Adamu Srncovi, paní laborantce Veronice Kučabové a ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky za poskytnutí laboratoře, vybavení a pomoc při praktické části. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu a motivaci v průběhu studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK	13
2 LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE.....	15
2.1 PEVNÉ LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE.....	15
2.1.1 Charakteristika a vlastnosti	15
2.1.2 Příprava	16
2.1.3 Využití.....	17
2.2 NANOSTRUKTUROVANÉ LIPIDOVÉ NOSIČE.....	18
2.2.2 Příprava NLC	20
2.2.3 Využití.....	21
3 ESENCIÁLNÍ OLEJE A JEJICH SLOŽKY	23
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	23
3.2 ANTIBAKTERIÁLNÍ A ANTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI.....	23
3.3 SKOŘICOVÝ OLEJ.....	24
3.4 HŘEBÍČKOVÝ OLEJ	25
3.5 TEA TREE OLEJ	25
3.6 ROZMARÝNOVÝ OLEJ	26
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
5 CÍL PRÁCE	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
6 POUŽITÉ MATERIÁLY	31
6.1 PŘÍSTROJE A PRACOVNÍ POMŮCKY.....	31
6.2 CHEMIKÁLIE.....	31
7 METODIKA	33
7.1 CHARAKTERIZACE ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	33
7.1.1 Spektrofotometrické stanovení EO	33
7.1.2 Složení EO – plynová chromatografie	34
7.2 PŘÍPRAVA NLC	35
7.3 CHARAKTERIZACE NLC.....	37
7.4 STABILITA NLC	38
7.5 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY.....	38
7.5.1 Disková difúzní metoda	38
7.5.2 Jamková difúzní metoda	39
8 VÝSLEDKY A DISKUSE	42

8.1	CHARAKTERIZACE EO.....	42
8.1.1	Spektrofotometrické stanovení EO	42
8.1.2	Složení EO metodou plynové chromatografie	45
8.2	CHARAKTERIZACE NLC	51
8.2.1	Velikost a distribuce částic	51
8.2.2	Zeta potenciál	53
8.3	STABILITA NLC	55
8.4	MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	60
8.4.1	Disková difúzní metoda.....	60
8.4.2	Jamková difúzní metoda.....	63
ZÁVĚR.....		65
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		67
SEZNAM OBRÁZKŮ		78
SEZNAM TABULEK.....		80
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		81

ÚVOD

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) představují moderní a perspektivní typ nosičových systémů využívaných zejména pro transport biologicky aktivních látek. Díky své schopnosti zlepšit stabilitu, biologickou dostupnost a kontrolované uvolňování aktivních složek nacházejí široké uplatnění v oblasti farmacie, kosmetiky i potravinářství. Vývoj NLC systémů je odpovědí na potřebu překonat limity konvenčních lipidových nosičů, zejména v oblasti jejich stability a enkapsulační účinnosti.

V této práci jsou NLC částice využity jako nosiče pro vybrané esenciální oleje (EO), které jsou známy svými antimikrobiálními vlastnostmi. Enkapsulací těchto těkavých a nestabilních přírodních látek do lipidové matrice lze zlepšit jejich ochranu před degradací, prodloužit účinek a umožnit jejich cílenější využití.

Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace NLC částic obsahujících EO s antibakteriální aktivitou, sledování jejich fyzikálně-chemických vlastností (velikost, distribuce částic, zeta potenciál), hodnocení jejich stability v čase a ověření antimikrobiálních účinků na vybrané rody bakterií.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

V posledních letech roste potřeba vyvíjet různé způsoby, jak dodávat léčiva nebo jiné aktivní látky do organismu. Díky pokroku v oblasti doručení léčiv a zvyšující se poptávce po lokalizovaném doručení, které by mohlo snížit vedlejší účinky léčiv, se jejich orální podání stává méně preferovaným způsobem. Doručování aktivních látek prostřednictvím nosičů léčiv přes pokožku, tedy transdermální podání se tak jeví jako atraktivní alternativa [1].

Systémy, které přenáší a doručují aktivní látky musí splňovat určitá kritéria, jako například určitá enkapsulační schopnost a stabilita, netoxický charakter, biokompatibilita a celková funkčnost daného nosiče, snadná a efektivní výroba a řadu dalších vlastností. Výzkum a vývoj multifunkčních nanočástic jako farmaceutických nosičů léků vedly v posledním desetiletí k exponenciálnímu růstu aplikací v medicíně. Design těchto nanočástic, včetně nanoemulzí, dendrimerů, nano-zlatých částic, liposomů, konjugátů léků s nosiči, komplexů protilátek a léků a magnetických nanočástic, je primárně založen na unikátních uspořádáních syntetických, přírodních nebo biologických složek, včetně syntetických polymerů, kovových iontů, olejů a lipidů jako jejich stavebních bloků. Úspěch těchto částic v klinických aplikacích však závisí na zohlednění důležitých parametrů, jako jsou strategie výroby nanočástic, jejich fyzikální vlastnosti, účinnost enkapsulace a uvolňování léků, a především minimální toxicita samotného nosiče[2]. Jedním ze systémů, který efektivně enkapsuluje danou aktivní látku jsou **lipidové nanočástice**, které jsou charakterizovány v dalších kapitolách této bakalářské práce [3].

Mezi intenzivně zkoumané nosiče lipidové povahy patří liposomy. Jsou to sférické lipidové nosiče ve formě vezikul, které se liší velikostí a skládají se z jedné nebo více soustředných dvouvrstvých membrán. Mají schopnost zachytit jak hydrofilní terapeutické látky ve svém centrálním vodním jádru, tak lipofilní látky v prostoru jejich dvouvrstvy. Liposomy jsou dnes dobře etablované jako nosičové systémy, které obsahují terapeutické látky a dodávají je na různá místa v těle. Liposomy mohou prodlužovat uvolňování zachycených látek, čímž zlepšují terapeutický výsledek [4].

Dalšími možnými nosiči aktivních látek mohou být látky polymerního charakteru. Tyto nosiče představují různé způsoby doručení látek, jako je enkapsulace do polymerních micel, začlenění do polymerních vezikul a kovalentní konjugace za účelem tvorby konjugátů polymer-léčivo. Polymerní nosiče využívají jak přírodní polymery např. chitosan,

cyklodextriny a algináty, tak syntetické polymery např. polyethylenglykol, poly(laktid-co-glykolová kyselina), polyakrylové estery nebo polyethylenimin. Tyto materiály vykazují příznivé vlastnosti, včetně biokompatibility, stability a modifikovatelnosti, což umožňuje jejich aplikaci v různých formách, jako jsou micely, polymerní nanočástice, dendrimery a konjugáty polymer-léčivo. Použití polymerních nosičů však představuje i některá rizika. Může se jednat o imunitní reakci vyvolanou některým ze syntetických polymerů, náročnější výrobu a obtížnou kontrolu rychlosti degradace v těle u biodegradabilních polymerů [5].

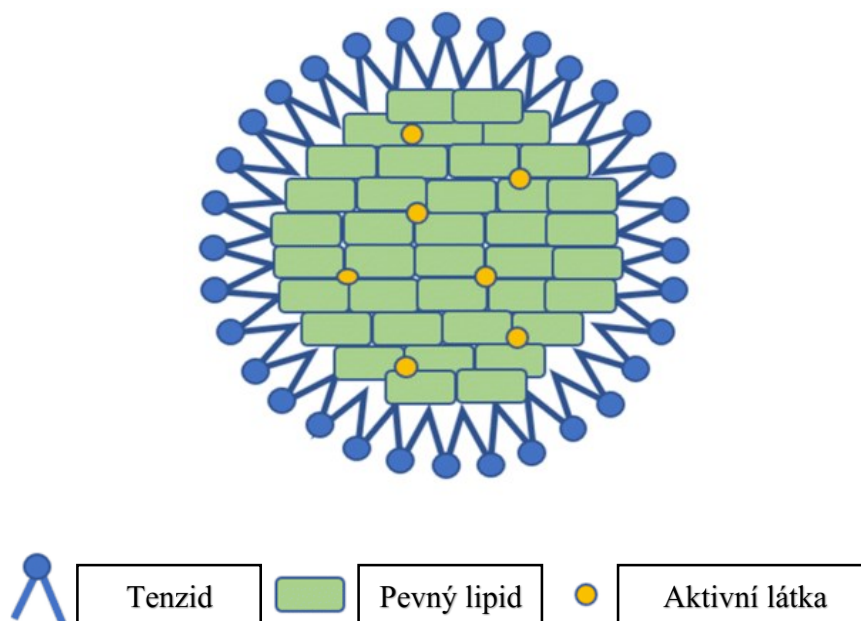
2 LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE

2.1 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice (SLN) byly poprvé vyvinuty na začátku 90. let a jsou první generací lipidových částicových nosičů. Jsou to submikronové koloidní nosiče o velikosti v rozmezí 50 až 1000 nm. Tyto částice se skládají z fyziologických lipidů, které jsou dispergovány ve vodě, pufru nebo ve vodném roztoku surfaktantů. K výrobě SLN se používá široké spektrum lipidů, které jsou pevné a stabilní při pokojové teplotě, jako jsou např. trigacylglyceroly, volné mastné kyseliny a mastné alkoholy. Většina těchto lipidů je nejen biologicky kompatibilní a netoxická, ale také cenově dostupná, což dává SLN velký potenciál jako platformě pro topické dodávání léčiv [1].

2.1.1 Charakteristika a vlastnosti

SLN byly představeny roku 1990 jako možná náhrada liposomů, emulzí a polymerních nanočástic. Mají kulovitou morfologii, kterou lze studovat pomocí TEM (transmisní elektronová mikroskopie) a SEM (skenovací elektronová mikroskopie). SLN jsou složeny z přibližně 0,1 – 30 hm.% tuku, který je dispergován ve vodné fázi. Pro zvýšení stability se používají surfaktanty v koncentracích asi 0,5 až 5 %. Správný výběr lipidů a surfaktantů může ovlivnit velikost částic, dlouhodobou stabilitu během skladování, schopnost enkapsulace aktivních látek a chování při uvolňování. Lipidové složky SLN jsou pevné jak při tělesné, tak při teplotě okolního prostředí. Lipidy, které se používají při přípravě SLN, zahrnují např. mastné kyseliny, steroidy, vosky, mono-, di- a triacylglyceroly [6].



Obrázek 1 SLN částice, upraveno podle [7]

SLN mají oproti jiným koloidním nosičům různé výhody. Mezi jejich hlavní přednosti patří možnost kontrolovaného uvolňování léčiv/aktivních látek a jejich cíleného podání, což zajišťuje efektivní terapii. SLN také zajišťují zvýšenou stabilitu léčiv, což je klíčové pro prodloužení jejich účinnosti. Tyto nosiče dovolují začlenění jak lipofilních, tak hydrofilních látek, což rozšiřuje spektrum jejich použití. Důležitou výhodou je také absence biotoxicity nosiče, což zajišťuje bezpečnost pro lidské tělo. Navíc SLN nevyžadují při výrobě použití organických rozpouštědel [8].

Struktura SLN má však několik nevýhod, které mohou ovlivnit jejich účinnost. Patří sem potenciál pro vyplavení léku v důsledku krystalizace lipidů během skladování. Lipidové disperze mají vysoký obsah vody, což může ovlivnit jejich stabilitu. Dále je zde omezená enkapsulační aktivita a schopnost transdermálního podání léků. SLN mohou také podléhat polymorfním změnám a během skladování může docházet ke zvětšení velikosti částic. Dalším problémem je možnost gelace lipidových disperzí [6].

2.1.2 Příprava

Existují dvě základní metody výroby SLN, technika vysokotlaké homogenizace vyvinutá Müllerem a Lucksem a mikroemulzní technika patentovaná Gascem [9; 9].

Vysokotlaké homogenizátory jsou přístroje, které tlačí kapalinu pod velmi vysokým tlakem (100–2000 bar) skrz úzkou štěrbinu, jen několik mikrometrů širokou. Tento vysoký tlak

a kavitační síly rozbíjejí větší částice na velmi malé částice o submikronové velikosti. Běžný obsah lipidů je mezi 5 a 10 %, tyto lipidy jsou snadno homogenizovány do formy lipidových nanodisperzí. Pro výrobu SLN existují dvě hlavní metody – homogenizace za horka a za studena. V obou případech se nejprve aktivní látka začlení do základního lipidu, a to buď rozpustěním, nebo dispergací v roztaveném lipidu.

Gasco a jeho spolupracovníci vyvinuli techniky přípravy SLN, které jsou založeny na ředění mikroemulzí. Ty jsou vyráběny mícháním opticky transparentní směsi při teplotě 65–70 °C, která je typicky složena z mastné kyseliny (např. stearové kyseliny), emulgátoru (např. polysorbátu 20, polysorbátu 60, sójového fosfatidylcholinu, taurodeoxycholát sodného), koemulgátorů (např. butanolu, sodného monooktylfosfátu) a vody. Horká mikroemulze je dispergována ve studené vodě (2–3 °C) za míchání. Typické objemové poměry horké mikroemulze a studené vody jsou v rozmezí 1:25 až 1:50. Podle literatury je již struktura kapiček obsažena v mikroemulzi, a proto není potřeba žádná energie k dosažení submikronových velikostí částic [10].

Tento přístup však zahrnuje určité nevýhody, jako je nutnost použití surfaktantů v relativně vysokých koncentracích, ředění při zavádění mikroemulze do vody a snížená koncentrace suspendovaných částic.

Dalšími, méně používanými metodami pro přípravu SLN jsou např. emulgace v kombinaci s odpařením rozpouštědla, dále emulgace s následnou difúzí rozpouštědla nebo použití superkritické fluidní technologie [11].

2.1.3 Využití

SLN obsahují biokompatibilní lipidy, které jsou schopné enkapsulovat a uchovávat hydrofilní nebo hydrofobní léky v pevné matici. V současnosti se SLN používají jako nosiče pro antibiotika, chemoterapeutika, nukleové kyseliny, bylinné extrakty a další aktivní látky. Díky svým výhodným vlastnostem, jako je absence toxicity, biokompatibilita a jednoduchý výrobní postup jsou široce aplikovány v biomedicíně.

Výhodou SLN je také jejich stabilita. Nanočástice chrání aktivní složky před vnějšími vlivy, například před degradací způsobenou světlem nebo kyslíkem, čímž zajišťují dlouhodobou účinnost enkapsulovaného obsahu. SLN také umožňují řízené uvolňování, což znamená, že léčivo může být uvolňováno postupně a kontrolovaně na místě působení, což vede k lepším terapeutickým účinkům a minimalizuje riziko nežádoucích účinků spojených s náhlým uvolněním vysoké dávky léku.

SLN jsou velmi flexibilní, pokud jde o metody podávání. Mohou být podávány perorálně, topicky nebo injekčně, což umožňuje jejich širokou aplikaci v různých oblastech medicíny. Výhodou SLN je, že mohou být použity i pro oftalmologické aplikace, kde jsou schopny zlepšit biologickou dostupnost léčiv a zvýšit jejich absorpci přes rohovku. Tato schopnost je v oftalmologii velmi důležitá, protože zlepšuje efektivitu léčby očních onemocnění a poskytuje pacientům lepší terapeutické výsledky [12].

SLN byly také využity k novým aplikacím, jako je např. dodání železa do organismu. Zde jako příklad může sloužit síran železnatý (FeSO_4), který byl enkapsulován do lipidové matrice na bázi kyseliny stearové. Výzkumy ukázaly, že SLN mohou být efektivním nástrojem pro perorální podávání léků, protože pomáhají chránit aktivní složky před degradací v trávicím traktu a zajišťují jejich postupné uvolňování na správném místě.

Celkově lze říct, že SLN představují univerzální nástroj pro moderní farmaceutickou terapii. Díky své schopnosti nést široké spektrum léků, jejich bezpečnosti, stabilitě a flexibilitě v aplikaci se staly cenným nástrojem pro řízené a cílené podávání léků. S jejich pomocí je možné dosahovat lepších terapeutických výsledků a zároveň minimalizovat vedlejší účinky a riziko toxicity, což z nich činí perspektivní technologii pro budoucí medicínu [13].

Ačkoli použití SLN představuje mnoho výhod, mají také některé nevýhody, které mohou ovlivnit jejich účinnost a praktické použití. Vzhledem k těmto nevýhodám, které jsou zmíněny v kapitole 2.1.1. se nabízí využití nanostrukturovaných lipidových nosičů jako výhodnější.

2.2 Nanostrukturované lipidové nosiče

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) představují druhou generaci nosičů na bázi lipidů. Jsou to koloidní systémy pro dodávání léčiv a aktivních látek v nano velikosti, které obsahují kombinaci pevných a kapalných lipidů ve svém jádru a tenzidů na povrchu. Tento typ lipidového nosiče je považován za biokompatibilní, netoxický a bezpečný pro použití při dodávání léčiv, zejména ve srovnání s polymerními nebo kovovými nanočásticemi [14].

NLC řeší nedostatky SLN, které představují 1. generaci lipidových nosičů tím, že enkapsulují větší množství aktivních látek, mají lepší profil uvolňování a stabilitu. Toho je dosaženo díky použití směsi pevných a tekutých lipidů v jejich formulacích. Srovnání SLN a NLC bylo provedeno v řadě odborných studií, jejichž výsledky ukázaly, že NLC jsou

lepšími nosiči. Důvodem je jejich struktura, tedy přítomnost tekuté lipidové složky (oleje) v NLC, která poskytuje více místa pro přenášenou aktivní látku, a také snižuje bod tání systémů. To omezuje rekrystalizaci pevných lipidů během procesu skladování. Menší velikost NLC oproti SLN je rovněž výhodná, jelikož díky větší ploše povrchu umožňují NLC rychlejší uvolňování aktivní látky [15].

NLC jsou ideální pro zlepšení rozpustnosti a permeability léčiv, přičemž umožňují cílené dodávání léků i do těžko přístupných orgánů. Povrchová modifikace NLC a přidání různých složek umožňují zacílení léčiva na konkrétní místo a prodloužení jeho účinku.

2.2.1 Charakteristika a vlastnosti

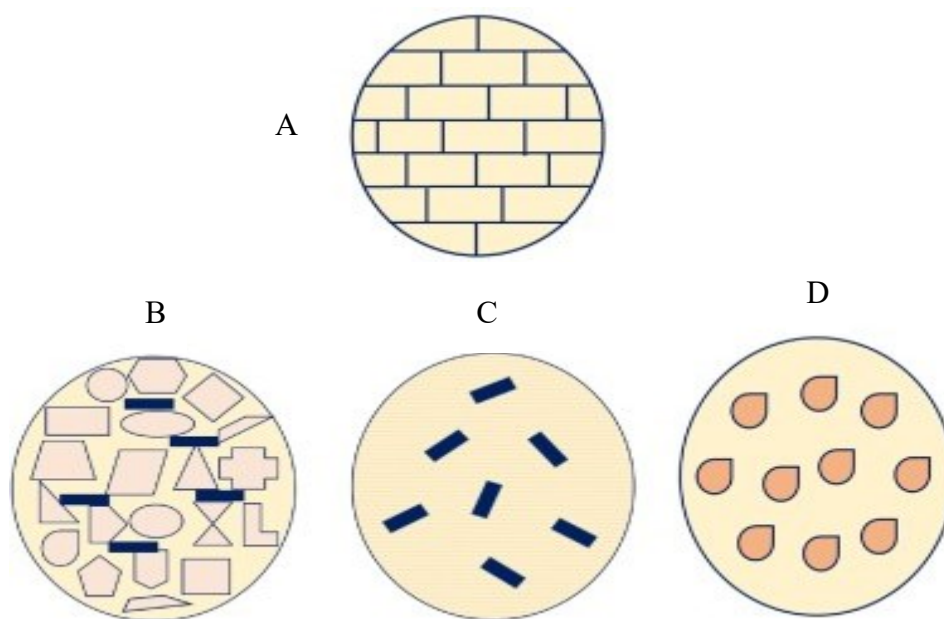
Pro NLC je charakteristická jejich velikost, která se pohybuje v rozmezí 10 až 1000 nm, Pro cílené dodávání léků a jiných aktivních látek je však preferováno velikostní rozmezí 50 až 300 nm. Částice s touto velikostí snadněji překonávají biologické bariéry, zvyšují příjem aktivních látek do buněk a umožňují rychlou reakci, zatímco velikost NLC nad 300 nm je vhodná pro doručení léků do střev. Velikost částic závisí na jejich složení, ale také na druhu použité výrobní metody [16].

Ze studií, které byly prováděny na systémech NLC s různým složením bylo zjištěno, že stabilita, rozpustnost, enkapsulační účinnost a další vlastnosti závisí právě na konkrétním složení částice, tedy druhu olejové a lipidové fáze, jejich vzájemném poměru, a na typu enkapsulované aktivní látky [17].

Podle zastoupení lipidové a olejové fáze lze částice rozdělit do tří skupin:

- Imperfektní typ NLC, který vzniká smícháním lipidů, jako jsou např. acylglyceoly složené z různých mastných kyselin. Tato směs způsobí nepravidelnosti v krystalické struktuře lipidů, které pak mohou pojmout molekuly enkapsulované látky.
- Amorfní typ částic je tvořen amorfni matricí, která vzniká smícháním speciálních lipidů, jako je např. hydroxy oktacosanyl hydroxylstearát nebo izopropylmyristát, s pevným lipidovým základem. V tomto typu NLC není žádná uspořádaná struktura, což zabraňuje vylučování enkapsulované látky, ke kterému by mohlo dojít při skladování, pokud by došlo ke krystalizaci.
- Vícenásobný typ NLC představuje nosič typu olej – pevný tuk – voda. Obsahuje mnoho drobných „kapes“ naplněných tekutým olejem, které jsou rozptýlené

v pevném lipidovém základu. V těchto malých „kapsách“ se enkapsulovaná aktivní látka lépe rozpouští, což znamená, že může být použita ve větším množství. Uvolňování látky je také pomalejší, protože kapsy jsou obklopeny pevným lipidovým základem, který tento proces zpomaluje.



Obrázek 2 Typy NLC částic (A – SLN, B – imperfektní NLC, C – amorfní NLC, D – vícenásobný NLC), upraveno podle [16]

Jednou z dalších vlastností, kterými lze NLC částic charakterizovat je jejich zeta potenciál (ZP), tedy veličina, která vyjadřuje velikost náboje na povrchu koloidní částice. Tento náboj vzniká na rozhraní mezi pevným povrchem částice a jejím kapalným dispersním prostředím a určuje, jak silně je částice ovlivněna elektrostatickými silami [18].

Zeta potenciál je významný pro predikci stability koloidních systémů, a tedy i částic NLC. Hodnoty ZP vyšší než +30 mV nebo nižší než –30 mV jsou považovány za dostatečné pro stabilitu NLC. ZP může být ovlivněn povahou lipidů a použitého tenzidu při výrobě [19].

2.2.2 Příprava NLC

Existuje několik různých postupů a metod pro přípravu NLC, např. mikroemulgace, vytěsnění rozpouštědla nebo nejčastěji používaná metoda vysokotlaké homogenizace za horka. Této metodě se obvykle dává přednost před metodami ostatními, jelikož je jednoduchá, praktická a nevyžaduje použití žádného organického rozpouštědla. Směs lipidů s aktivní látkou se po zahřátí a rozpuštění smíchá s horkým vodným roztokem surfaktantu.

Vzniklá mikroemulze se homogenizuje pod vysokým tlakem (HPH), čímž se docílí zmenšení částic v roztoku a vzniká tak horká nanoemulze, která může být následně sonikována, aby bylo dosaženo malých částic a jednotné distribuce jejich velikostí. V laboratorních podmínkách může být zmenšení velikosti částic dosaženo rovněž jinými homogenizačními technikami, např pomocí dispergátoru Ultraturax [20].

Homogenizace za horka je proces, který se provádí při teplotách nad bodem tání použitých lipidů. Tato metoda funguje na základě působení tlaku a smykové síly na lipidy, čímž je zajištěno zmenšení nebo rozdělení pevných částic na menší jednotky.

Další možností přípravy NLC je homogenizace za studena, která zahrnuje smíchání aktivní látky s lipidovou fází při teplotě vyšší, než je teplota tání použitých lipidů, které je následované okamžitým chlazením směsi pomocí kapalného dusíku nebo suchého ledu, což umožňuje rychlou rekrystalizaci pevných lipidových částic. Tyto částice jsou následně rozemlety a emulgovány ve studené vodné fázi pomocí homogenizátoru, aby se vytvořily nanostruktury o menší velikosti. Tato metoda přípravy částic nabízí řadu výhod, jako je snadná výroba ve velkých objemech, absence organických rozpouštědel a zlepšení stability konečného produktu. Nicméně, požadavky na vysoké tlaky a teplotu mohou představovat technickou výzvu. Další potenciální problém spočívá v neúplné homogenizaci, která může vést k přítomnosti mikročástic, místo dosažení rovnoměrné velikostní distribuce částic s velikostmi v řádu nanometrů [21].

2.2.3 Využití

Díky výhodným vlastnostem, které NLC nabízejí, se stále více používají pro dodávání léků nebo jiných aktivních látek do organismu. Velké využití mají například při dodání chemoterapeutických léků, medikamentů pro oční infekce nebo léků na bázi proteinů a peptidů. Lze je použít různými způsoby a jsou vhodné pro parenterální, orální, nosní a plicní aplikace. NLC rovněž snižují vedlejší účinky enkapsulovaných léčiv a zlepšují jejich farmakokinetiku a stabilitu. Další výhodou pro farmaceutické užití NLC je schopnost pronikat hematoencefalickou bariérou a tím doručovat farmaka až do centrální nervové soustavy [22].

Při transdermálním podání vytvářejí NLC tenkou hydrofobní vrstvu, která na kůži působí okluzivně, což znamená, že snižuje ztrátu vody z pokožky a tím zvyšuje její hydrataci. Tato vrstva také zvětšuje mezery mezi kožními buňkami, což usnadňuje pronikání léků/aktivních látek do kůže. NLC mohou rovněž ovlivnit přirozenou strukturu kožních buněk tím,

že interagují s kožním mazem a lipidy, což vede k uvolnění zapouzdřených léků a lepšímu průniku do hlubších vrstev pokožky, zejména do *epidermis* a *dermis*, v závislosti na lipofilitě léků [23].

3 ESENCIÁLNÍ OLEJE A JEJICH SLOŽKY

Termín esenciální oleje označuje koncentrované extrakty z rostlin, které obsahují aromatické a bioaktivní složky. Tyto oleje se získávají různými metodami, jako je lisování, destilace párou nebo extrakce pomocí rozpouštědel. Esenciální oleje (EO) mají široké využití a lze se s nimi setkat v kosmetice, farmacii, nebo v aromaterapii. Některé EO vykazují bioaktivitu a antimikrobiální účinky, a tyto vlastnosti mohou být využívány při léčení a hojení ran [24; 25].

Protože se jedná o velmi koncentrované výtažky, mohou v určitých koncentracích vyvolat alergenní nebo iritační reakce. Může tomu tak být i u citlivějších osob (děti, těhotné ženy, alergici) [26].

3.1 Obecná charakteristika

Esenciální oleje jsou hydrofobní látky složené z různých aktivních složek, jako jsou například terpeny, terpenoidy, fenolické sloučeniny a další. Složení esenciálních olejů závisí na druhu rostliny, ze kterých jsou získávány. Tyto oleje mohou být obsaženy v plodech rostlin, v kořenech, stoncích, listech nebo kůře.

Podle zastoupení jednotlivých aktivních látek v EO můžeme pozorovat jejich různé vlastnosti a účinky. Mezi nejběžnější patří protizánětlivé, antimikrobiální, analgetické, antioxidantní, antiseptické a detoxikační účinky, některé oleje působí relaxačně a navozují tak mentální pohodu jedince. Kvůli vysoké koncentraci aktivních složek v EO, je s nimi zapotřebí zacházet opatrně a při přímém použití je zředit nosným olejem, např. kokosovým [27].

3.2 Antibakteriální a antimikrobní vlastnosti

Vzhledem k tomu, že bakalářská práce se zaměřuje na antimikrobní aktivitu NLC s obsahem esenciálních olejů, bude tématu antimikrobní aktivity EO věnována následující část práce.

V současné době dochází k stále rostoucímu výskytu infekcí způsobených rezistentními bakteriemi. Rezistence bakterií vůči současným dostupným antibiotikům se stala globálním problémem veřejného zdraví, což vede k naléhavé potřebě nalezení alternativních látek s antibakteriálními vlastnostmi. Dochází tak k obnovení zájmu o vývoj antibakteriálních látek z přírodních zdrojů, přičemž aktivní látky obsažené v esenciálních olejích jsou v tomto ohledu dobrými adepty [28].

Antibakteriální aktivitu esenciálních olejů ovlivňuje jejich složení, funkční skupiny přítomné v aktivních složkách a jejich vzájemné synergické interakce. Mechanismus jejich antimikrobiálního účinku se liší podle druhu esenciálního oleje nebo kmene mikroorganismu, na který olej působí. Je obecně známo, že grampozitivní bakterie jsou k esenciálním olejům citlivější než bakterie gramnegativní. Mezi grampozitivní bakterie patří takové, které jsou obklopeny jedinou peptidoglykanovou buněčnou stěnou, například bakterie rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*. Gramnegativní bakterie mají mnohem tenčí peptidoglykanovou buněčnou stěnu, ale obsahují navíc vnější membránu obsahující lipopolysacharidy. Zde zahrnujeme např. bakterie rodů *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* [29; 30; 31]. Nejznámějšími zástupci EO s antimikrobiální aktivitou jsou oleje z tymiánu, citronové trávy, skořice, levandule, čajovníku, hřebíčku bílé jedle, nebo třeba rozmarýnu. U těchto olejů byly pozorovány rovněž antimikrobní účinky jejich těkavých složek [32].

Kromě antibakteriálních vlastností mají některé oleje také antivirotické a antifungální vlastnosti, tedy inhibují růst a množení plísní a virů. Studie uvádí [33], že různé EO a jejich složky jsou účinnými antivirovými a virocidními látkami, které inhibují virové progeny blokováním různých kroků infekčně-replicativeho cyklu DNA a RNA virů v různých liniích hostitelských buněk. Některé *in vitro* studie, které se zabývají hydrofilními doručovacími systémy s enkapsulovanými EO ukazují, že enkapsulace představuje slibný způsob, jak zlepšit chemickou stabilitu EO a zvýšit jejich biologickou dostupnost a antivirovou účinnost.

V další části práce jsou blíže charakterizovány oleje, které jsou použity v bakalářské práci.

3.3 Skořicový olej

Tento olej se nejčastěji získává ze sušené vnitřní kůry výhonků stromů druhu *Cinnamomum zeylanicum*, který se hojně pěstuje v Indii, Brazílii nebo na Jamajce. Aktivní látky tohoto oleje jsou obsaženy i v listech, semenech, stoncích nebo pupenech. Nejdůležitějšími aktivními složkami tohoto EO jsou cinnamaldehyd a eugenol. Cinnamaldehyd je aldehyd dodávající skořici specifickou vůni a chuť. Je hlavní složkou kůry výhonků a je jednou z látek zodpovědných za antimikrobní účinky EO [34].

Eugenol je nejvíce obsažen v listech stromu, kde se jeho koncentrace pohybuje od 70 do 95 %. Jedná se bioaktivní přírodní fenolický monoterpenoid, který je obsažen i v dalších EO (hřebíček, pepř, muškátový oříšek) [35].

Mezi další aktivní látky, které jsou obsaženy ve skořicovém EO, patří kyselina skořicová, kyselina kumarová a cinnamylalkohol. Díky tomuto složení má olej protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální, antidiabetické, antitumorové, antimutagenní účinky a přispívá ke zlepšení paměti [34].

3.4 Hřebíčkový olej

Zdrojem hřebíčku je aromatická rostlina hřebíčkovec kořený (*Syzygium aromaticum*), která je široce pěstovaná v tropických a subtropických zemích. Je bohatá na těkavé sloučeniny a antioxidanty, jako jsou eugenol, β -karyofylen a α -humulen. Esenciální olej z hřebíčku získal značnou pozornost díky svému použití v parfumerii, kosmetice, zdravotnictví, medicíně a potravinářském průmyslu. Esenciální olej z hřebíčku vykazuje biologickou aktivitu relevantní pro lidské zdraví, včetně antimikrobiální, antioxidační a insekticidní aktivity [36].

Hlavní složka hřebíčkového oleje eugenol má antimikrobiální, protirakovinné, antioxidační, protizánětlivé a analgetické účinky. Různé deriváty eugenolu se používají v medicíně jako lokální anestetika a antiseptika. Navzdory svým četným aplikacím však eugenol vykazuje také vedlejší účinky, zejména pokud je užíván v množství vyšším, než je doporučená dávka. Může způsobit nevolnost, závratě, křeče a rychlý srdeční tep [37].

3.5 Tea tree olej

Esenciální olej z čajovníku, také známý jako tea tree olej, je bohatý na monoterpeny a získává se parní destilací australské rostliny *Melaleuca alternifolia*. Olej obsahuje přibližně 100 složek, přičemž nejhojnější složkou je terpinen-4-ol, který tvoří obvykle kolem 40 % oleje. Esenciální olej z čajovníku vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu. Hlavním mechanismem antibakteriálního účinku tohoto EO je poškození buněčné membrány bakterií nespecifickým způsobem [38].

Kromě antimikrobiálních účinků se čajovníkový olej využívá pro svoje antioxidantní, analgetické a protizánětlivé účinky, například při zmírnění akné a dalších dermatologických onemocněních, v zubním lékařství, při léčbě infekčních chorob. Analgetické a protisvědivé vlastnosti nejsou však dostatečně zdokumentovány a otestovány [39].

3.6 Rozmarýnový olej

Rozmarýn (*Rosmarinus officinalis* L.) je stálezelený keř, který roste podél Středozevního moře a v podhorských oblastech Himálají. V lidovém léčitelství byl používán jako antispasmodikum, mírné analgetikum, k léčbě bolestí hlavy, migrény, nespavosti, emočního rozrušení a deprese, k léčbě renální koliky a respiračním nemocem. EO z rozmarýnu vykazuje významné antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, anti-apoptotické, protinádorové a neuroprotektivní vlastnosti. Dále vykazuje klinické účinky, co se týká pozitivního vlivu na náladu, učení, paměť, bolest, úzkost a spánek, čehož se využívá v aromaterapii. Některé studie poukazují na stimulační účinky pro růst vlasů [40].

Složení EO je spojené s regionálností, sezónností, environmentálními podmínkami, agronomickými podmínkami a odrůdami samotného rozmarýnu. Obecně mezi aktivní složky rozmarýnu patří triterpeny, fenolické diterpeny a fenolické kyseliny. Konkrétně 1,8- cineol, α -pinen, kafr, kamfen a β -pinen. Díky těmto látkám vykazuje rozmarýnový EO antifungální a antimikrobiální účinky u gram negativních i gram pozitivních bakterií [41; 42].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

NLC jsou jedním ze slibných nosičů v oblasti farmaceutických a kosmetických technologií, zejména díky své schopnosti efektivně enkapsulovat a transportovat biologicky aktivní látky, včetně EO. Využití EO v oblastech, jako jsou aromaterapie, kosmetika či farmacie, je však často omezeno jejich těkavým charakterem, snadnou degradací a špatnou rozpustností ve vodných médiích. Enkapsulace EO do lipidových částic tak nabízí řešení těchto nedostatků, čímž zlepšuje jejich stabilitu, biodostupnost a kontrolované uvolňování [43].

V této části bakalářské práce jsou zmíněny některé studie a výzkumy, které pojednávají o vývoji v dané oblasti a zabývají se enkapsulací esenciálních olejů do NLC, jejich vlastnostmi a použitím.

V roce 2019 byla trojicí Khezria, Reza Farahpour a Mounesi Rad provedena studie hodnotící vliv topicky podaného rozmarýnového esenciálního oleje (REO) enkapsulovaného v NLC na antibakteriální aktivitu a hojení infikovaných ran na zvířecím modelu. REO-NLCs prokázaly antibakteriální účinnost proti několika patogenům a snížily bakteriální kolonizaci a velikost rány. Kromě toho zlepšily vaskularizaci, infiltraci fibroblastů a podporovaly re-epiteliální obnovu a produkci kolagenu. Výsledky ukázaly, že REO-NLCs urychlují hojení infikovaných ran, což potvrzuje jejich potenciální klinické využití při léčbě infikovaných ran [44].

Cílem studie z roku 2019 publikované de Meneses a kol. bylo vyrobit NLC pomocí metody homogenizace za horka kombinované s ultrazvukovou emulgací a zhodnotit účinek volného a enkapsulovaného esenciálního oleje z hřebíčku na modulaci cholinesterázových enzymů *in vitro* za použití tkáně *Drosophila melanogaster*. NLC, složené z přírodního vosku (karnaubský nebo včelí) a crodamolu, měly průměr částic mezi 121 a 367 nm a vykazovaly dobrou koloidní stabilitu. *In vitro* testy prokázaly, že volný esenciální olej z hřebíčku inhiboval butyryl- a acetylcholinesterázové enzymy při koncentraci nad 10 mM, s hodnotami IC_{50} 4,3 mM pro první a 3,5 mM pro druhý z enzymů. NLC disperze s esenciálním olejem z hřebíčku vykazovaly nižší hodnoty IC_{50} , což naznačuje zvýšení rozpustnosti oleje a jeho konzervaci v NLC. Výsledky ukazují, že NLC disperze mají dobrý potenciál pro použití v potravinářských a kosmetických vodných formulacích s biologickou aktivitou [45].

Výzkum prováděný v roce 2020 Bashiri a kol. se zaměřil na NLC vhodné pro využití při vývoji nových funkčních potravin. NLC s esenciálním olejem ze skořice (CEO) byly

připraveny s různými jedlými oleji (kukuřičný, sezamový, mandlový), kakaovým máslem a surfaktantem (Tween 80). Průměrná velikost částic byla 100–120 nm a účinnost enkapsulace přesáhla 82 %. Stabilita NLC byla hodnocena při různých pH (mléko 6,8; ovocné šťávy 3,8) a po pasterizaci, přičemž vlastnosti se mírně měnily. NLC na bázi mandlového oleje vykazaly nejlepší ochranu a stabilitu CEO v potravinových nápojích [46].

V roce 2022 provedli Fitriani a kol. studii, která pojednávala o antifungálních vlastnostech tea tree oleje (TTO) enkapsulovaného v NLC. Cílem bylo vytvoření stabilní formulace TTO obsaženého v NLC jako topického antifungálního přípravku. NLC byly připraveny metodou vysokorychlostní homogenizace s pevnými a tekutými lipidy, surfaktanty a destilovanou vodou. Byly charakterizovány pomocí velikosti částic, polydisperzity, zeta potenciálu, pH a viskozity. Testy zahrnovaly rovněž sledování koloidní stability při pokojové teplotě (27 ± 2 °C) po dobu jednoho měsíce a *in vitro* antifungální aktivity. NLC složené z kyseliny stearové, glyceryl monostearátu, cetylalkoholu, Miglyolu 812 a olivového oleje tvořily malé částice s úzkou polydisperzitou. Připravené NLC s TTO prokázaly antifungální účinnost srovnatelnou s krémem ketokonazolem. Ve studii tak byly úspěšně vyvinuty stabilní NLC s enkapsulovaným TTO s vysokým antifungálním potenciálem [47].

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části BP bylo vypracovat literární rešerši o lipidových nosičích, konkrétně o pevných lipidových nanočásticích (SLN) a nanostrukturovaných lipidových nosičích (NLC). Pozornost byla dále soustředěna na esenciální oleje (EO) s antimikrobiálními vlastnosti, především skořicový, hřebíčkový, tea tree a rozmarýnový olej a jejich enkapsulaci do výše uvedených nosičů.

V praktické části bylo cílem práce připravit NLC s vybranými enkapsulovanými oleji, stanovit fyzikálně chemické vlastnosti samotných EO a NLC částic s důrazem na vztah mezi složením a vlastnostmi určených formulací. Dále byly testovány antimikrobní vlastnosti připravených NLC s enkapsulovanými EO.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ MATERIÁLY

V této kapitole jsou uvedeny použité přístroje, chemikálie a pomůcky, se kterými jsem pracovala.

6.1 Přístroje a pracovní pomůcky

- Analytické váhy
- Homogenizační zařízení T 25 digital Ultra Turrax (IKA, Německo)
- Sonikační zařízení (Hielscher UP400St, Německo)
- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern, Spojené království)
- Vortex mixer (Labnet,
- Přístroj pro stanovení hustoty mikrobiální suspenze Densi-La-Meter (Erba Lachema s.r.o.)
- Přístroj pro počítání kolonií Schutt count plus (Schuett-biotec GmbH)
- Sterilní mikrobiologické disky (Himedia, Německo)
- Spektrofotometr 6600 UV VIS (Photo-lab)
- Plynový chromatograf: DANI Master GC Fast Gas Chromatograph vybavený FID detektorem
- Mikrostríkačka Hamilton 10 μ L
- Kolona: Zebron ZB-5MS, GC, 30m x 0,25mm x 0,5 μ m (nepolární)

6.2 Chemikálie

- Glyceryl Behenate, Compritol 888 CG ATO (Nature-store, Česká republika) číslo šarže: 45023
- Kyselina olejová 90 % (Sigma Aldrich, USA)
- Polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát – Tween 80
- EO – Rosmarinus Officinalis, Rozmarýn (Nobilis Tilia s.r.o., Česká republika)
- EO – Malaleuca Alternifolia, Tea tree, původ Austrálie (Míča a Harašta s.r.o., Česká republika)

- EO – *Eugenia Caryophyllus*, Hřebíček, původ Indonésie (Míča a Harašta s.r.o., Česká republika)
- EO – *Cinnamomum Cassia*, skořice, původ Čína (Míča a Harašta s.r.o., Česká republika)
- Mueller-hinton agar (Himedia, Německo)
- Ethanol 96 % (Penta, Česká republika)
- Methanol koncentrovaný p.a. (P-LAB Brno s.r.o., Česká republika)
- Propan-2-ol p.a. (P-LAB Brno s.r.o., Česká republika)
- Fyziologický roztok- 0,9% roztok chloridu sodného (NaCl) ve vodě
- Demineralizovaná voda

7 METODIKA

V této části bakalářské práce jsou popsány praktické postupy, příprava a charakterizace NLC, stanovení stability a testování mikrobiologických vlastností NLC s esenciálními oleji.

7.1 Charakterizace esenciálních olejů

Pro přípravu NLC byly použity 4 druhy esenciálních olejů, které vykazují antimikrobiální aktivitu. Prvotní charakterizace byla prováděna pomocí UV-VIS spektroskopie a podrobné složení jednotlivých olejů bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie. V praktické části BP byly použity EO z rozmarýnu, plodů hřebíčku, tea tree a kůry skořice.



Obrázek 3 Použité esenciální oleje (zdroj: vlastní)

7.1.1 Spektrofotometrické stanovení EO

UV-VIS spektrofotometrie je rychlá a efektivní technika pro získání základních informací o absorpčním spektru esenciálních olejů, které obsahují různé aromatické sloučeniny, terpeny, flavonoidy a další látky, jež mají charakteristické absorpční maximum v UV oblasti (200 až 400 nm).

Navážky EO byly naředěny na koncentraci ~0,2 mg/ml do odměrných baněk potřebným množstvím methanolu, takto připravenými roztoky byla naplněna křemenná kyveta a vložena do spektrofotometru. Měření spekter bylo prováděno při vlnových délkách v rozsahu 200 až 400 nm a bylo zjištěno absorpční maximum každého z esenciálních olejů použitých pro výrobu NLC suspenzí.

Tabulka 1 Navážky esenciálních olejů pro UV-VIS spektrofotometrii

Esenciální olej	Rozmarýn	Hřebíček	Tea tree	Skořice
Navážka [g]	0,2080	0,1860	0,2369	0,1965

(zdroj: vlastní)

7.1.2 Složení EO – plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jednou z analytických metod, které umožňují detailní rozdělení a identifikaci jednotlivých složek v esenciálních olejích. Metoda je založena na rozdílné afinitě těkavých složek k mobilní a stacionární fázi. Mobilní fází je nosný, inertní plyn nejčastěji dusík, vodík nebo helium. Stacionární fází je mikroskopická vrstva kapaliny nebo polymeru na inertním pevném podkladu uvnitř kolony, kterou procházejí různými rychlostmi složky vzorku, v závislosti na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech. Čas, ve kterém jednotlivé složky vzorku opustí stacionární fází, se nazývá retenční čas a je ukazatelem přítomnosti konkrétní složky ve vzorku [48].

Pro analýzu EO byly připraveny roztoky 1 μl oleje v 1500 μl rozpouštědla (propan-2-ol). Pro snadnou manipulaci byly vzorky po celou dobu stanovení uchovávány ve vialkách opatřených víčkem se septem vhodným k průchodu jehly Hamiltonovy mikrostříkačky. Z připravených vzorků byl Hamiltonovou stříkačkou odebrán 1 μl a nastříknut do plynového chromatografu. Analýza EO byla prováděna na přístroji DANI Master GC, opatřeném FID detektorem, jako nosný plyn byl použit dusík s průtokem 25 ml/min a kolonou Zebron ZB-5MS, GC, 30 m x 0,25 mm x 0,5 μm (nepolární). Injektor byl vyhřát na 200 °C a pro analýzu byl zvolen následující teplotní gradient: počátek při 50 °C, ohřev na 120 °C rychlostí 6 °C/min, dále ohřev do 230 °C rychlostí 15 °C/min, konec za 15 min při 230 °C. Dělič toku rozdělil nosný plyn v poměru 1:25, což zajistilo vysokou citlivost metody. Celkový čas analýzy činil ~34 minut. Výsledkem analýzy byl chromatogram, ze kterého byly odečteny retenční časy jednotlivých složek EO použité k identifikaci jejich složek. V každém z EO bylo rovněž stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých složek.



Obrázek 4 Plynový chromatograf DANI Master GC (zdroj: vlastní)



Obrázek 5 Hamiltonova mikrostříkačka použitá pro nástřik vzorků EO (zdroj: vlastní)

7.2 Příprava NLC

Pro praktickou část bakalářské práce bylo připraveno celkem pět vzorků suspenzí NLC s různými esenciálními oleji (skořicový, hřebíčkový, tea tree, rozmarýnový a kombinace skořicového s rozmarýnovým olejem). Skořicový olej a kombinace skořicového oleje s rozmarýnem byly použity rovněž ve vyšší koncentraci (Tabulka 2). Jeden vzorek NLC byl připraven bez aktivní látky a byl dále použit při mikrobiologických testech, jako kontrolní vzorek. Všechny NLC byly připravovány metodou homogenizace za horka s následnou sonikací, která slouží pro zmenšení velikosti a zúžení distribuce velikosti částic suspenze.

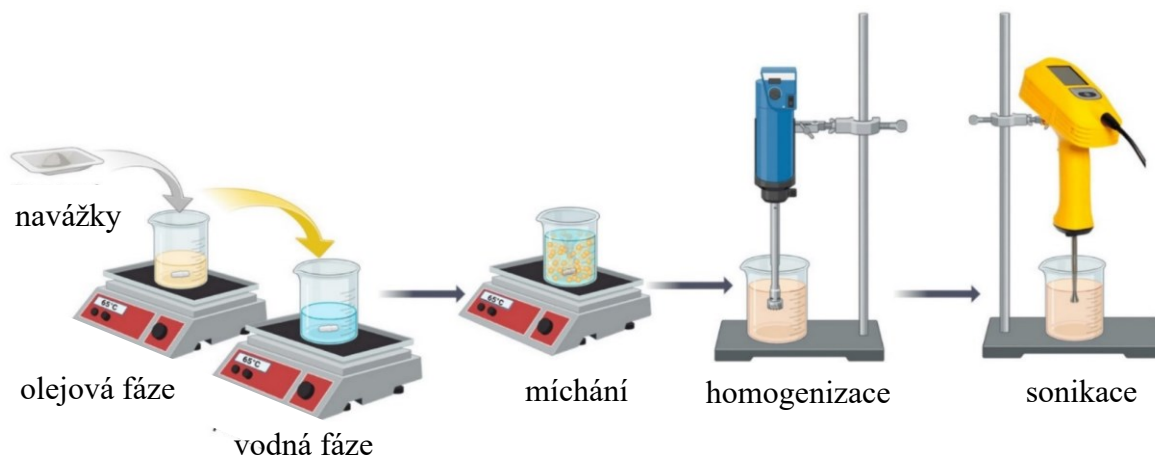
Nejprve byly na analytických vahách naváženy potřebné ingredience k výrobě NLC. Zvlášť byly zváženy složky olejové fáze: glyceryl behenát (140 mg), kyselina olejová (60 mg), esenciální olej (2-3 kapky), a zvlášť složky vodné fáze: Tween 80 (150 mg) a demineralizovaná voda (15 ml).

Tabulka 2 Složení formulací NLC. Zkratka NLC-RO odpovídá NLC s rozmarýnovým EO, NLC-HR s hřebíčkovým EO, NLC-TT s tea tree olejem, NLC-SK se skořicovým EO, NLC-SK 2 odpovídá NLC se skořicovým EO ve vyšší koncentraci, NLC-SK+RO odpovídá NLC s vyšší koncentrací skořicového a rozmarýnového EO

Vzorek	Glyceryl behenát [mg]	Kyselina olejová [mg]	Esenciální olej [mg]	Tween 80 [mg]
NLC-RO	142,5	63,0	48,7	149,4
NLC-HR	141,5	64,0	56,7	153,3
NLC-TT	140,5	66,7	60,2	149,7
NLC-SK	140,1	64,8	90,7	151,9
NLC-slepý	140,4	67,0	-	154,0
NLC-SK 2	139,4	62,6	160,3	150,1
NLC-SK + RO	143,5	72,3	70,4+72,9	149,6

(zdroj: vlastní)

Olejová fáze byla navážena do 50 ml úzké skleněné kádinky a byla umístěna do vodní lázně vytemperované na 70 °C. Vodný 1% roztok Tweenu 80 byl za stálého míchání zahřát na teplotu o něco vyšší než 70 °C a poté přilít k olejové fázi. Do kádinky s oběma fázemi bylo umístěno homogenizační zařízení Turax a směs byla ve vodní lázni homogenizována při 13 400 rpm po dobu 5 minut. Vzniklá emulze byla přelita do plastové uzavíratelné nádoby a sonikována ve studené vodní lázni 10 minut, při cyklování 80 % s amplitudou 90 %. Ve vodní lázni byla následně vyměněna voda za ledovou, do emulze bylo přidáno 15 ml vychlazené demineralizované vody (5 °C) a disperze byla sonikována ještě 1 minutu při stejném cyklování a amplitudě. Vzniklá disperze o celkovém objemu 30 ml byla v plastové nádobě uzavřena víčkem a skladována při pokojové teplotě.



Obrázek 6 Proces výroby NLC, upraveno podle [49]

7.3 Charakterizace NLC

Po přípravě NLC byla u všech šesti vzorků změřena velikost částic a jejich zeta potenciál. Měření bylo prováděno na přístroji Zetasizer Nano ZS 90. Pro měření velikosti částic bylo do klasické kyvety napipetováno 10 μl vzorku NLC suspenze a 1 ml demineralizované vody. Kyveta byla zavedena do přístroje, který velikost proměřil celkem třikrát u každého vzorku. V softwaru byly nastaveny následující parametry: materiál vzorku – glyceryl behenát, hodnota indexu lomu $RI = 1,47$, teplota $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Velikost částic NLC byla vyjádřena jako intenzitně vážený z-průměr velikosti NLC (z-průměr) v nanometrech.

Zeta potenciál částic byl změřen na stejném přístroji, jen s nastavením potřebným pro měření této veličiny. Do kádinky byl připraven roztok 20 μl suspenze NLC s 4 ml demineralizované vody, kterým byla (pomocí laboratorní stříkačky) naplněna speciální kyveta DTSI 060 pro měření zeta potenciálu. Přístroj provedl opět tři měření u každého vzorku.



Obrázek 7 Kyveta pro měření zeta potenciálu (zdroj: vlastní)

7.4 Stabilita NLC

Pro sledování stability NLC částic v čase byla změřena velikost NLC a zeta potenciál vzorků (NLC – RO, HR, TT a SK) celkem pětkrát v průběhu tří měsíců. Způsob měření velikosti a zeta potenciálu je popsán v kapitole 7.3. Ze získaných hodnot byly sestrojeny grafy, které poukazují na změny ve velikosti částic nebo zeta potenciálu disperzí během skladování při laboratorní teplotě. Vzorky byly rovněž hodnoceny vizuálně.

7.5 Mikrobiologické testy

Pro testování antimikrobních vlastností NLC s enkapsulovanými EO byly provedeny mikrobiologické testy, při kterých byla pozorována schopnost NLC bránit růstu bakterií. Pro test byly použity bakterie, které představují zástupce gram pozitivních a gram negativních patogenů.

Použité bakterie:

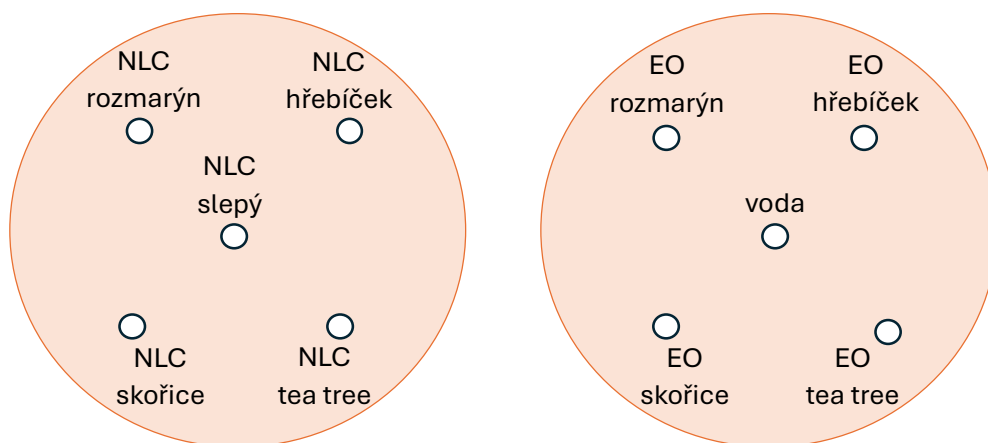
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Staphylococcus aureus* CCM 3953

7.5.1 Disková difúzní metoda

Tato metoda využívá tuhých médií, naočkovaných citlivým mikroorganismem. Na agarové plotny jsou umístěny disky filtračního papíru, nasyceny testovanou látkou. Tato látka se šíří

médiiem a způsobuje vznik inhibičních zón, velikost těchto zón závisí na koncentraci testované látky. Reakce mikroorganismu se projeví vznikem kruhové zóny, jejíž průměr odpovídá inhibičním vlastnostem testované látky [50].

Pro testování NLC-EO byl použit Mueller-Hintonův agar s gramnegativními (*Escherichia coli*) a grampozitivními (*Staphylococcus aureus*) rody bakterie. Nejdříve byly připraveny suspenze obou bakterií ve fyziologickém roztoku o koncentraci 0,5 MF (0,5 McFarlandův standard (MF) odpovídá přibližně koncentraci $1,5 \times 10^8$ bakterií na mililitr). Koncentrace roztoku byla změřena na přístroji Densi-La-Meter. Z takto koncentrovaných roztoků bakterií bylo odebráno 100 μ l a rovnoměrně rozprostřeno po celé misce s agarem. Na naočkované půdy bylo umístěno vždy 5 sterilních disků, pomocí automatické pipety byly disky napuštěny 12 μ l NLC-EO, slepým vzorkem NLC (bez enkapsulovaných EO), nebo čistými EO a vodou (kontrola). Celkově bylo připraveno 12 misek: 3 misky *Escherichia coli* s NLC vzorky, 3 misky *Escherichia coli* s EO, 3 misky *Staphylococcus aureus* s NLC vzorky, 3 misky *Staphylococcus aureus* s EO. Výsledky byly odečteny po 24 hodinách kultivace při 37 °C.



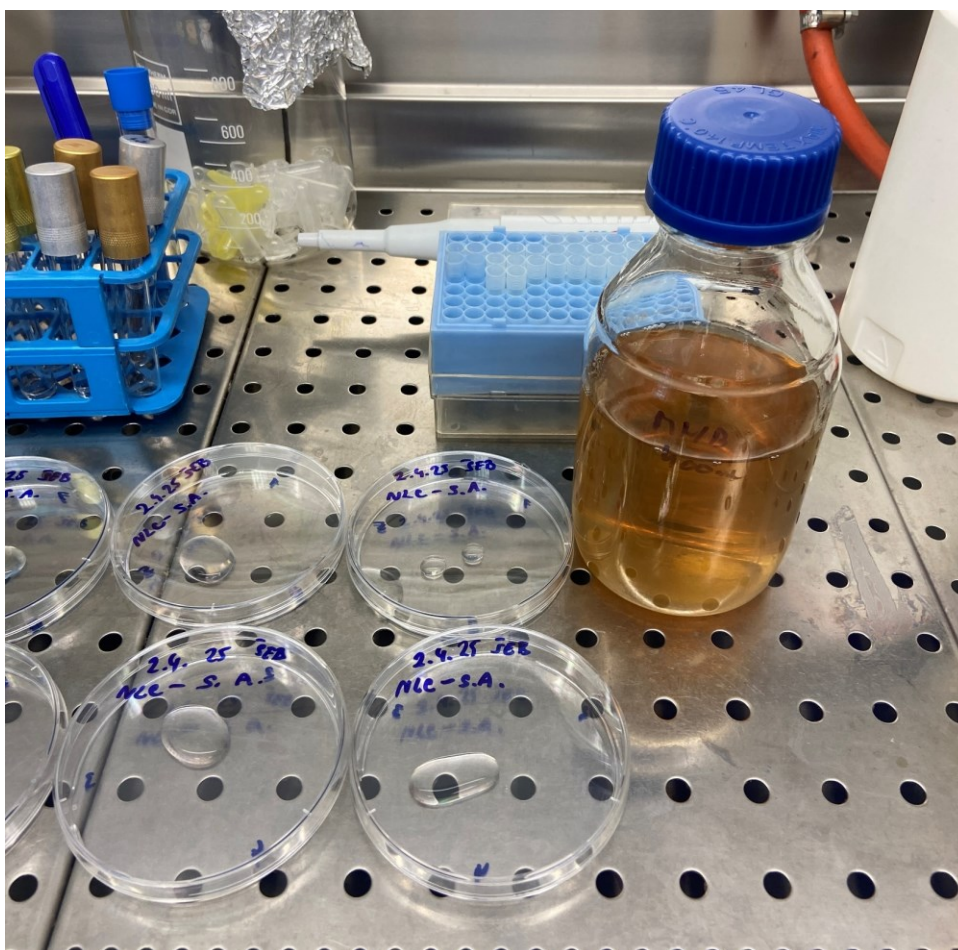
Obrázek 8 Rozmístění disků se vzorky na kultivační misce (zdroj: vlastní)

7.5.2 Jamková difúzní metoda

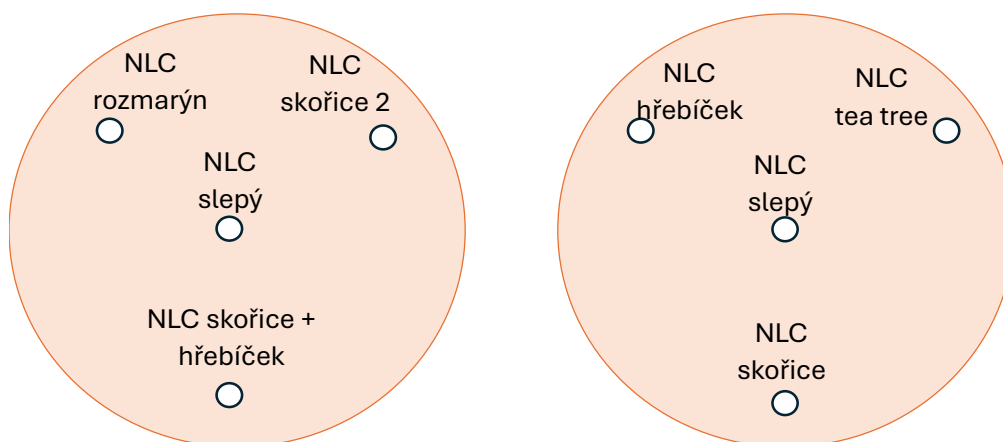
Metoda je založena na podobném principu jako diskový difúzní test, jedná se o difúzi aktivní látky do média a zabránění růstu mikroorganismů. Výhodou metody je, že umožňuje dávkování většího objemu aktivní složky. Jamky vytvořené v agaru mohou pojmout

až několik desítek μl suspenze. Tato metoda je však vhodná jen pro testování antibakteriálních vlastností kapalných látek.

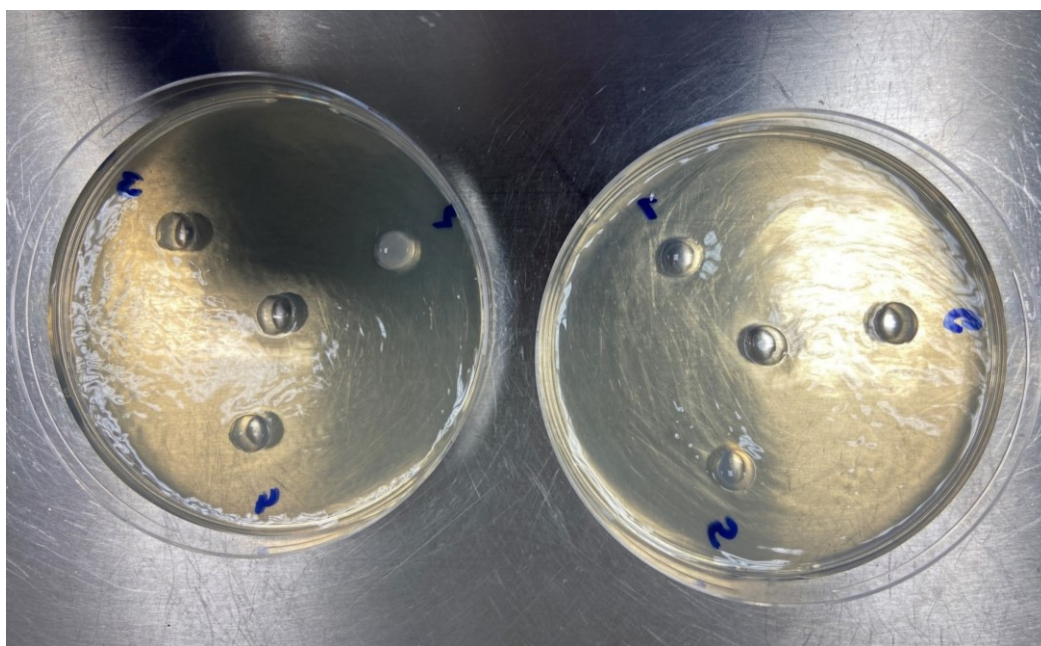
Antibakteriální účinnost NLC-EO byla testována rovněž pomocí jamkové difúzní metody. Test byl prováděn opět s bakteriemi rodu *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, ze kterých byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o koncentraci 0,5 MF. 1 ml bakteriální suspenze byl smíchán s potřebným množstvím kapalného Mueller-Hintonova agaru tak, aby výška agaru v kultivační misce byla cca 0,5 cm. Obsah kultivační misky se nechal ztuhnout a poté v něm byly pomocí duté plastové trubičky vytvořeny malé jamky, do kterých bylo následně napipetováno 50 μl NLC suspenze. V jamkovém testu byly použity vzorky NLC-RO, NLC-HR, NLC-TT, NLC-SK, NLC-SK 2, NLC-SK+HR, NLC-slepý. Takto připravené misky byly vloženy do termostatu, kde při 37 °C probíhala kultivace po dobu 24 hodin.



Obrázek 9 Kultivační misky s bakteriální suspenzí před nalitím Mueller-Hintonova agaru (zdroj: vlastní)



Obrázek 10 Rozmístění NLC na kultivační misce (zdroj: vlastní)



Obrázek 11 Kultivační misky s jamkami obsahujícími NLC suspenze (zdroj: vlastní)

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

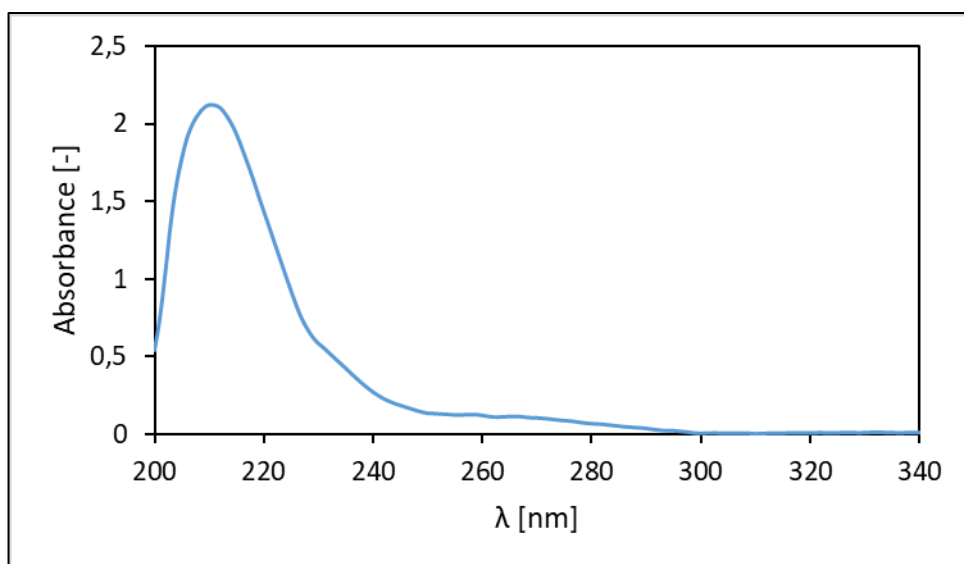
V této kapitole jsou shrnuty výsledky praktické části bakalářské práce a je přestavena jejich diskuse.

8.1 Charakterizace EO

8.1.1 Spektrofotometrické stanovení EO

Při měření roztoků EO na spektrofotometru v UV oblasti záření (200-400 nm) byly ze získaných hodnot sestrojeny grafy závislosti absorpce na vlnových délkách. U každého EO byla odečtena maximální absorpce ($\lambda_{\max}$), tedy vlnová délka, při které bylo záření pohlcováno nejvíce.

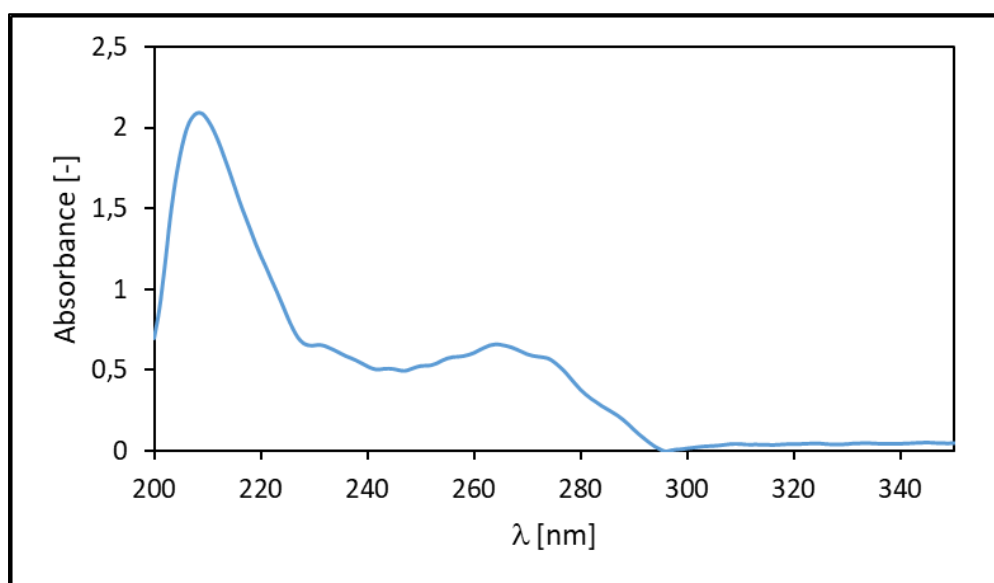
U rozmarýnového EO byla nejvyšší absorpce změřena při 210 nm, (obrázek 12). Tato hodnota naznačuje přítomnost jednoduchých nenasyčených sloučenin. Mezi typické sloučeniny obsažené v rozmarýnovém oleji, které mohou takto absorbovat, patří například monoterpeny jako α -pinen, β -pinen nebo limonen, jež obsahují konjugované dvojné vazby. Výsledná hodnota $\lambda_{\max}$ tedy dobře odpovídá očekávanému složení esenciálního oleje a potvrzuje přítomnost těchto chromoforů. Dále se ve spektru objevuje nižší, ale nezanedbatelná absorpce mezi 240 a 300 nm, což může být důkazem přítomnosti slabě konjugovaných aromatických sloučenin a určitých terpenoidů jako kafr nebo 1,8-cineol [51].



Obrázek 12 Absorpční spektrum rozmarýnového EO (zdroj: vlastní)

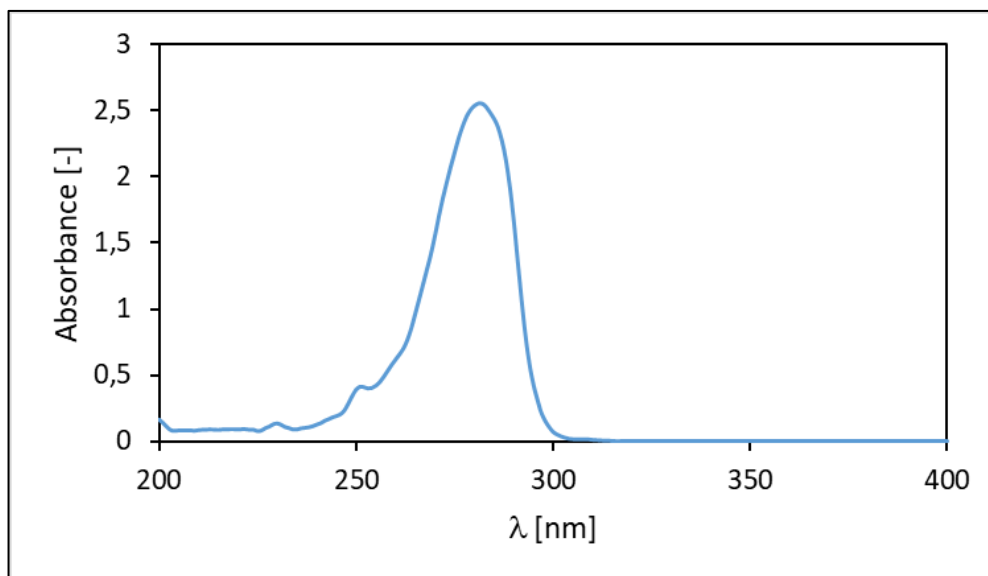
U tea tree oleje byla naměřena maximální absorpce při $\lambda = 208$ nm (Obrázek 13), což spadá do oblasti hlubokého UV stejně jako u rozmarýnového oleje, oba tyto EO obsahují

monoterpeny a jejich deriváty, proto mají velmi podobnou $\lambda_{\max}$. Dále se ve spektru nachází široké maximum v rozmezí λ od 240 do 300 nm, které svědčí o přítomnosti fenolických sloučenin. Absorbance při 265 nm se používá ve spektrofotometrických metodách ke kvantifikaci koncentrací tea tree oleje v různých formulacích [52]. Tea tree olej obsahuje převážně monoterpeny, jako je terpinen-4-ol, γ -terpinen nebo α -terpinen, které mají v molekule dvojně vazby schopné absorbovat v této oblasti vlnových délek. Nad 300 nm nebyly pozorovány žádné píky, což je v souladu s absencí konjugace v hlavních terpenoidních složkách EO [53].



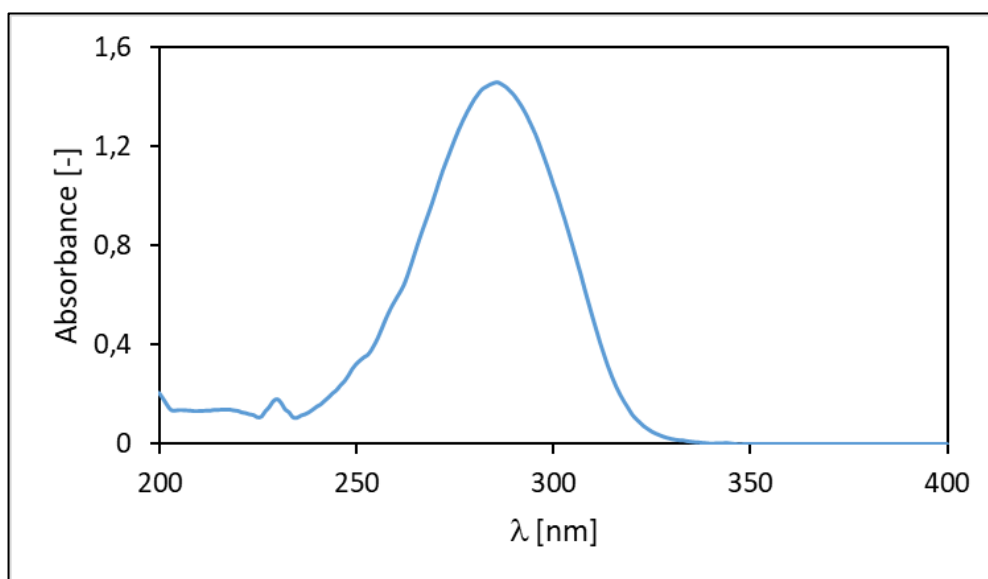
Obrázek 13 Absorpční spektrum tea tree EO (zdroj: vlastní)

Na Obrázku 14 můžeme pozorovat, že nejvyšší absorbance u hřebíčkového EO byla změřena při $\lambda = 281$ nm. Tato absorpční oblast je charakteristická pro aromatické sloučeniny, a je typická pro elektronové přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$, které probíhají v konjugovaných aromatických systémech. Hlavní aromatickou sloučeninou v tomto oleji je eugenol, naměřená hodnota tak dobře reflektuje přítomnost této dominantní složky v oleji [54].



Obrázek 14 Absorpční spektrum hřebíčkového EO (zdroj: vlastní)

Skořicový EO absorboval nejvíce UV záření při $\lambda = 286$ nm (Obrázek 15), což je blízká hodnota $\lambda_{\max}$ u hřebíčkového EO. Můžeme tedy usoudit, že skořicový olej bude také obsahovat aromatické sloučeniny. Hlavní účinnou složkou tohoto oleje je cinnamaldehyd, což je aromatický aldehyd s konjugovanou dvojnou vazbou. Jeho struktura umožňuje výraznou absorpci v UV oblasti blízko 280–300 nm. Naměřená hodnota $\lambda_{\max}$ tak odpovídá očekávané přítomnosti cinnamaldehydu a potvrzuje dominantní charakter této látky ve složení oleje [55].



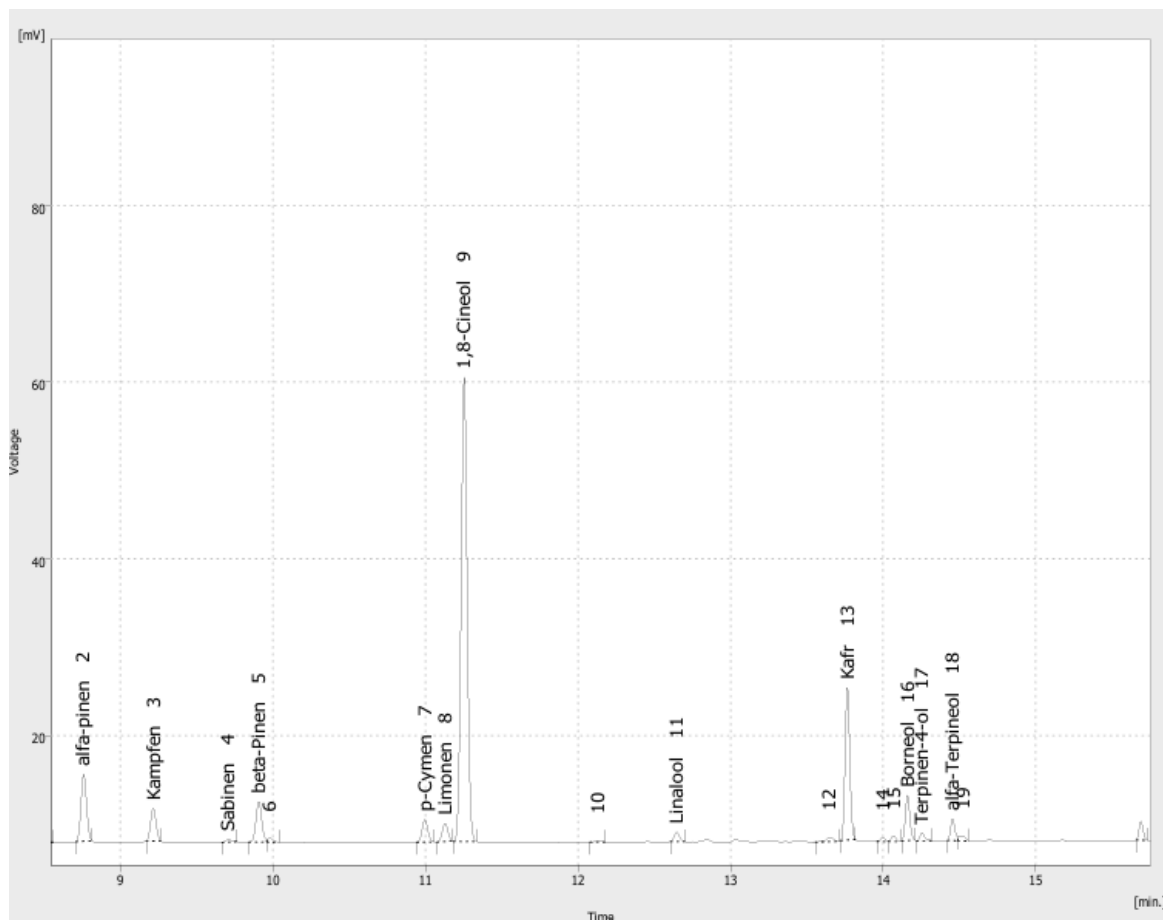
Obrázek 15 Absorpční spektrum skořicového EO (zdroj: vlastní)

Proměření EO v UV oblasti byly předběžně určeny hlavní složky, které absorbují záření ve studovaných vlnových délkách. Pro podrobnější identifikaci byla provedena analýza pomocí plynové chromatografie jejíž výsledky jsou sepsány v následující kapitole.

8.1.2 Složení EO metodou plynové chromatografie

Použité EO byly analyzovány pomocí plynové chromatografie. Výstupem analýzy byly chromatogramy, ze kterých byly odečteny retenční časy jednotlivých složek analyzovaných EO a porovnány s tabulkovými hodnotami retenčních časů standardů známých, běžně se vyskytujících látek v EO. Jednotlivé píky, jejich plocha (výška) poukazují na množství dané látky ve vzorku EO a lze tedy určit její procentuální zastoupení, které je uvedeno v Tabulkách 3–6. Složení EO bylo porovnáno s běžně se vyskytujícím obsahem aktivních látek uvedených v literatuře [56; 57].

Rozmarýnový EO od firmy Nobilis Tilia obsahoval nejvíce 1,8-cineolu, hojně zastoupeny byly také α - a β -pinen nebo kafr (Obrázek 16). Tyto látky jsou hlavními aktivními složkami běžně se vyskytující v rozmarýnovém EO a dodávají mu specifické účinky a vlastnosti. Další látky obsažené v tomto oleji jsou uvedeny v Tabulce 3.



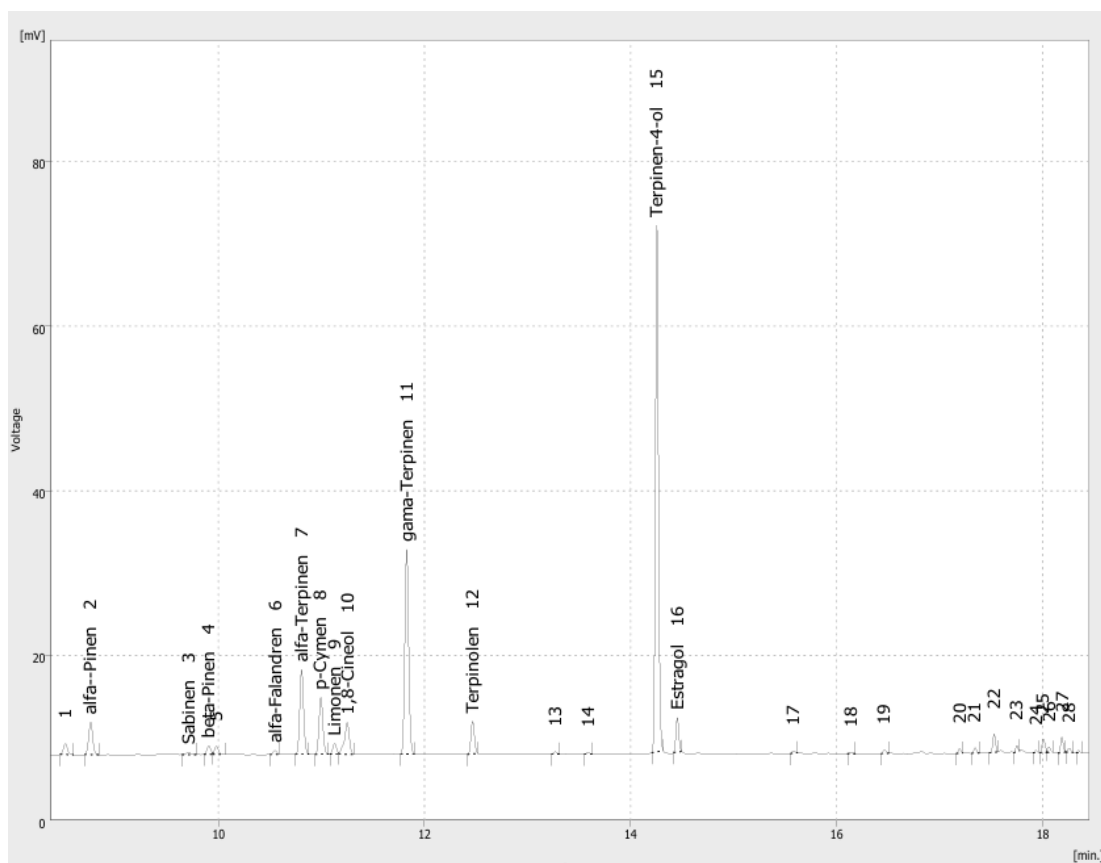
Obrázek 16 Složení rozmarýnového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)

Tabulka 3 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v rozmarýnovém EO, identifikovaných pomocí dostupných standardů

Pík č.	Retenční čas [min]	Zastoupení [%]	Složka
2	8,8	6,9	α -Pinen
3	9,2	3,3	Kampfen
4	9,7	0,2	Sabinen
5	9,9	4,4	β -Pinen
6	10,0	0,4	-
7	11,0	2,3	p-Cymen
8	11,1	1,9	Limonen
9	11,3	52,0	1,8-Cineol
11	12,6	0,9	Linalool
13	13,8	13,3	Kafr
16	14,2	3,7	Borneol
17	14,3	0,7	Terpinen-4-ol
18	14,5	1,7	α -Terpineol
20	15,7	1,4	Bornyl-acetát

(zdroj: vlastní)

V tea tree oleji od firmy Salus byla, vedle určených složek, zjištěna přítomnost běžně se vyskytujícího terpinen-4-olu, γ -terpinenu, α -terpinenu. Dále olej obsahoval α -pinen, cineol a p-cymen. Tyto látky jsou důležité pro antimikrobiální a antiseptické účinky oleje. Další minoritní složky tee tree oleje jsou uvedeny v Tabulce 4 i s jejich procentuálním zastoupením.



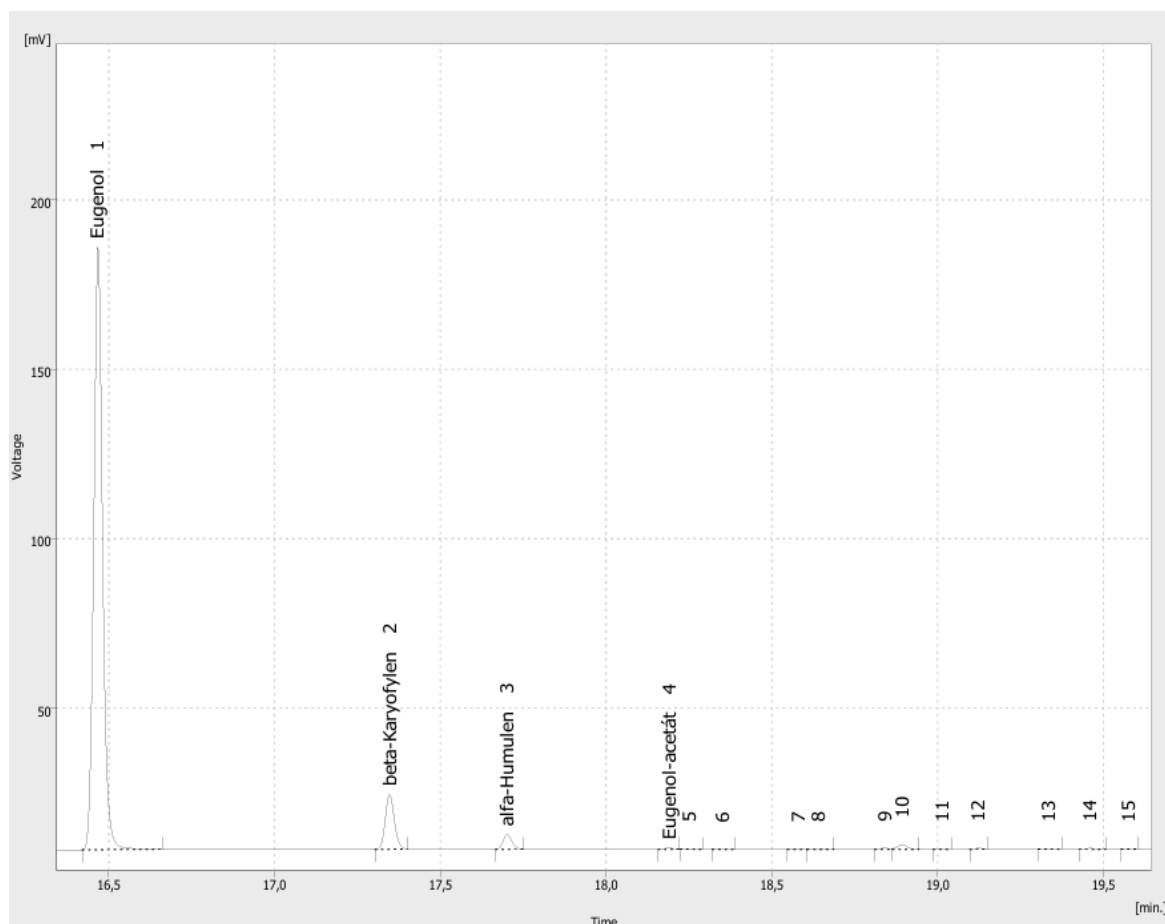
Obrázek 17 Složení tea tree EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)

Tabulka 4 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v tea tree EO identifikovaných pomocí dostupných standardů

Pík č.	Retenční čas [min]	Zastoupení [%]	Složka
1	8,5	1,1	-
2	8,8	3,4	α -Pinen
3	9,7	0,3	Sabinen
4	9,9	0,8	β -Pinen
5	10,0	0,8	-
6	10,6	0,4	α -Falandren
7	10,8	8,5	α -Terpinen
8	11,0	5,7	p-Cymen
9	11,1	1,0	Limonen
10	11,3	4,1	1,8-Cineol
11	11,8	20,5	γ -Terpinen
12	12,5	3,0	Terpinolen
13	13,3	0,2	-
14	13,6	0,1	-
15	14,3	41,5	Terpinen-4-ol
16	14,5	2,6	Estragol

(zdroj: vlastní)

Dalším analyzovaným EO byl hřebíčkový olej (Salus), který obsahoval nejvíce eugenolu, β -karyofylenu, α -humulenu a eugenol-acetátu. Vzhledem k tomu, že k detekci analytů byl použit FID detektor, nebyly další přítomné látky identifikovány, jelikož jejich retenční časy neodpovídaly žádnému času dostupných standardů. Množství těchto látek je však zanedbatelné, což je patrné i z Obrázku 18. Podle literárních zdrojů [58] by množství eugenolu mělo činit 70–90 %, karyofylenu ~10 % a eugenol-acetátu do 10 %. Obsahy jednotlivých složek hřebíčkového oleje, uvedené v Tabulce 5, jsou v souladu s běžně očekávanými procentuálními podíly pro tento typ oleje.



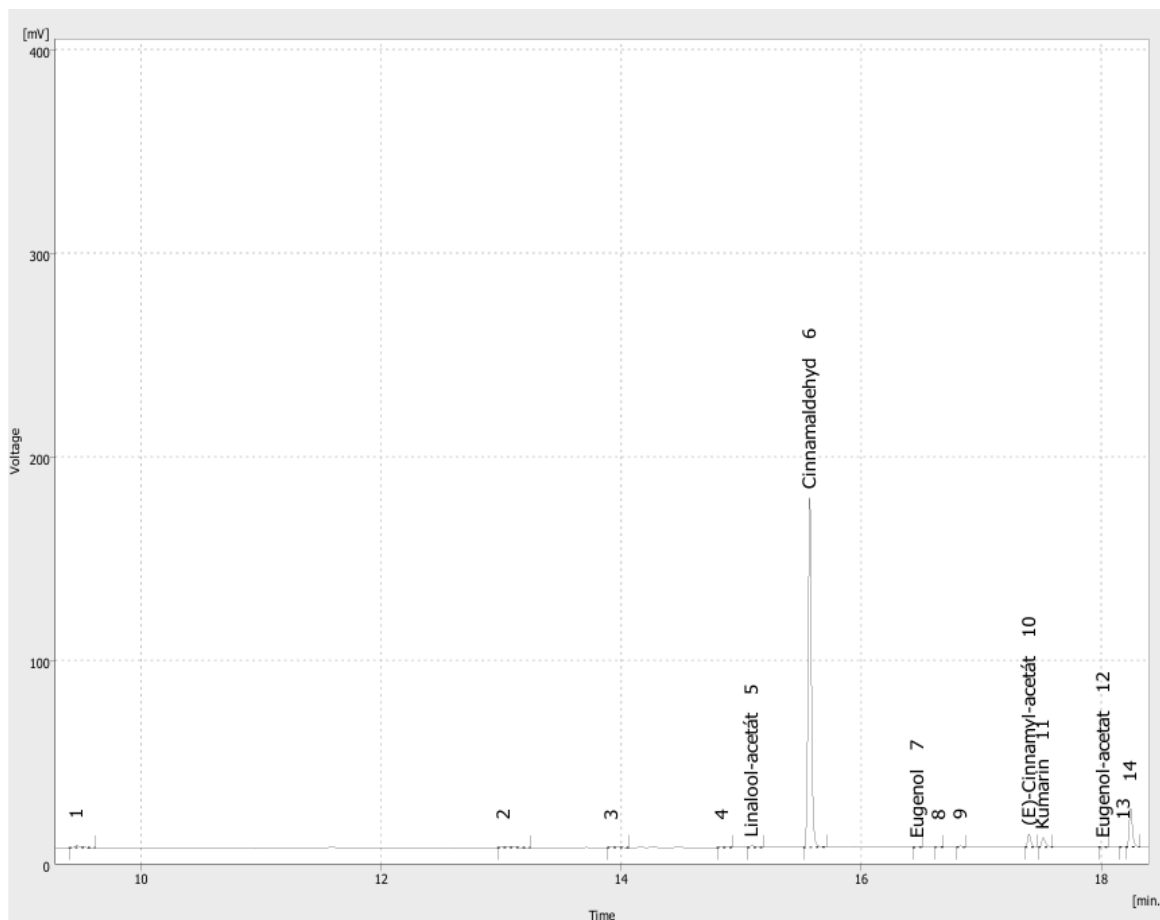
Obrázek 18 Složení hřebíčkového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)

Tabulka 5 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v hřebíčkovém EO

Pík č.	Retenční čas [min]	Zastoupení [%]	Složka
1	16,5	87,8	Eugenol
2	17,3	8,2	β -Karyofylen
3	17,7	2,1	α -Humulen
4	18,2	0,2	Eugenol-acetát

(zdroj: vlastní)

Na Obrázku 19 můžeme pozorovat, že skořicový olej (firma Salus) obsahoval velké množství cinnamaldehydu. Jedná se o látku známou svými antibakteriálními a antiseptickými účinky, jejíž množství většinou přesahuje 60 %, což potvrzuje i naše analýza tohoto EO [59]. Dalšími přítomnými, hojně zastoupenými aktivními složkami byl cinnamyl-acetát, eugenol a linalool-acetát, jejich množství je také v souladu s běžným procentuálním zastoupením ve skořicových EO (Tabulka 6).



Obrázek 19 Složení skořicového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)

Tabulka 6 Zastoupení jednotlivých látek obsažených ve skořicovém EO

Pík č.	Retenční čas [min]	Zastoupení [%]	Složka
5	15,1	0,5	Linalool-acetát
6	15,6	82,2	Cinnamaldehyd
7	16,5	0,1	Eugenol
8	16,6	0,2	-
9	16,8	0,3	-
10	17,4	3,0	(E)-Cinnamyl-acetát
11	17,5	2,5	Kumarin
12	18,0	0,2	Eugenol-acetát
14	18,2	8,8	-

(zdroj: vlastní)

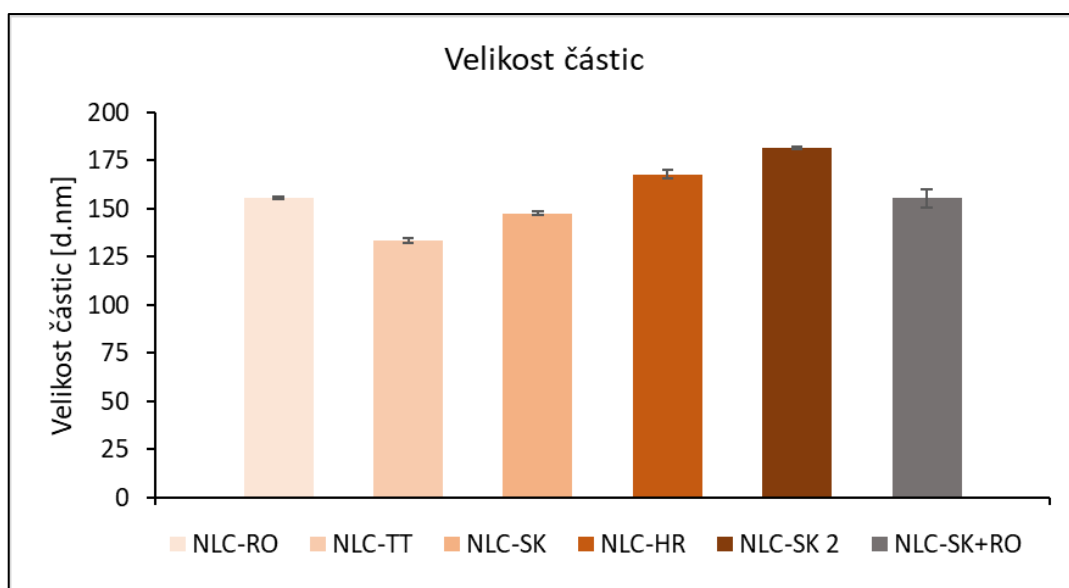
Složení esenciálních olejů je závislé na druhu rostliny, době sklízňe a enviromentálních podmínkách, proto se oleje od různých výrobců mohou dosti lišit, avšak musí splňovat určité doporučení a normy, jelikož se jedná o velmi koncentrované látky. EO použité v bakalářské práci mají poměrně standardní zastoupení jednotlivých složek, tedy obsahují běžná množství obvykle vyskytujících se látek.

8.2 Charakterizace NLC

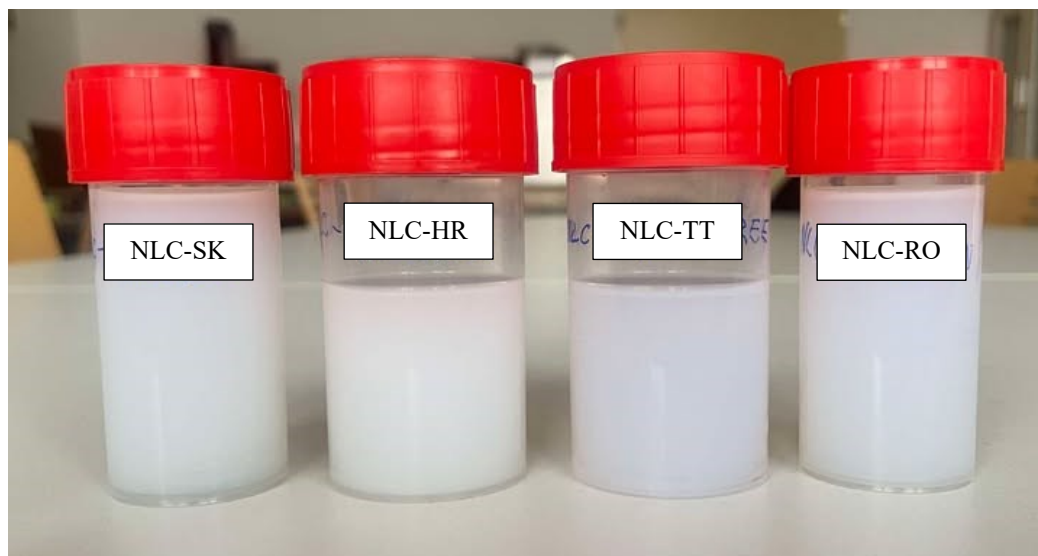
8.2.1 Velikost a distribuce částic

Ihned po přípravě NLC suspenzí byla změřena velikost jejich částic a zeta potenciál (ZP). Tyto veličiny dobře charakterizují jednotlivé suspenze a měření v určitých časových intervalech napomáhají určit jejich stabilitu.

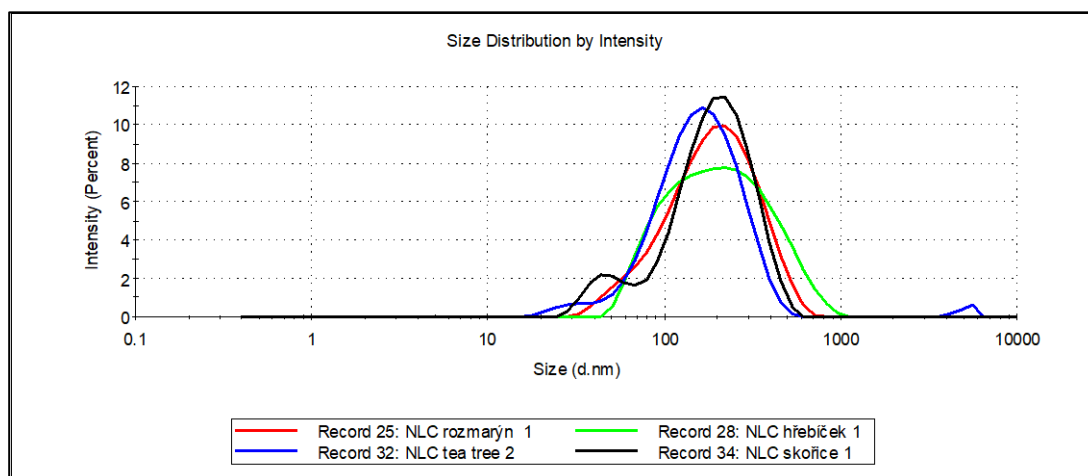
Velikost částic NLC by se měla, dle literatury, pohybovat v rozmezí od 10 do 1000 nm, v závislosti na jejich složení a způsobu přípravy [16]. Obrázek 20 ilustruje, že velikost námi připravených NLC s EO se pohybovala od 125 do 190 nm, což je v souladu s velikostmi, které uvádí literatura. Největší velikost částic byla stanovena u vzorku NLC-SK 2, který obsahoval 160 mg skořicového EO, tedy téměř dvojnásobné množství EO v porovnání se základní formulací. Právě tato skutečnost mohla vést k vyšší velikosti částic, která činila $181,5 \pm 0,9$ nm. Pro NLC s hřebíčkovým olejem byly pak stanoveny velikosti částic 168 ± 2 nm. Formulace NLC s kombinací skořicového a rozmarýnového EO obsahovaly částice o podobné velikosti (155 ± 5 nm) jako NLC se samotným rozmarýnovým EO ($155,6 \pm 0,5$ nm). U vzorku NLC-SK byla naměřena velikost $147,6 \pm 0,8$ nm a nejmenší částice s velikostí 133 ± 2 nm obsahovala suspenze NLC-TT. Nejmenší velikost částic byla v disperzích indikována také vizuálně. Disperze NLC-TT byla transparentnější než ostatní připravené vzorky, o čemž svědčí rozdíly pozorované na Obrázku 21.



Obrázek 20 Velikost částic NLC-EO stanovená ihned po přípravě (zdroj: vlastní)



Obrázek 21 Vzhled suspenze NLC-EO (zdroj: vlastní)

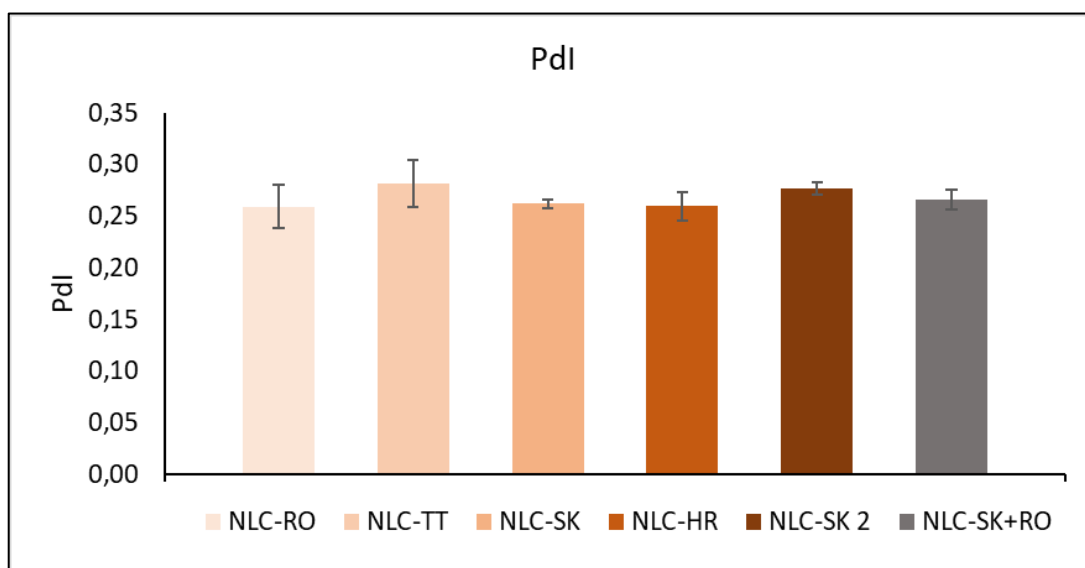


Obrázek 22 Distribuce velikosti částic studovaných vzorků. NLC-RO (červená), NLC-TT (modrá), NLC-HR (zelená), NLC-SK (černá) (zdroj: vlastní)

Na Obrázku 22 jsou znázorněny distribuční křivky velikostí částic po výrobě NLC suspenzí se základní recepturou. Široké distribuce mohou indikovat nestabilní suspenze inklinující k agregaci nebo usazování, a proto se sonikací snažíme dosáhnout zúžení distribuce velikostí částic. Na obrázku lze pozorovat, že velikosti částic leží převážně v intervalu cca od 30 do 600 nm a distribuční křivky jednotlivých vzorků NLC se liší jen málo. Vzorek NLC-RO má o něco užší distribuci než ostatní NLC, což může indikovat rovnoměrnější rozdělení částic. U vzorků NLC-SK a NLC-TT lze kromě hlavního píku pozorovat i menší vedlejší píky, jejich přítomnost může být způsobena frakcemi s jinou velikostí, odlišnou od průměrné

velikosti (dvě populace částic nebo přítomnost menších částic). Současně je patrné, že distribuční křivka NLC-TT je posunuta do oblasti menších velikostí, což odpovídá již dříve uvedeným pozorováním o nejmenší velikosti částic v tomto vzorku. Vzorek NLC-HR vykazuje o něco širší distribuci a z Obrázku 22 (zelená křivka) je patrná přítomnost částic s velikostí blízkých 1 μm . Distribuce všech NLC-EO suspenzí jsou v souladu s běžnými hodnotami, které jsou uváděny v literatuře [14].

Veličinou, která popisuje šířku distribuce velikostí částic je index polydisperzity (PDI) uvedený pro studované vzorky na Obrázku 22. Je to bezrozměrná veličina stanovená pomocí dynamického rozptylu světla, jejíž hodnoty leží v intervalu 0 až 1. Čím bližší k nule je hodnota PDI, tím je distribuce velikostí částic užší. Od hodnoty vyšší než 0,4 se jedná o vysoce polydisperzní systémy, které mohou být méně stabilní [60]. Největší hodnota PDI byla naměřena u vzorku NLC-TT ($0,28 \pm 0,03$), což může být způsobeno přítomností frakce s větší velikostí částic $\sim 4 \mu\text{m}$ (modrá křivka – Obrázek 22). Lze však konstatovat, že PDI všech vzorků NLC leží v oblasti „střední polydisperzity“, tedy mezi hodnotami 0,1 – 0,4.

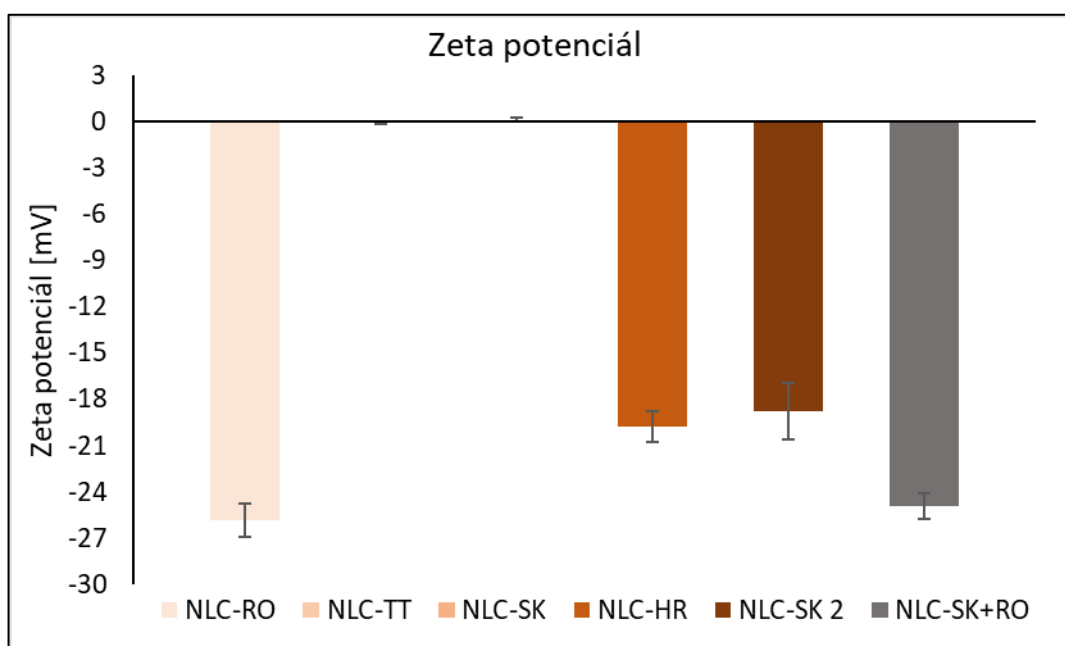


Obrázek 23 Indexy polydisperzity NLC-EO (zdroj: vlastní)

8.2.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál je jedním z ukazatelů stability disperzních systémů. Nejběžnější metodou stanovení této veličiny je elektroforetický rozptyl světla (ELS – Electrophoretic Light Scattering), který měří rychlost částic pohybujících se v elektrickém poli – elektroforetickou mobilitu. Ta je následně převedena na zeta potenciál pomocí Smoluchowského rovnice

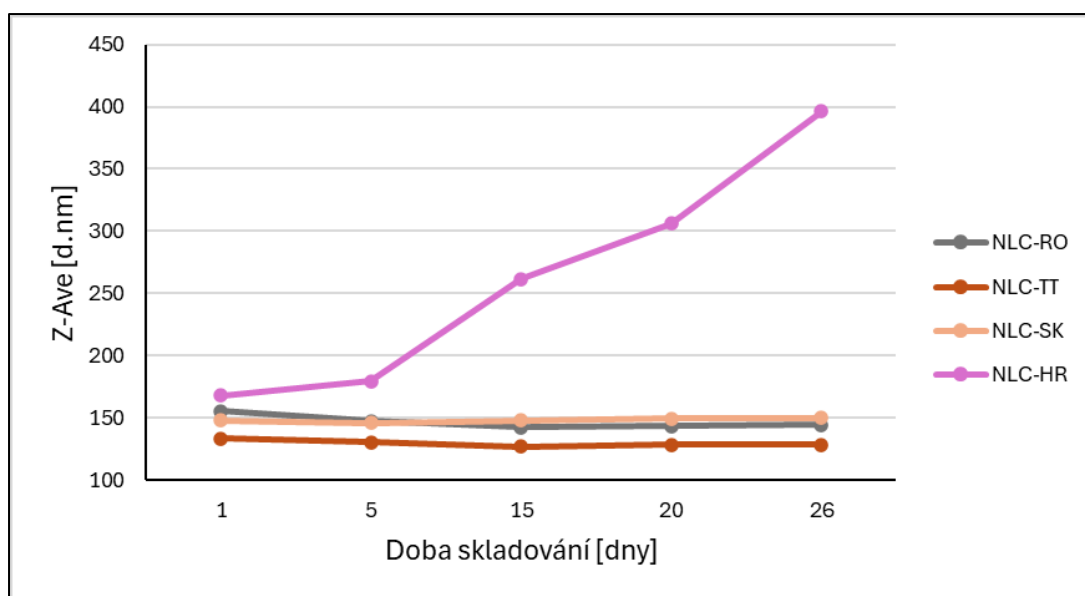
(pro vodné roztoky se střední až vyšší iontovou silou) nebo pomocí dalších modelů, např. Henryho rovnice. Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce, hodnoty ZP vyšší než ± 30 mV ukazují na dobrou stabilitu disperzního systému. Samotná stabilita je ovlivněna několika faktory, např. způsobem skladování, použitým tenzidem při výrobě a charakterem lipidové části NLC částic. Na Obrázku 23 je sloupcový graf znázorňující hodnoty zeta potenciálu NLC-EO částic stanovené po přípravě vzorků. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u NLC-RO ($-25,8 \pm 1,1$ mV), a NLC-SK+RO (-25 ± 1 mV), částice těchto suspenzí mají tedy dobrý předpoklad koloidní stability, jelikož se odpuzují a netvoří tak snadno agregáty. Nejnižší ZP byl naměřen u vzorků NLC-TT a NLC-SK. Hodnoty byly velmi blízké nule což indikuje nestabilní suspenze, protože při takto nízkém ZP snadněji dochází k agregaci. V tomto případě, však mohla být nízká hodnota ZP způsobena neustáleným stavem částic po jejich výrobě, kdy v první hodinách může docházet ke strukturní reorganizaci lipidů [61], přeskupování tenzidů nebo k narušení rovnováhy díky přítomnosti EO, které ještě nebyly dostatečně zabudovány do lipidové částice [62; 63].



Obrázek 24 Zeta potenciál NLC-EO částic stanovený ihned po přípravě (zdroj: vlastní)

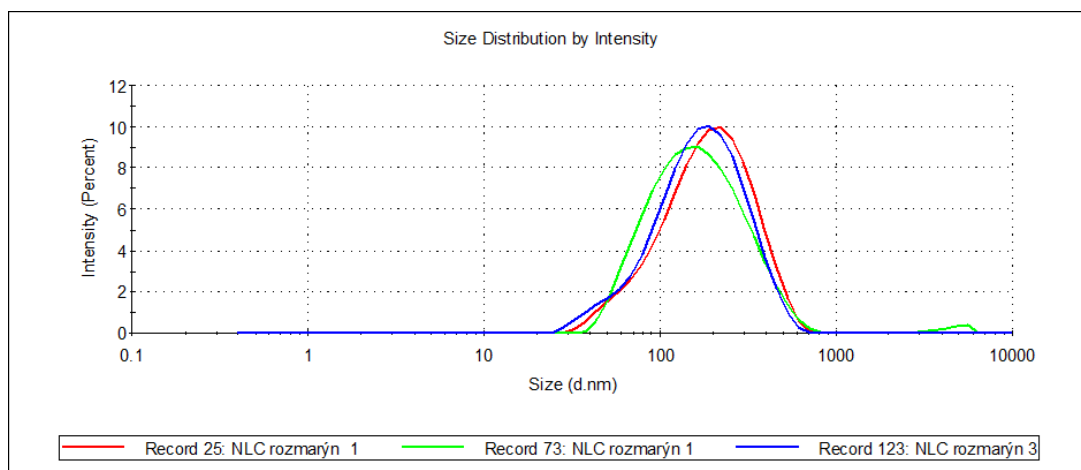
8.3 Stabilita NLC

Stabilita vzorků NLC-RO, NLC-TT, NLC-SK a NLC-HR byla studována měřením velikosti částic a ZP v pravidelných časových intervalech v průběhu jednoho měsíce. Vzorky byly skladovány při běžné laboratorní teplotě mimo přímé sluneční záření. Průběh změn velikosti částic během skladování je uveden na Obrázku 25. U NLC-RO, TT a SK pozorujeme, že velikost částic se po dobu jednoho měsíce výrazně nemění, velikost částic se pohybuje v rozmezí 130-150 nm, naměřené hodnoty kolísají jen minimálně, což značí dobrou stabilitu těchto suspenzí. S touto skutečností souhlasí také Obrázky 26, 27 a 28, na kterých jsou znázorněny distribuční křivky jednotlivých NLC-EO suspenzí v průběhu jednoho měsíce.

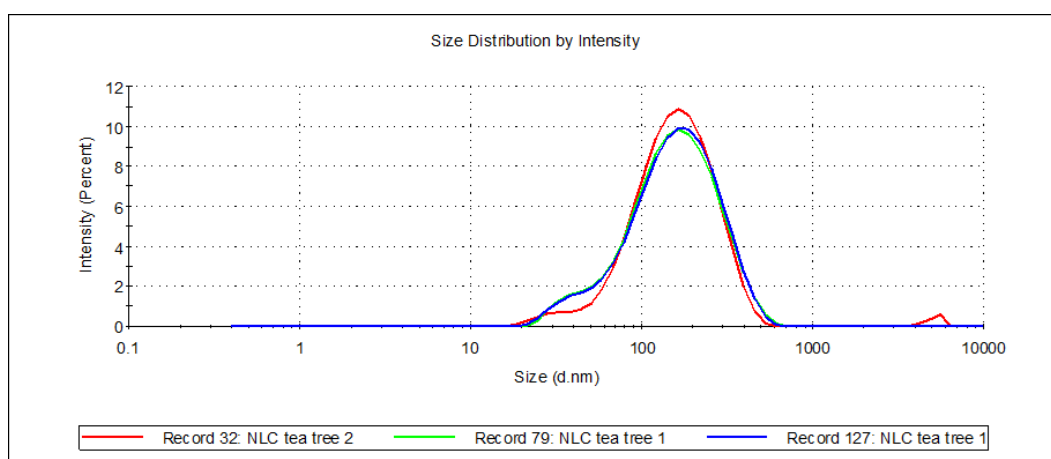


Obrázek 25 Velikost částic NLC-EO po dobu 1 měsíce (zdroj: vlastní)

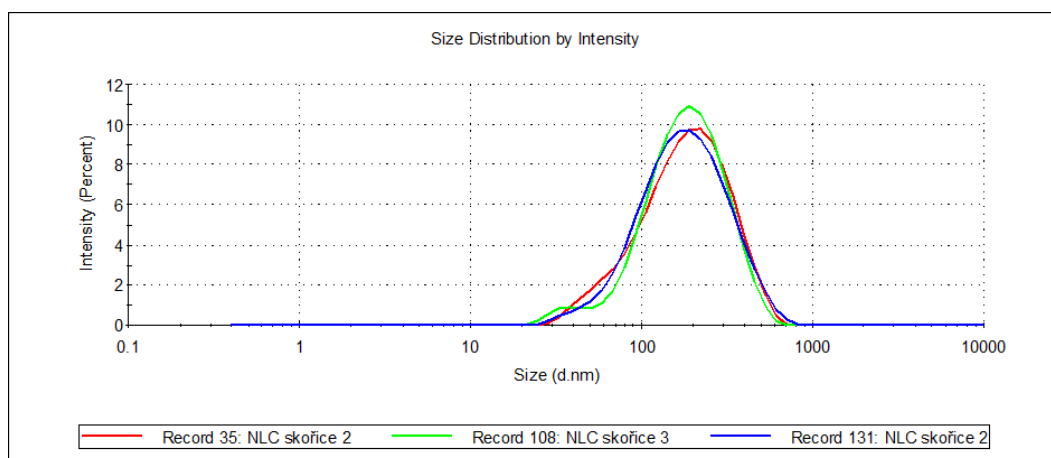
Na Obrázku 26 jsou distribuční křivky NLC-RO, které vykazují mírné posuny v pozici maxima a tvaru, ale systém je stále relativně stabilní. NLC-TT distribuční křivky (Obrázek 27) jsou téměř shodné, mají úzký a identický profil, můžeme tedy usoudit, že nedošlo k žádným zásadním změnám velikosti částic. Červená křivka na tomto obrázku popisuje distribuci velikosti částic v prvním týdnu, můžeme si všimnout malého píku s většími částicemi, který se již v dalších týdnech neobjevuje, což napovídá ustálení velikostí částic. Nejméně změn bylo také zaznamenáno u NLC-SK (Obrázek 28), to značí velmi dobrou fyzikální stabilitu tohoto NLC systému.



Obrázek 26 Distribuce velikosti částic NLC-RO stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)

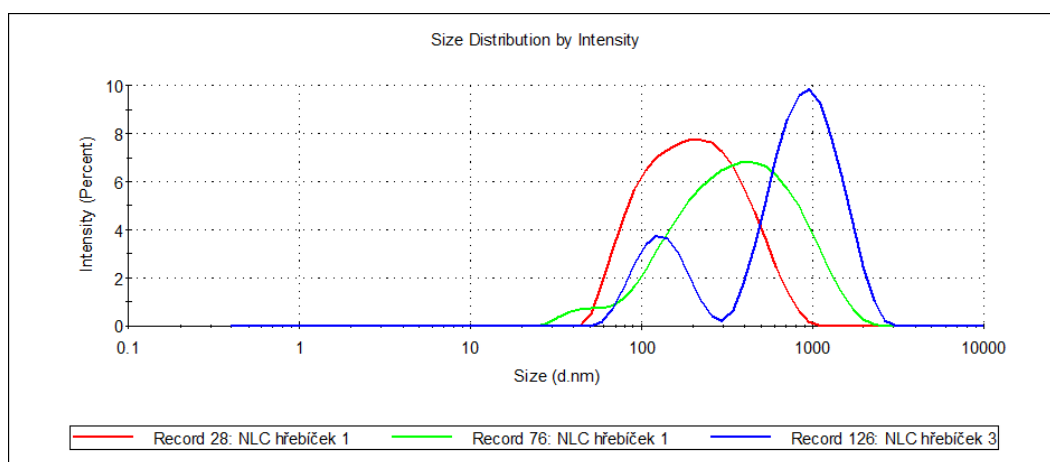


Obrázek 27 Distribuce velikosti částic NLC-TT stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)



Obrázek 28 Distribuce velikosti částic NLC-SK stanovená po 1 dni (červená), 20 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)

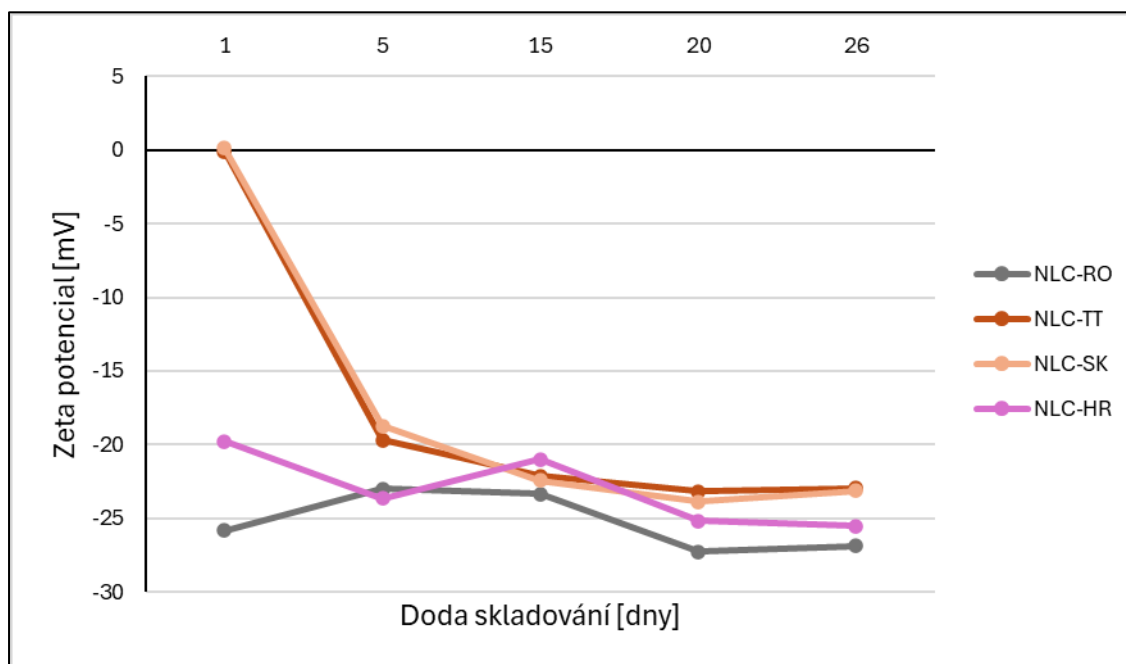
Na Obrázku 25 pozorujeme, že velikost částic NLC-HR (fialová křivka) postupně narůstá ze 168 nm až k hodnotám ~397 nm. Takto stoupající trend může indikovat agregaci částic nebo nestabilitu systému, která může vzniknout z různých důvodů. Mohlo se jednat o přítomnost nečistot ve vzorku, například zbytků emulgátoru, prachových částic či stopových množství jiných cizích látek zanesených do suspenze při manipulaci. Dále mohlo jít o nevhodnou interakci hřebíčkového oleje s lipidovou maticí, další možnou příčinou je přirozený proces rekrystalizace lipidové matrice během skladování, který může změnit vnitřní uspořádání částic a vést k růstu jejich hydrodynamického průměru [64]. Obrázek 29 znázorňuje distribuci velikosti částic NLC-HR; křivky se postupně posouvají doprava, což poukazuje na zvětšování průměrné velikosti částic během skladování. Analýza provedená 26. den po přípravě (modrá křivka) ukazuje, že došlo k rozdělení vzorku na dvě frakce (bimodální distribuce) s rozdílnou velikostí částic, z nichž větší frakce má velikost sahající nad 1000 nm. Tato velikost je považována za hraniční rozměry NLC částic a ukazuje na přítomnost vzniklých agregátů.



Obrázek 29 Distribuce velikosti částic NLC-HR stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech po (modrá) (zdroj: vlastní)

Podle zvyšující se velikosti částic NLC-HR by bylo možné usuzovat, že ZP této suspenze se bude postupně přibližovat k hodnotě 0 mV, což by značilo nestabilitu částic a jejich tendenci k agregaci. Na Obrázku 30 však můžeme pozorovat fialovou křivku, která ukazuje, že ZP se během skladování výrazně nezměnil a jeho hodnoty zůstaly v rozmezí od -20 do -25 mV. K izoelektrickému bodu, který by mohl indikovat agregaci částic, se tedy nepřiblížily. Tato skutečnost však nemusí vyvracet nestabilitu suspenze, podobné příklady

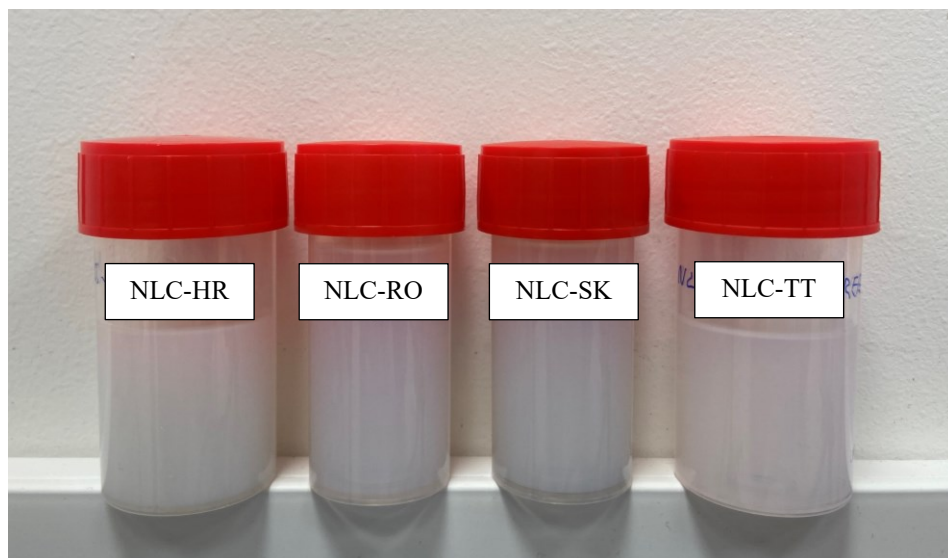
byly popsány i v literatuře, kde byly naměřeny zvyšující se velikosti částic, i přes stálý zeta potenciál NLC částic [65; 66].



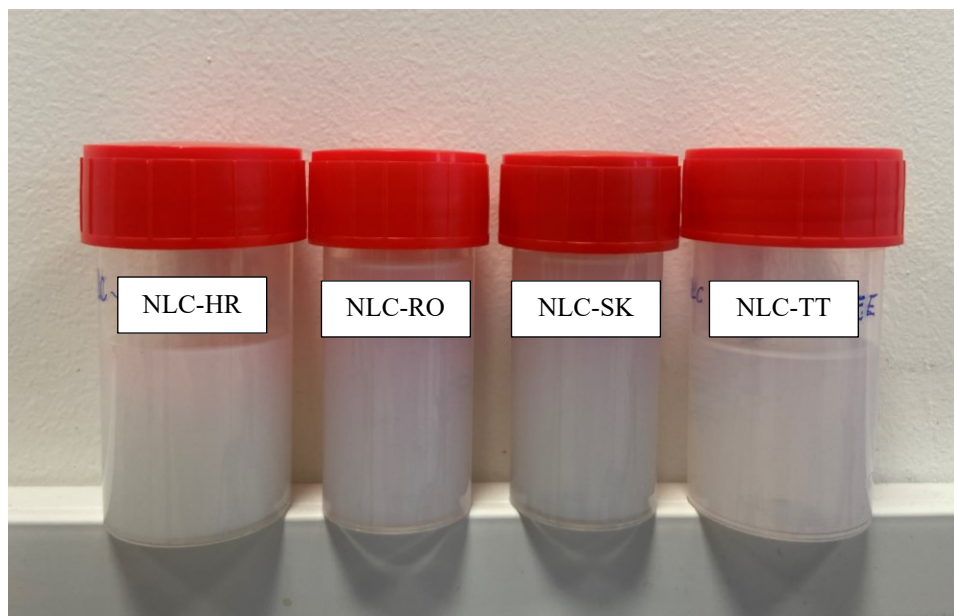
Obrázek 30 Zeta potenciál NLC-EO po dobu 1 měsíce (zdroj: vlastní)

Na Obrázku 30 můžeme dále pozorovat zeta potenciál částic NLC-RO (šedá křivka), který byl až na menší změny poměrně stabilní a ke konci časového období sledování stability se hodnoty ZP pohybovaly okolo -27 mV. Červená křivka znázorňující zeta potenciál NLC-TT částic má podobný trend jako NLC-SK (oranžová křivka), u částic v těchto suspenzích byly nejprve naměřeny hodnoty ZP blízké nule, ale po pěti dnech došlo k jeho poklesu a následnému ustálení. V posledním týdnu měření byly zaznamenány hodnoty -23 mV, označující stabilní suspenze. Jak již bylo uvedeno výše, tento pokles mohl být způsoben neustáleným stavem částic po jejich výrobě, kdy v první hodinách může docházet ke strukturní reorganizaci lipidů či přeskupování tenzidů stabilizující částice.

Připravené suspenze byly hodnoceny také vizuálně, což je dokumentováno na Obrázku 31 a 32. U vzorků NLC-RO, -SK, -TT nebyly během skladování zaznamenány žádné výrazné změny v jejich vzhledu. Není viditelná změna barvy ani vznik zákalu. Na pořízených fotografiích není zřejmá ani změna vizuálních vlastností u vzorku NLC-HR, přesto, že v průběhu skladování došlo k růstu velikosti částic.

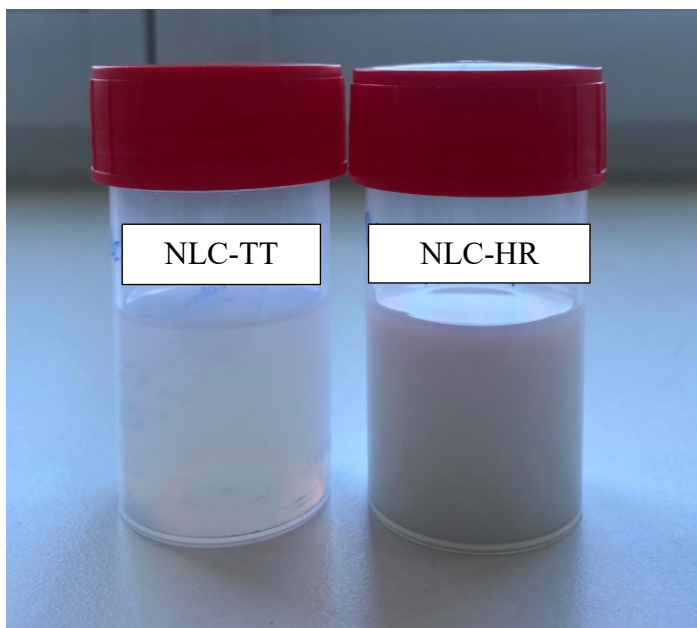


Obrázek 31 Vzhled NLC-EO po prvním týdnu skladování (zdroj: vlastní)



Obrázek 32 Vzhled NLC-EO po třetím týdnu skladování (zdroj: vlastní)

Obrázek 33 porovnává vzhled NLC-TT se vzorkem NLC-HR, u kterého byly DLS naměřeny rostoucí hodnoty velikosti částic. Lze tedy potvrdit agregaci a nestabilitu suspenze NLC-HR, která je výrazně více zakalená v porovnání s NLC-TT.



Obrázek 33 Porovnání vzhledu NLC-TT a NLC-HR po měsíci skladování (zdroj: vlastní)

8.4 Mikrobiologické testy

8.4.1 Disková difúzní metoda

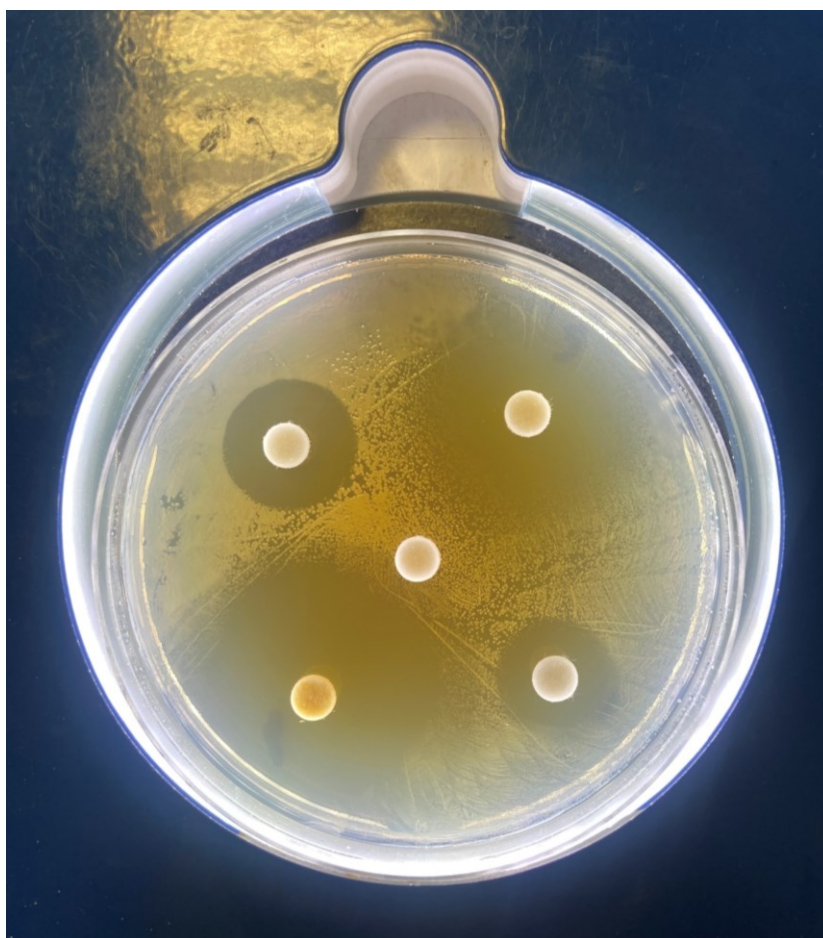
Po 24hodinové kultivaci připravených kultivačních misek a bakteriemi byly pomocí pravítka odečteny velikosti vytvořených inhibičních zón a výsledky zaznamenány do tabulek uvedených níže.

V Tabulce 7 jsou zapsány inhibiční zóny vytvořené u vybraných vzorků EO (rozmarýnový, hřebíčkový, tea tree a skořicový) testovaných na rodu bakterií *Escherichia coli*. (*E. coli*) Všechny použité esenciální oleje vykazují antibakteriální aktivitu, protože okolo všech disků byla vytvořena inhibiční zóna (Obrázek 34). *E. coli* byla nejvíce citlivá na skořicový EO, nejméně pak na tea tree a hřebíčkový olej. U všech misek byl jako negativní kontrola použit disk napuštěný vodou (umístěný uprostřed misky), kolem kterého se žádná inhibiční zóna nevytvořila.

Tabulka 7 Inhibiční zóny u *E. coli* při použití EO

E. coli	inhibiční zóny [cm]				
	EO-rozmarýn	EO-hřebíček	EO-tea tree	EO-skořice	kontrola
1	2,0	1,6	1,7	3,3	0
2	1,9	1,8	1,6	3,1	0
3	1,8	1,5	1,6	3,0	0
průměr ± SD	1,90 ± 0,10	1,63 ± 0,16	1,633 ± 0,058	3,13 ± 0,16	0,00

(Zdroj: vlastní)

Obrázek 34 Inhibiční zóny u rodu *E. coli* při použití EO, vlevo nahoře disk s EO-HR, vlevo dole EO-SK, vpravo nahoře EO-RO, vpravo dole EO-TT, uprostřed voda (zdroj: vlastní)

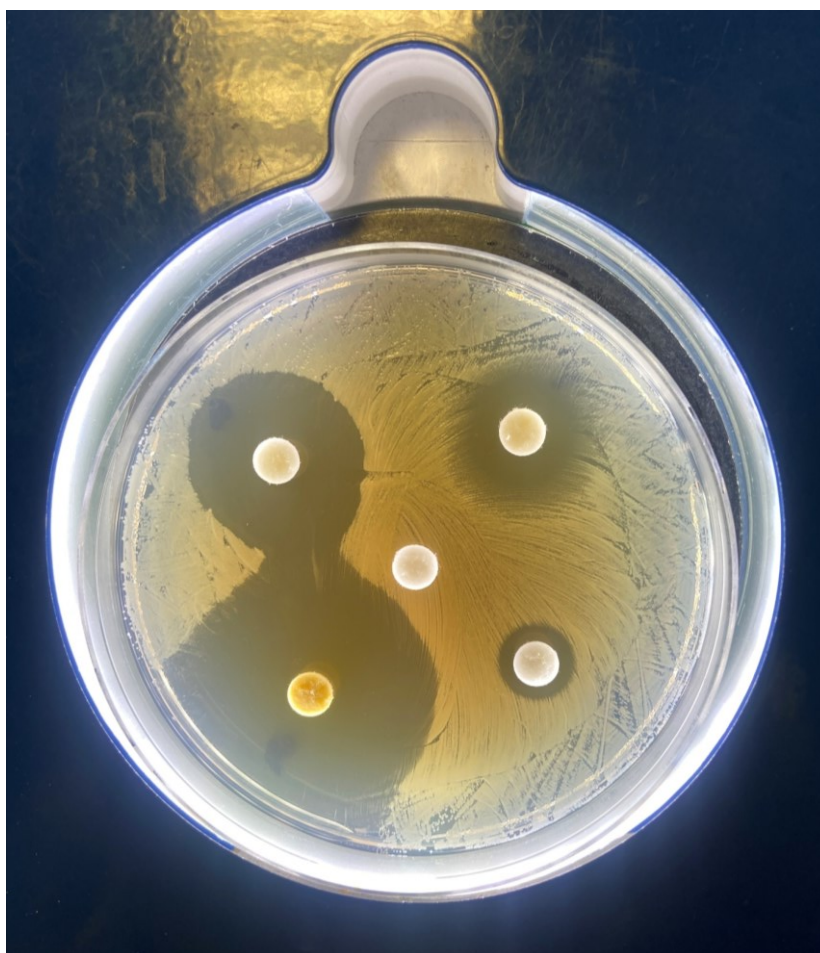
Výsledky testu u gram pozitivního rodu bakterií *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) jsou uvedeny v Tabulce 8. Inhibiční zóny byly vytvořeny u všech disků, kromě negativní kontroly (uprostřed), největší inhibiční schopnost byla zaznamenána opět u skořicového EO, nejmenší pak u tea tree. Na Obrázku 35 můžeme pozorovat spojení inhibičních zón u disků napuštěných skořicovým a rozmarýnovým EO, můžeme tedy usuzovat, že tyto dva oleje mají synergický efekt.

Z provedeného testu můžeme usoudit, že použité EO vykazují antibakteriální účinky u gram pozitivních i gram negativních bakterií. Skořicový EO inhiboval více růst bakterie *E. coli* (gram negativní), zatímco ostatní oleje měly větší aktivitu u bakterií *S. aureus* (gram pozitivní). Z testu dále vyplývá, že skořicový EO má největší antibakteriální schopnosti.

Tabulka 8 Inhibiční zóny pro *S. aureus* při použití EO

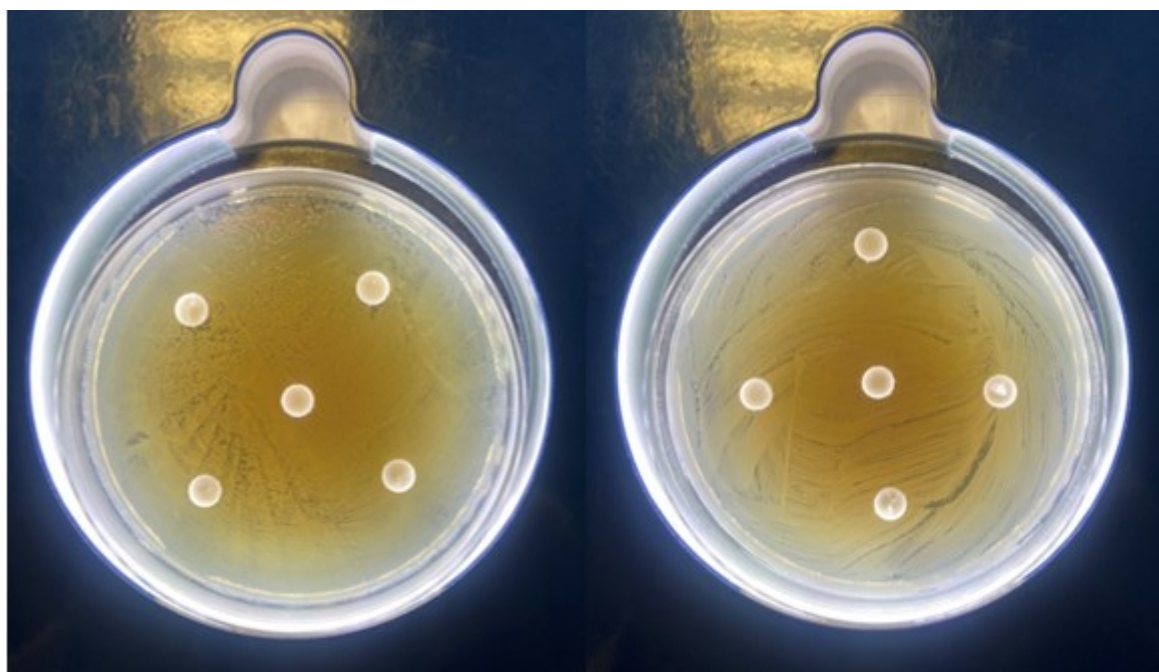
Staph. aureus	inhibiční zóny [cm]				
miska	EO-rozmarýn	EO-hřebíček	EO-tea tree	EO-skořice	kontrola
1	2,4	1,5	1,1	3,1	0
2	2,3	1,4	1,0	3,4	0
3	2,4	1,4	1,1	3,4	0
průměr ± SD	2,367 ± 0,058	1,434 ± 0,058	1,067 ± 0,058	3,30 ± 0,18	0,00

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 35 Inhibiční zóny u rodu *S. aureus* při použití EO, vlevo nahoře disk s EO-RO, vlevo dole EO-SK, vpravo nahoře EO-HR, vpravo dole EO-TT, uprostřed voda (zdroj: vlastní)

V dalším kroku byla testována antibakteriální aktivita připravených NLC. Výsledky však ukázaly, že disky napuštěné NLC suspenzemi nezabránilly růstu bakterií (*E. coli*, *S. aureus*). Inhibiční zóny se po kultivaci bakterií nevytvořily, což lze pozorovat na Obrázku 36. Antibakteriální účinky NLC byly v tomto jednoduchém testu neprůkazné, což mohlo být způsobeno následujícími faktory. Jednak to mohla být špatná difúze EO v agaru, která je způsobená jejich nízkou rozpustností ve vodě, a dalším faktorem mohlo být nedostatečně rychlé uvolňování EO z lipidové matrice, které bránilo dosažení dostatečně vysoké koncentrace EO potřebné pro antibakteriální účinek. Disková difúzní metoda se tedy nejvíe jako vhodná pro testování antimikrobiálních vlastností NLC-EO suspenzí.



Obrázek 36 Inhibiční zóny u rodu *E. coli* (vlevo) a *S. aureus* (vpravo) s NLC suspenzí (zdroj: vlastní)

8.4.2 Jamková difúzní metoda

Vzhledem k tomu, že antibakteriální účinek připravených nosičů nebyl diskovou difúzní metodou jednoznačně prokázán, přistoupili jsme k dalšímu testování pomocí jamkové difúzní metody. Tato metoda umožňuje aplikaci většího objemu testované disperze (50 μ l), což může zvýšit šanci na detekci případné aktivity. Pro tento účel byly připraveny i dvě nové formulace, NLC-SK2 a NLC-SK+RO, které obsahovaly dvojnásobnou koncentraci EO.

Ani tento test však nepřinesl uspokojivé výsledky. Formulace NLC-SK2 sice vykazala inhibiční zónu proti *S. aureus*, nikoliv však proti *E. coli*. Závažnějším zjištěním však bylo, že inhibiční zóna se objevila i u prázdných NLC bez EO, které sloužily jako kontrola.

Na základě těchto výsledků lze formulovat hypotézu, že antibakteriální účinek může být způsoben přítomností kyseliny olejové, která je známá svými účinky proti některým bakteriím, například *Clostridium perfringens* nebo *S. aureus* [67]. Rovněž práce [68] ukázala, že lipidové nanočástice obsahující volné mastné kyseliny, včetně kyseliny olejové, mohou účinně působit proti bakteriím, např. proti *Pseudomonas aeruginosa*. Je tedy možné, že antibakteriální efekt pozorovaný u NLC bez EO by mohl být způsoben právě obsahem kyseliny olejové v NLCT. Tato hypotéza však naráží na rozpor: všechny testované formulace obsahovaly jak kyselinu olejovou (jako tekutý lipid), tak různé typy EO, které by měly antimikrobní účinek formulace ještě posílit. K tomu však nedošlo, a u žádného ze vzorků (kromě NLC-SK) se výraznější antibakteriální aktivita neprojevila.

Z uvedených zjištění je patrné, že problematika antimikrobiální aktivity NLC s esenciálními oleji je složitá a zasluhuje další výzkum.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit, charakterizovat a zhodnotit stabilitu nanostrukturovaných lipidových nosičů (NLC) s enkapsulovanými esenciálními oleji (EO). Pomocí vhodných analytických metod byla stanovena průměrná velikost částic, distribuce jejich velikosti a zeta potenciál. Připravené NLC vykazovaly velikost obvyklou pro tento typ nosičů a vzorky NLC-TT, NLC-SK a NLC-HR i dobrou stabilitu po dobu 5 týdnů skladování při laboratorní teplotě. U vzorku NLC-HR došlo během skladování ke zvětšování částic, pravděpodobně vlivem rekrystalizace lipidové matrice nebo nevhodné interakce nosiče s enkapsulovaným EO. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie a plynové chromatografie bylo dále provedeno stanovení složení použitých EO (skořicový, rozmarýnový, hřebíčkový a tea tree olej). V rámci mikrobiologického hodnocení byly provedeny testy antimikrobiální aktivity (diskovou difúzní metodou), které prokázaly účinnost pouze u samotných EO. NLC s enkapsulovanými EO antibakteriální aktivitu nevykazovaly, pravděpodobně z důvodu rozdílné povahy agarů a NLC suspenzí, která může bránit, nebo zpomalovat uvolňování EO z částic. Antibakteriální účinky by byly lépe průkazné při použití jiného testu např. mikrodiluční metody. Celkově práce přispěla k hlubšímu poznání vlastností a chování NLC jako potenciálních nosičů přírodních antimikrobiálních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] AKOMBAETWA, Nakamwi; ILANGALA, Ange B.; THOM, Lorraine; MEMVANGA, Patrick B.; WITIKA, Bwalya Angel et al. Current Advances in Lipid Nanosystems Intended for Topical and Transdermal Drug Delivery Applications. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 2, s. 1-2. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020656>. [cit. 2025-03-30].
- [2] PURI, Anu; LOOMIS, Kristin; SMITH, Brandon; LEE, Jae-Ho; YAVLOVICH, Amichai et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. Online. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2009, roč. 26, č. 6, s. 523-580. ISSN 0743-4863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10>. [cit. 2025-03-30].
- [3] *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*. Online. 2019, roč. 10, č. 12. 2019. ISSN 23205148. [cit. 2025-03-30].
- [4] DAVIM, J. P. (ed.). *Biomaterials and medical tribology: research and development*. Woodhead Publishing series in biomaterials. Oxford: Woodhead Publishing, 2013. ISBN 978-0-85709-017-1.
- [5] JIN, Zhaokui; GAO, Qi a WU, Keke. *Advanced drug delivery reviews*. Volume 202. Elsevier Science, 1987-. ISSN 0169-409X. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/0169409X>.
- [6] NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi a ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2015, roč. 5, č. 3, s. 305-313. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>. [cit. 2025-03-30].
- [7] SUBRAMANIAM, Bavani; SIDDIK, Zahid H. a NAGOOR, Noor Hasima. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. Online. *Journal of Nanoparticle Research*. 2020, roč. 22, č. 6. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04848-0>. [cit. 2025-03-30].

- [8] MEHNERT, Wolfgang a MÄDER, Karsten. *Advanced drug delivery reviews*. Volume 64. Elsevier Science, 1987-. ISSN 0169-409X. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/0169409X>.
- [9] MÜLLER; RADTKE a WISSING. *Advanced drug delivery reviews*. Volume 54. Elsevier Science, 1987-. ISSN 0169-409X. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/0169409X>.
- [10] MEHNERT, Wolfgang a MÄDER, Karsten. *Advanced drug delivery reviews*. Volume 47. Elsevier Science, 1987-. ISSN 0169-409X. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/0169409X>.
- [11] RAMADON, Delly. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Formulation and Fabrication. Online. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 2023, roč. 10, č. 2. ISSN 24072354. Dostupné z: <https://doi.org/10.7454/psr.v10i2.1313>. [cit. 2025-04-04].
- [12] ÜNER, Melike a YENER, Gülgün. *International journal of nanomedicine*. Auckland: Dove Medical Press, 2006-. ISSN 1176-9114. Dostupné také z: http://www.dovepress.com/articles.php?journal_id=5.
- [13] REZA ARABESTANI, Mohammad; BIGHAM, Ashkan a KAMAREHEI, Farideh. *Biomedicine & pharmacotherapy: =Biomédecine & pharmacothérapie*. Volume 174. Paris: Masson, 1982-. ISSN 0753-3322. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/07533322>.
- [14] KHAN, Shadab; SHARMA, Ajay a JAIN, Vikas. An Overview of Nanostructured Lipid Carriers and its Application in Drug Delivery through Different Routes. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2023, roč. 13, č. 3, s. 446-460. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.34172/apb.2023.056>. [cit. 2025-04-04].
- [15] NGUYEN, Van Hong; THUY, Vy Nguyen a VAN, Toi Vo. *OpenNano*. Volume 8. Elsevier, 2022. Dostupné také z: http://sfx.jib.cz/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/sfxit.com:opac_856&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=3710000000749606&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&.

- [16] KHOSA, Archana Khosa; REDDI, Satish Reddi a N. SAHA, Ranendra. *Biomedicine & pharmacotherapy: =Biomédecine & pharmacothérapie*. Volume 103. Paris: Masson, 1982-. ISSN 0753-3322. Dostupné také z: <http://www.elsevier.com/locate/issn/07533322>.
- [17] RAHMASARI, Dyah; ROSITA, Noorma a SOERATRI, Widji. Physicochemical Characteristics, Stability, and Irritability of Nanostructured Lipid Carrier System Stabilized with Different Surfactant Ratios. Online. *JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*. 2022, roč. 9, č. 1, s. 8-16. ISSN 2580-8303. Dostupné z: <https://doi.org/10.20473/jfiki.v9i12022.8-16>. [cit. 2025-04-04].
- [18] SERRANO-LOTINA, A. a PORTELA, R. *Catalysis today: a serial publication dealing with topical themes in catalysis and related subjects*. Volume 423. Amsterdam: Elsevier, [1987]-. ISSN 0920-5861.
- [19] ELMOWAFY, Mohammed; IBRAHIM, Hany M.; AHMED, Mohammed A.; SHALABY, Khaled; SALAMA, Ayman et al. Atorvastatin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs): strategy to overcome oral delivery drawbacks. Online. *Drug Delivery*. 2017, roč. 24, č. 1, s. 932-941. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1337823>. [cit. 2025-04-04].
- [20] BELOQUI PHD, Ana a ÁNGELES SOLINÍS PHD, María. *Nanomedicine*. Volume 12. London: Future Medicine, ©2006-. ISSN 1748-6963. Dostupné také z: http://sfx.jib.cz/sfxlcl3??url_ver=Z39.88-2004&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/sfxit.com:opac_856&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=1000000000223913&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&.
- [21] GOMAA, Eman; FATHI, Heba A.; EISSA, Noura G. a ELSABAHY, Mahmoud. Methods for preparation of nanostructured lipid carriers. Online. *Methods*. 2022, roč. 199, s. 3-8. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.003>. [cit. 2025-04-04].

- [22] KUMARI, Shilpa a JAISWAL, Sandhya. *Journal of young pharmacists*. Volume 15. Mumbai: Medknow Publications, 2009-. ISSN 0975-1483. Dostupné také z: <http://www.jyoungpharm.in/>.
- [23] HASSAN, DOAA H. a SHOHDY, JOSEPH N. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. Volume 14. Bhopal, Madhya Pradesh, India: Innovare Academic Sciences Pvt. ISSN 0975-7058. Dostupné také z: http://sfx.knihovny.cz/sfxlcl3??url_ver=Z39.88-2004&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/sfxit.com:opac_856&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=2670000000006379&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&sfx.institute=MSVK.
- [24] MANION, Chelsea R. a WIDDER, Rebecca M. *American journal of health-system pharmacy*. Volume 74. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 1995-. ISSN 1079-2082. Dostupné také z: <http://www.ajhp.org/>.
- [25] GHODRATI, Mohsen; FARAHPOUR, Mohammad Reza a HAMISHEHKAR, Hamed. Encapsulation of Peppermint essential oil in nanostructured lipid carriers: In-vitro antibacterial activity and accelerative effect on infected wound healing. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, roč. 564, s. 161-169. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.043>. [cit. 2025-04-04].
- [26] SINDLE, Allison a MARTIN, Kari. Art of Prevention: Essential Oils - Natural Products Not Necessarily Safe. Online. *International Journal of Women's Dermatology*. 2021, roč. 7, č. 3, s. 304-308. ISSN 23526475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.10.013>. [cit. 2025-04-04].
- [27] PEZANTES-ORELLANA, Camila; GERMAN BERMÚDEZ, Fátima; MATÍAS DE LA CRUZ, Carmen; MONTALVO, José Luis a ORELLANA-MANZANO, Andrea. Essential oils: a systematic review on revolutionizing health, nutrition, and omics for optimal well-being. Online. *Frontiers in Medicine*. 2024, roč. 11. ISSN 2296-858X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1337785>. [cit. 2025-04-04].

- [28] DOYLE, Amanda A. a STEPHENS, John C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. Online. *Fitoterapia*. 2019, roč. 139. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>. [cit. 2025-04-04].
- [29] CHOUHAN, Sonam; SHARMA, Kanika a GULERIA, Sanjay. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. Online. *Medicines*. 2017, roč. 4, č. 3. ISSN 2305-6320. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>. [cit. 2025-04-04].
- [30] SIZAR; LESLIE a UNAKAL. *StatPearls [Internet]*. Online. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>. [cit. 2025-04-04].
- [31] STEWARD, Karen. Gram Positive vs Gram Negative. Online. *Technology Networks [online]*. 2023. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>. [cit. 2025-04-04].
- [32] ABERS, Mareshah; SCHROEDER, Sydney; GOELZ, Linna; SULSER, Adrienne; ST. ROSE, Tiffany et al. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. Online. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 2662-7671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03285-3>. [cit. 2025-04-04].
- [33] REICHLING, Jürgen. Antiviral and Virucidal Properties of Essential Oils and Isolated Compounds – A Scientific Approach. Online. *Planta Medica*. 2022, roč. 88, č. 08, s. 587-603. ISSN 0032-0943. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/a-1382-2898>. [cit. 2025-04-04].
- [34] PREEDY, Victor R. (ed.). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Amsterdam: Academic Press is an imprint of Elsevier, [2016]. ISBN 9780124166448. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124166417>.
- [35] NISAR, Muhammad Farrukh; KHADIM, Mahnoor; RAFIQ, Muhammad; CHEN, Jinyin; YANG, Yali et al. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021,

- roč. 2021, č. 1. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2021/2497354>. [cit. 2025-04-04].
- [36] HARO-GONZÁLEZ, José Nabor; CASTILLO-HERRERA, Gustavo Adolfo; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, Moisés a ESPINOSA-ANDREWS, Hugo. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 21. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>. [cit. 2025-04-04].
- [37] SHARMA, Ajay; BHARDWAJ, Garima; SOHAL, Harvinder Singh a GOHAIN, Apurba. Eugenol. Online. In: *Nutraceuticals and Health Care*. Elsevier, 2022, s. 177-198. ISBN 9780323897792. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00007-7>. [cit. 2025-04-04].
- [38] HAMMER, K.A. Treatment of acne with tea tree oil (*melaleuca*) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. Online. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015, roč. 45, č. 2, s. 106-110. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.011>. [cit. 2025-04-04].
- [39] KAIREY, Lana; AGNEW, Tamara; BOWLES, Esther Joy; BARKLA, Bronwyn J.; WARDLE, Jon et al. Efficacy and safety of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for human health—A systematic review of randomized controlled trials. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2023, roč. 14. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1116077>. [cit. 2025-04-04].
- [40] RAHBARDAR, Mahboobeh Ghasemzadeh a HOSSEINZADEH, Hossein. *Iranian journal of basic medical sciences: Therapeutic effects of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and its active constituents on nervous system disorders*. Mashhad, Iran: Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2020. ISSN 2008-3874. Dostupné také z: http://sfx.knihovny.cz/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/sfxit.com:opac_856&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=1000000000745979&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&sfx.institute=MSVK.

- [41] MICIĆ, Darko; ĐUROVIĆ, Saša; RIABOV, Pavel; TOMIĆ, Ana; ŠOVLJANSKI, Olja et al. Rosemary Essential Oils as a Promising Source of Bioactive Compounds: Chemical Composition, Thermal Properties, Biological Activity, and Gastronomical Perspectives. Online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10112734>. [cit. 2025-04-04].
- [42] JIANG, Yang; WU, Nan; FU, Yu-Jie; WANG, Wei; LUO, Meng et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Online. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011, roč. 32, č. 1, s. 63-68. ISSN 13826689. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>. [cit. 2025-04-04].
- [43] BONACCORSO, Angela; CIMINO, Cinzia; MANNO, Daniela Erminia; TOMASELLO, Barbara; SERRA, Antonio et al. Essential Oil-Loaded NLC for Potential Intranasal Administration. Online. *Pharmaceutics*. 2021, roč. 13, č. 8. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081166>. [cit. 2025-04-05].
- [44] KHEZRI, Keyvan; FARAHPOUR, Mohammad Reza a MOUNESI RAD, Shokoofeh. Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019, roč. 47, č. 1, s. 980-988. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1582539>. [cit. 2025-04-05].
- [45] DE MENESES, Alessandra Cristina; MARQUES, Elisa Balbi Pinto; LEIMANN, Fernanda Vitória; GONÇALVES, Odinei Hess; INEU, Rafael Porto et al. Encapsulation of clove oil in nanostructured lipid carriers from natural waxes: Preparation, characterization and in vitro evaluation of the cholinesterase enzymes. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, roč. 583. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123879>. [cit. 2025-04-05].
- [46] BASHIRI, Sahra; GHANBARZADEH, Babak; AYASEH, Ali; DEGHANNYA, Jalal; EHSANI, Ali et al. Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. Online. *Food Bioscience*. 2020, roč. 35. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100526>. [cit. 2025-04-05].

- [47] FITRIANI, Endang Wahyu; SURINI, Silvia; AVANTI, Christina a ROSANA, Yeva. DESIGN OF TEA TREE OIL-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: PREPARATION AND IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY. Online. *Journal of Southwest Jiaotong University*. 2022, roč. 57, č. 1, s. 205-211. ISSN 0258-2724. Dostupné z: <https://doi.org/10.35741/issn.0258-2724.57.1.18>. [cit. 2025-04-05].
- [48] MOLDOVEANU, Serban C. a DAVID, Victor. Short Overviews of Analytical Techniques Not Containing an Independent Separation Step. Online. In: *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Elsevier, 2017, s. 31-53. ISBN 9780128036846. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00002-0>. [cit. 2025-04-05].
- [49] COCOȘ, Florentina-Iuliana; ANUȚA, Valentina; POPA, Lăcrămioara; GHICA, Mihaela Violeta; NICA, Mihaela-Alexandra et al. Development and Evaluation of Docetaxel-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Skin Cancer Therapy. Online. *Pharmaceutics*. 2024, roč. 16, č. 7. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070960>. [cit. 2025-04-05].
- [50] DRIEUX, L.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W. a JARLIER, V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Online. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008, roč. 14, s. 90-103. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>. [cit. 2025-04-05].
- [51] IONITA, Petre; DINOIU, Vasile; MUNTEANU, Cornel; TURCU, Ioana Maria; TECUCEANU, Victorita et al. Antioxidant activity of rosemary extracts in solution and embedded in polymeric systems. Online. *Chemical Papers*. 2015, roč. 69, č. 6. ISSN 1336-9075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0024>. [cit. 2025-05-12].
- [52] *Quantitative Determination Method for Tea Tree Oil in Solution: Chinese Patent*. Uděl.: 2006 December 20. CN1880945A. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CN1880945A/en>. [cit. 2025-04-25].
- [53] JOHNSON, Joel B.; THANI, Parbat Raj a NAIKER, Mani. Detection of eucalyptus oil adulteration in Australian tea tree oil using UV–Vis and fluorescence spectroscopy.

- Online. *Talanta Open*. 2022, roč. 6. ISSN 26668319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100169>. [cit. 2025-04-25].
- [54] PRAMOD, K.; ANSARI, Shahid H. a ALI, Javed Ali. Asian Journal of Pharmaceutical Analysis. Online. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis: Development and validation of UV spectrophotometric method for the quantitative estimation of eugenol*. 3. 2013, s. 58-61. ISSN 2231-5675. Dostupné z: <https://doi.org/10.5958/2231-5675>. [cit. 2025-04-18].
- [55] FOUDAH, Ahmed I.; SHAKEEL, Faiyaz; ALQARNI, Mohammed H.; ROSS, Samir A.; SALKINI, Mohammad A. et al. Simultaneous Estimation of Cinnamaldehyde and Eugenol in Essential Oils and Traditional and Ultrasound-Assisted Extracts of Different Species of Cinnamon Using a Sustainable/Green HPTLC Technique. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26072054>. [cit. 2025-04-18].
- [56] TISSERAND, Robert a YOUNG, Rodney. *Essential Oil Safety (Second Edition)*. Health Professions 2013. Spojené státy americké: Churchill Livingstone, 2014. ISBN 978-0-443-06241-4. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780443062414>.
- [57] GROOT, Anton C. de a SCHMIDT, Erich. *Essential oils: contact allergy and chemical composition*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, [2016]. ISBN 978-1-4822-4640-7.
- [58] AMELIA, B.; SAEPUDIN, E.; CAHYANA, A. H.; RAHAYU, D. U.; SULISTYONINGRUM, A. S. et al. GC-MS analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) bud essential oil from Java and Manado. Online. In: . 2017, 030082-. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.4991186>. [cit. 2025-04-18].
- [59] YU, T.; YAO, H.; QI, S. a WANG, J. GC-MS analysis of volatiles in cinnamon essential oil extracted by different methods. Online. *Grasas y Aceites*. 2020, roč. 71, č. 3. ISSN 1988-4214. Dostupné z: <https://doi.org/10.3989/gya.0462191>. [cit. 2025-04-18].
- [60] MALVERN PANALYTICAL A SPECTRIS COMPANY. *Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography?* Online. Dostupné z:

<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/insights/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography>. [cit. 2025-05-05].

- [61] GENTILINI, Alessandra; PASTORE, Mirella; MARRA, Fabio a RAGGI, Chiara. The Role of Stroma in Cholangiocarcinoma: The Intriguing Interplay between Fibroblastic Component, Immune Cell Subsets and Tumor Epithelium. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 10. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19102885>. [cit. 2025-04-25].
- [62] UCHIDA, Denise Tiemi; SIQUEIRA, Gabriella Ferreira; DOS REIS, Edson Marques; HEGETO, Fábio Luis; MEDINA NETO, Antonio et al. Design of Nanostructured Lipid Carriers Containing Cymbopogon martinii (Palmarosa) Essential Oil against Aspergillus nomius. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26164825>. [cit. 2025-05-06].
- [63] SOUZA, Ingrid D.L.; SAEZ, Vivian a MANSUR, Claudia R.E. Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, roč. 230. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113491>. [cit. 2025-05-06].
- [64] JEITLER, Ramona; GLADER, Christina; KÖNIG, Gerhard; KAPLAN, Jay; TETYCZKA, Carolin et al. On the Structure, Stability, and Cell Uptake of Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery. Online. *Molecular Pharmaceutics*. 2024, roč. 21, č. 7, s. 3674-3683. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00392>. [cit. 2025-05-06].
- [65] MATARAZZO, Ananda P.; RIOS, Carlos A.; GERÔNIMO, Gabriela; ONDEI, Roberta; DE PAULA, Eneida et al. Development of a Versatile Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Using Design of Experiments (DoE)—Part II: Incorporation and Stability of Butamben with Different Surfactants. Online. *Pharmaceutics*. 2024, roč. 16, č. 7. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070863>. [cit. 2025-05-06].

- [66] ILYAS, Umair; ASIF, Muhammad; WANG, Minglian; ALTAF, Reem; ZAFAR, Hajra et al. Nanostructured Lipid Carrier-Based Delivery of Pioglitazone for Treatment of Type 2 Diabetes. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, roč. 13. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.934156>. [cit. 2025-05-06].
- [67] HOVORKOVÁ, Petra; LALOUČKOVÁ, Klára a SKŘIVANOVÁ, Eva. Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. Online. *Czech Journal of Animal Science*. 2018, roč. 63, č. 3, s. 119-125. ISSN 12121819. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/70/2017-CJAS>. [cit. 2025-05-12].
- [68] TAYLOR, Erik N.; KUMMER, Kim M.; DYONDI, Deepti; WEBSTER, Thomas J. a BANERJEE, Rinti. Multi-scale strategy to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* on surfaces using solid lipid nanoparticles loaded with free fatty acids. Online. *Nanoscale*. 2014, roč. 6, č. 2, s. 825-832. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C3NR04270G>. [cit. 2025-05-12].

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 SLN částice, upraveno podle [7]</i>	16
<i>Obrázek 2 Typy NLC částic (A – SLN, B – imperfektní NLC, C – amorfní NLC, D – vícenásobný NLC), upraveno podle [16]</i>	20
<i>Obrázek 3 Použité esenciální oleje (zdroj: vlastní)</i>	33
<i>Obrázek 4 Plynový chromatograf DANI Master GC (zdroj: vlastní)</i>	35
<i>Obrázek 5 Hamiltonova mikrostříkačka použitá pro nástrík vzorků EO (zdroj: vlastní)</i>	35
<i>Obrázek 6 Proces výroby NLC, upraveno podle [49]</i>	37
<i>Obrázek 7 Kyveta pro měření zeta potenciálu (zdroj: vlastní)</i>	38
<i>Obrázek 8 Rozmístění disků se vzorky na kultivační misce (zdroj: vlastní)</i>	39
<i>Obrázek 9 Kultivační misky s bakteriální suspenzí před nalitím Mueller-Hintonova agaru (zdroj: vlastní)</i>	40
<i>Obrázek 10 Rozmístění NLC na kultivační misce (zdroj: vlastní)</i>	41
<i>Obrázek 11 Kultivační misky s jamkami obsahujícími NLC suspenze (zdroj: vlastní)</i>	41
<i>Obrázek 12 Absorpční spektrum rozmarýnového EO (zdroj: vlastní)</i>	42
<i>Obrázek 13 Absorpční spektrum tea tree EO (zdroj: vlastní)</i>	43
<i>Obrázek 14 Absorpční spektrum hřebíčkového EO (zdroj: vlastní)</i>	44
<i>Obrázek 15 Absorpční spektrum skořicového EO (zdroj: vlastní)</i>	44
<i>Obrázek 16 Složení rozmarýnového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)</i> ..	46
<i>Obrázek 17 Složení tea tree EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)</i>	47
<i>Obrázek 18 Složení hřebíčkového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)</i> ...	49
<i>Obrázek 19 Složení skořicového EO získané plynovou chromatografií (zdroj: vlastní)</i>	50
<i>Obrázek 20 Velikost částic NLC-EO stanovená ihned po přípravě (zdroj: vlastní)</i>	51
<i>Obrázek 21 Vzhled suspenze NLC-EO (zdroj: vlastní)</i>	52
<i>Obrázek 22 Distribuce velikosti částic studovaných vzorků. NLC-RO (červená), NLC-TT (modrá), NLC-HR (zelená), NLC-SK (černá) (zdroj: vlastní)</i>	52
<i>Obrázek 23 Indexy polydisperzity NLC-EO (zdroj: vlastní)</i>	53
<i>Obrázek 24 Zeta potenciál NLC-EO částic stanovený ihned po přípravě (zdroj: vlastní)</i> ..	54
<i>Obrázek 25 Velikost částic NLC-EO po dobu 1 měsíce (zdroj: vlastní)</i>	55
<i>Obrázek 26 Distribuce velikosti částic NLC-RO stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)</i>	56
<i>Obrázek 27 Distribuce velikosti částic NLC-TT stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)</i>	56
<i>Obrázek 28 Distribuce velikosti částic NLC-SK stanovená po 1 dni (červená), 20 dnech (zelená) a po 26 dnech (modrá) (zdroj: vlastní)</i>	56
<i>Obrázek 29 Distribuce velikosti částic NLC-HR stanovená po 1 dni (červená), 15 dnech (zelená) a po 26 dnech po (modrá) (zdroj: vlastní)</i>	57

<i>Obrázek 30 Zeta potenciál NLC-EO po dobu 1 měsíce (zdroj: vlastní)</i>	58
<i>Obrázek 31 Vzhled NLC-EO po prvním týdnu skladování (zdroj: vlastní)</i>	59
<i>Obrázek 32 Vzhled NLC-EO po třetím týdnu skladování (zdroj: vlastní)</i>	59
<i>Obrázek 33 Porovnání vzhledu NLC-TT a NLC-HR po měsíci skladování (zdroj: vlastní)</i>	60
<i>Obrázek 34 Inhibiční zóny u rodu E. coli při použití EO, vlevo nahoře disk s EO-HR, vlevo dole EO-SK, vpravo nahoře EO-RO, vpravo dole EO-TT, uprostřed voda (zdroj: vlastní)</i>	61
<i>Obrázek 35 Inhibiční zóny u rodu S. aureus při použití EO, vlevo nahoře disk s EO-RO, vlevo dole EO-SK, vpravo nahoře EO-HR, vpravo dole EO-TT, uprostřed voda (zdroj: vlastní)</i>	62
<i>Obrázek 36 Inhibiční zóny u rodu E. coli (vlevo) a S. aureus (vpravo) s NLC suspenzí (zdroj: vlastní)</i>	63

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 Navážky esenciálních olejů pro UV-VIS spektrofotometrii</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 2 Složení formulací NLC. Zkratka NLC-RO odpovídá NLC s rozmarýnovým EO, NLC-HR s hřebíčkovým EO, NLC-TT s tea tree olejem, NLC-SK se skořicovým EO, NLC-SK 2 odpovídá NLC se skořicovým EO ve vyšší koncentraci, NLC-SK+RO odpovídá NLC s vyšší koncentrací skořicového a rozmarýnového EO</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 3 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v rozmarýnovém EO, identifikovaných pomocí dostupných standardů</i>	<i>46</i>
<i>Tabulka 4 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v tea tree EO identifikovaných pomocí dostupných standardů</i>	<i>48</i>
<i>Tabulka 5 Zastoupení jednotlivých látek obsažených v hřebíčkovém EO</i>	<i>49</i>
<i>Tabulka 6 Zastoupení jednotlivých látek obsažených ve skořicovém EO</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 7 Inhibiční zóny u E. coli při použití EO</i>	<i>61</i>
<i>Tabulka 8 Inhibiční zóny pro S. aureus při použití EO</i>	<i>62</i>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NLC	Nanostrukturovaný lipidový nosič (Nanostructured Lipid Carrier)
EO	Esenciální olej
SLN	Pevné lipidové nanočástice (Solid Lipid Nanoparticle)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
ZP	Zeta potenciál
HPH	Homogenizace pod vysokým tlakem (High Pressure Homogenization)
REO/RO	Rozmarýnový esenciální olej
CEO/SK	Skořicový esenciální olej
TTO/TT	Tea tree esenciální olej
HR	Hřebíčkový esenciální olej
UV	Ultrafialový (Ultraviolet)
VIS	Viditelný (Visible)
BP	Bakalářská práce
FID	Plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
NLC-EO	Nanostrukturovaný lipidový nosič s esenciálním olejem
NLC-SK	Nanostrukturovaný lipidový nosič se skořicovým esenciálním olejem
NLC-RO	Nanostrukturovaný lipidový nosič s rozmarýnovým esenciálním olejem
NLC-TT	Nanostrukturovaný lipidový nosič s tea tree esenciálním olejem
NLC-HR	Nanostrukturovaný lipidový nosič s hřebíčkovým esenciálním olejem
NLC-SK 2	Nanostrukturovaný lipidový nosič se skořicovým esenciálním olejem ve vyšší koncentraci
NLC-SK + RO	Nanostrukturovaný lipidový nosič s vyšší koncentrací skořicového a rozmarýnového esenciálního oleje
MF	McFarlandův standard
PdI	Index polydisperzity

ELS Elektroforetický rozptyl světla (Electrophoretic Light Scattering)

E.coli Bakterie rodu *Escherichia coli*

S.aureus Bakterie rodu *Staphylococcus aureus*

