



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA MIKROBIÁLNÍCH, ROSTLINNÝCH A
ŘASOVÝCH EXTRAKTŮ VYUŽITELNÝCH DO DĚTSKÉ
KOSMETIKY**

PREPARATION OF MICROBIAL, PLANT AND ALGAL EXTRACTS TO USE IN COSMETICS FOR INFANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Šárka Janderová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1661/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Šárka Janderová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Příprava mikrobiálních, rostlinných a řasových extraktů využitelných do dětské kosmetiky

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – přírodní producenti látek s antimikrobiálním účinkem, antioxidantů a vitaminů (přehled)
- 2) příprava extraktů z vybraných kvasinek, řas a rostlin
- 3) charakterizace hlavních obsahových složek extraktů
- 4) stanovení biologických účinků a bezpečnosti připravených extraktů

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Šárka Janderová prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
studentka vedoucí práce vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývala přípravou kosmetického produktu pro děti s přidavkem aktivních látek ze sinic, mikrořas a rostlin.

V teoretické části byla vypracována rešerše, která shrnuje základní informace o těchto organismech. Byly zde shrnuty antioxidační látky, které jsou v těchto organismech obsaženy.

V praktické části bylo ze sinic, řas a rostlin připraveno několik druhů extraktů, které byly následně charakterizovány. Měřen byl obsah fenolických látek, chlorofylů, celkový obsah karotenoidů spektrofotometricky, obsah rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho a profil mastných kyselin v biomase pomocí GC. Dále byl měřen SPF faktor pomocí spektrofotometrické metody a hodnota dopočítávána pomocí Mansurovy rovnice a antioxidační aktivita pomocí metody TEAC. V závěru práce byly vybrány dva nejlepší extrakty, které byly použity pro přípravu kosmetických emulzí. Ty byly následně testovány v senzorické analýze po dobu dvou týdnů.

Klíčová slova

Sinice, mikrořasy, rostliny antioxidanty, chlorofyly, karotenoidy, extrakce, SPF, kosmetika, děti

Abstract

This bachelor thesis deals with the preparation of a cosmetic product for infants with the addition of active substances from cyanobacteria, microalgae, or plants.

In the theoretical part, a review was made, which not only summarizes the basic information about these organisms, but also the antioxidants contained in these microorganisms.

In the practical part, several types of extracts from cyanobacteria, algae and plants were prepared and characterized. The content of phenolic substances, chlorophylls and content of carotenoids were measured spectrophotometrically. Content of soluble proteins was determined by Hartree-Lowry method and the fatty acid profile in biomass was obtained by GC. Furthermore, the SPF factor was measured using the spectrophotometric method the Mansur equation. Antioxidant activity was determined by using the TEAC method. Finally, two of the best extracts were selected for the preparation of cosmetic emulsions. The sensory analysis of prepared emulsions was performed for the period of two weeks.

Keywords

Cyanobacteria, microalgae, plants, antioxidants, chlorophylls, carotenoids, extraction, SPF, cosmetics, infants

JANDEROVÁ, Šárka. Příprava mikrobiálních, rostlinných a řasových extraktů využitelných do dětské kosmetiky [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139338>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

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

podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za trpělivost a odborné rady při sepisování mé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Renatě Uhlířové za cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování experimentální části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem osobám, které se zúčastnily testování krémů v rámci této bakalářské práce. A mé poděkování patří i mé rodině a přátelům za podporu a vytvoření příznivého prostředí, které mi umožnilo tuto práci vypracovat.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORIE	10
2.1	Řasy	10
2.1.1	Obecná charakteristika	10
2.1.2	Stavba buňky	10
2.1.3	Výskyt a význam v přírodě a pro člověka.....	10
2.1.4	<i>Porphyridium cruentum</i>	10
2.1.5	<i>Scenedesmus</i>	11
2.1.6	<i>Palmaria palmata</i>	11
2.1.7	<i>Ascophyllum nodosum</i>	12
2.2	Sinice	12
2.2.1	Obecná charakteristika	12
2.2.2	Stavba buňky	13
2.2.3	Výskyt a význam v přírodě a pro člověka.....	13
2.2.4	Rod <i>Nostoc</i>	13
2.2.5	Rod <i>Anabaena</i>	13
2.2.6	<i>Scytonema</i>	14
2.2.7	<i>Chroococcidiopsis</i>	14
2.2.8	<i>Spirulina</i>	15
2.3	<i>Centella asiatica</i>	16
2.4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	16
2.5	Růst a vývoj mikroorganismů.....	17
2.5.1	Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy	17
2.6	Aktivní látky sinic a mikrořas	17
2.7	Antioxidační látky	17
2.7.1	Fenolické látky	18
2.7.2	Vlastnosti pigmentových barviv.....	18
2.7.3	Karotenoidy	19
2.7.4	Chlorofyly	20
2.8	Toxicita	20
2.8.1	Cytotoxicita látek, používaných v kosmetických přípravcích	20
2.9	SPF faktor	20
2.10	UV záření.....	20
2.11	Kosmetika	21

2.11.1	Dětská kosmetika	21
2.11.2	Krém.....	21
2.12	Přírodní zdroje aktivních látek v kosmetickém průmyslu	22
3	CÍLE PRÁCE.....	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	Použité kmeny řas, sinic a rostlin	24
4.1.1	Sinice	24
4.1.2	Řasy	24
4.1.3	Rostliny	24
4.1.4	Kvasinka.....	24
4.2	Použité chemikálie a materiál.....	24
4.2.1	Chemikálie použité pro kultivaci řas a sinic	24
4.2.2	Chemikálie použité pro tvorbu extraktů a jejich analýzu.....	24
4.2.3	Chemikálie použité pro výrobu kosmetických produktů	25
4.3	Přístroje a pomůcky	25
4.4	Kultivace.....	25
4.5	Extrakce mikroorganismů nakultivovaných na FCH	26
4.5.1	Extrakce za tmy	26
4.6	Extrakce mikroorganismů komerčně zakoupených.....	27
4.6.1	Extrakce za světla.....	27
4.7	Charakterizace extraktů	27
4.7.1	Celková výtěžnost extraktů	27
4.7.2	Stanovení fenolických látek	27
4.7.3	Stanovení antioxidační aktivity	28
4.7.4	Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou	28
4.7.5	Stanovení obsahu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie	28
4.8	Měření absorpčního spektra extraktů pomocí UV-VIS spektrofotometrie	29
4.8.1	Výpočet SPF.....	29
4.8.2	Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů	29
4.9	Antimikrobiální testy	29
4.9.1	Příprava médií	29
4.9.2	Kultivace mikroorganismů	29
4.10	Dotazník pro rodiče	30
4.11	Optimalizace krémů.....	30
4.11.1	Složení základních emulzí.....	30

4.11.2	Postup přípravy	30
4.12	Příprava emulzí s aktivní složkou.....	31
4.13	Testování vlivu emulzí s extrakty na lidskou pokožku	32
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1	Extrakty z mikrořas kultivovaných na FCH	33
5.1.1	Celková výtěžnost extraktů	33
5.1.2	Absorpční spektrum	33
5.1.3	Fenolické látky	35
5.1.4	Antioxidační aktivita	35
5.1.5	SPF faktor.....	36
5.1.6	Obsah chlorofylů a celkových karotenoidů.....	37
5.2	Extrakty z komerčně zakoupených mikrořas.....	38
5.2.1	Antioxidační aktivita	38
5.2.2	Celková výtěžnost extraktů	40
5.2.3	Absorpční spektrum	41
5.2.4	Fenolické látky	42
5.2.5	Stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou.....	43
5.2.6	SPF faktor.....	44
5.2.7	Obsah chlorofylů a celkových karotenoidů.....	45
5.2.8	Stanovení obsahu mastných kyselin.....	45
5.3	Antimikrobiální testy	47
5.3.1	Antimikrobiální účinek ampicilinu	47
5.4	Dotazník pro rodiče	48
5.5	Výsledky testování vlivu emulzí s extrakty na lidskou pokožku	50
5.5.1	Bezpečnost extraktů	55
6	ZÁVĚR	56
7	BIBLIOGRAFIE	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65
9	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

Fotosyntetizující organismy jsou součástí našeho života a jsou tu už od nepaměti. Sinice hrají důležitou roli na vzniku dnešní kyslíkové atmosféry. Rostliny jsou eukaryotické organismy, které nás obklopují na každém rohu. Dnešní populace sinice a řasy odsuzuje, protože vytváří toxiny a vodní květ, které se pomnožují v přehradách a dalších vodách a vyvolávají u lidí alergické reakce. Malá část populace zná pozitivní vlastnosti těchto mikroorganismů. V dnešní době se mikrořasy a sinice staly perspektivním a udržitelným zdrojem užitečných produktů, díky vysokému obsahu řady bioaktivních metabolitů. Tyto fotoautotrofní mikroorganismy vytvářejí biomasu pomocí fotosyntézy.

Kosmetické produkty pro děti jsou používány po celém světě. V dnešní době existuje široká škála různých produktů, které slouží k péči o tělo. V kosmetice pro děti musí být zajištěna zdravotní nezávadnost.

Spotřebitelé požadují vysokou kvalitu, trvanlivost, a především přírodní charakter produktu, který kupují, nejlépe bez jakýchkoli chemických látek. Tyto požadavky nejsou ale do značné míry splnitelné. Výrobci nejsou schopni zajistit trvanlivost přípravků, bez použití konzervačních látek.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na přípravu kosmetického produktu určeného pro děti s přídavkem extraktu ze sinic a následným testováním připraveného produktu na lidské kůži.

2 TEORIE

Biologicky aktivní sloučeniny pocházejí z různých přírodních organismů, jako jsou zvířata, rostliny, mikroorganismy (řasy, houby, bakterie). Tyto přírodní sloučeniny mají různé biologické aktivity (antibakteriální, antivirové, anthelmintické) [1].

Řasy, stejně jako jiné rostliny, produkují řadu sloučenin, které patří mezi primární i sekundární metabolity. Jako fotosyntetické organismy hrají tyto skupiny klíčovou roli v produktivitě oceánu a tvoří základ mořského potravního řetězce [2].

2.1 Řasy

2.1.1 Obecná charakteristika

Řasy jsou autotrofní organismy, které mají jednobuněčnou nebo mnohobuněčnou stélku [3]. Jsou to organismy, které provádějí kyslíkatou fotosyntézu [4]. Řasy jsou všudypřítomné, jsou důležitými členy oceánského fytoplanktonu, symbionty lišejníků a ploštěnců a obyvatelé téměř jakéhokoli sladkovodního ekosystému od rybníků, řek, jezer a mokřadů [5].

2.1.2 Stavba buňky

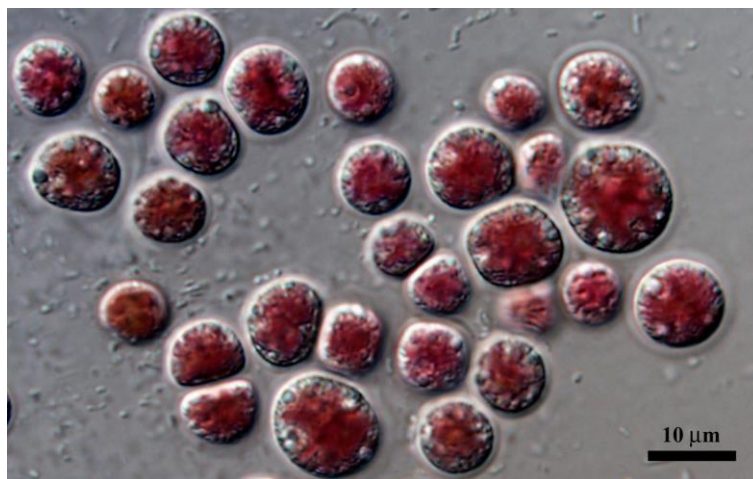
Řasy mohou být jednobuněčné nebo vláknité, což vede k velké rozmanitosti v celé morfologii. Buněčné stěny řas jsou tenké a tuhé, obsahují celulózu s řadou dalších polysacharidů včetně pektinu, xylanů a kyseliny alginové a obklopují je cytoplazmatické membrány. Všechny řasy také obsahují membránově vázané chloroplasty obsahující chlorofyl a, b, c nebo d. Mnoho řas obsahuje také pyrenoidy, které slouží jako místa pro skladování a syntézu škrobu [6].

2.1.3 Výskyt a význam v přírodě a pro člověka

Řasy obsahují chlorofyl a další pigmenty, které zachycují světlo ze Slunce. Tato světelná energie je pak přeměněna na molekuly živin v procesu zvaném fotosyntéza. Většina řas ukládá energii jako nějakou formu sacharidů. Mikroskopické řasy jsou zdrojem velké části zemského kyslíku. Řasy jsou velmi důležité z ekologického hlediska, protože jsou začátkem potravního řetězce pro ostatní živočichy. Fytoplankton, často jednobuněčný typ řasy, je požírán malými živočichy zvanými zooplankton. Větší řasy poskytují úkryt pro ryby a další bezobratlé živočichy [7].

2.1.4 *Porphyridium cruentum*

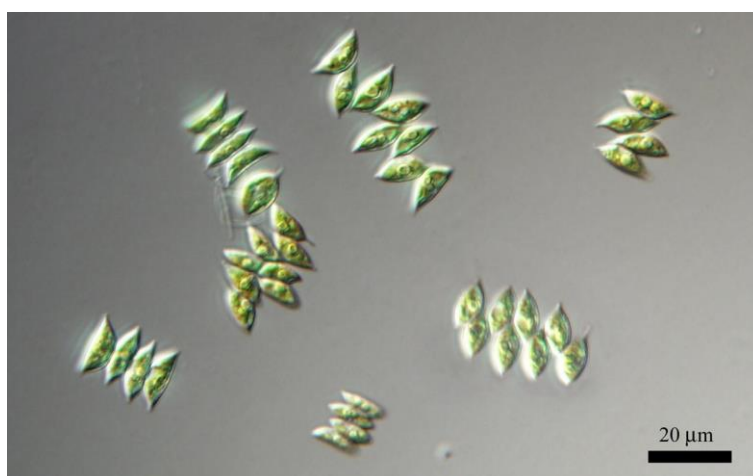
Porphyridium cruentum je jedna z jednobuněčných řas, která žije přirozeně samotářsky nebo v koloniích. Dominantním pigmentem v řase je fykoerythrin a fykocyanin, některé obsahují fykobilin. [8]. Fykobiliny jsou světlosběrné pigmenty, které absorbují zelené až červené vlnové délky světla [9].



Obrázek 1 *Porphyridium cruentum* [10]

2.1.5 *Scenedesmus*

Scenedesmus je sladkovodní řasa žijící v rybnících a jezerech po celém světě ve všech klimatických podmínkách. Snáší mírnou kyselost, ale pouze nízkou slanost a vhodná teplota pro růst je 28-30 °C. Používá se jako biologický nástroj pro fyziologické experimenty a problémy se znečištěním. V poslední době je jednou z řas využívaných k výrobě biopaliva [11].



Obrázek 2 *Scenedesmus acutus* [10]

2.1.6 *Palmaria palmata*

Palmaria palmata je jedna z nejběžnějších řas na skalnatých pobřežích na severní polokouli. Používá se v lidské výživě hlavně v Irsku. Obsahuje až 35 % bílkovin a je bohatým zdrojem vitamínů. Je identifikována jako jeden ze tří druhů červených řas s nejlepším potenciálem pro pěstování [12].



Obrázek 3 *Palmaria palmata* [13]

2.1.7 *Ascophyllum nodosum*

Ascophyllum nodosum je velká a hnědá řasa. Listy jsou olivově hnědé. Je to běžný druh na okraji severního Atlantského oceánu. Listy mohou dosahovat až 2 m (extrémně 5 – 7 m). Tato mořská řasa je dlouhověká. Tento druh se používá k použití v produktech, jako jsou potraviny, hnojiva, krmiva pro zvířata [14].



Obrázek 4 *Ascophyllum nodosum* [15]

2.2 Sinice

2.2.1 Obecná charakteristika

Sinice jsou autotrofní mikroorganismy. Vyskytují se v různých prostředích včetně vody (sladká, mořská), suchozemského prostředí (půda, pouště, ledovce) a symbióz (s rostlinami,

lišejníky a zvířaty) [16]. Stélka sinic může být jednobuněčná, ale častěji bývá seskupeno větší množství buněk do vláken nebo seskupen do nepravidelných kolonií [17].

2.2.2 Stavba buňky

Jednou z hlavních předností buněčných funkcí je strukturovaná a koordinovaná vnitřní organizace. Sinice jsou prokaryota, která jsou schopna provádět oxýgenní fotosyntézu. Na základě přítomnosti vnější membrány jsou sinice obecně považovány za gramnegativní bakterie. Mezi vnitřní a vnější membránou mají neobvykle silnou peptidoglykanovou vrstvu [18].

2.2.3 Výskyt a význam v přírodě a pro člověka

Životní procesy sinic vyžadují pouze vodu, oxid uhličitý, anorganické látky a světlo. Fotosyntéza je jejich hlavní způsob energetického metabolismu. V přirozeném prostředí je však známo, že některé druhy jsou schopny přežít i dlouhá období ve tmě. Kromě toho některé sinice vykazují výraznou schopnost heterotrofní výživy. Mnoho druhů je schopno žít v půdě, kde jsou důležité ve funkčních procesech ekosystému a koloběhu živin [19].

2.2.4 Rod *Nostoc*

Nostoc je rod sinic, který se přirozeně vyskytuje ve sladkovodních fytoplanktonových společenstvech, ale obvykle není spojován s toxickými květy planktonu. Častěji je spojován s bentickým prostředím, kde může tvořit kolonie na vlhkých půdách. Některé druhy *Nostoc* jsou vysoce odolné vůči suchu a teple [19].



Obrázek 5 *Nostoc* CCALA 123 [10]

2.2.5 Rod *Anabaena*

Anabaena je členem cyanobakterií, což jsou gramnegativní bakterie, které provádějí fotosyntézu a jsou hlavní složkou v globálním cyklování uhlíku, dusíku a kyslíku. Rostou vláknitým způsobem [20].



Obrázek 6 *Anabaena torulosa* [10]

2.2.6 *Scytonema*

Scytonema je rod sinic, které provádějí oxygenní fotosyntézu. Tvoří vlákna, která jsou obklopená slizovitým obalem [21]. Je převážně vzdušná nebo subaerická na alkalických substrátech, vlhkých horninách, dřevě a půdě. *Scytonema* je variabilní rod s více než 100 známými popsány druhy, z nichž mnohé jsou známy pouze v tropických oblastech [22].



Obrázek 7 *Scytonema* CCALA 170 [10]

2.2.7 *Chroococcidiopsis*

Chroococcidiopsis je velmi primitivní fotosyntetická a přizpůsobivá sinice, která je přítomná po celém světě. Žije v široké škále extrémních prostředí, např. vyprahlé, mokré a studené pouště, hypersolné laguny, rybníky a termální prameny. Je známa svojí odolností vůči vysychání a schopností přežít při nedostatku živin a světla [23].



Obrázek 8 *Chroococcidiopsis* CCALA 45 [10]

2.2.8 *Spirulina*

Spirulina je planktonní sinice, které tvoří masivní populace v tropických útvarech a subtropických vodních útvarech vyznačujících se vysokým obsahem uhličitane a hydrogenuhličitane a vysokým pH [24].

Obsah látek v sinici *Spirulina*:

- vitamín B (zejména vitamín B12)
- provitamín A (beta-karoten)
- železo
- bílkoviny 50 – 70 %
 - obsahují všechny esenciální aminokyseliny a některé i neesenciální
- 5 – 10 % lipidů
- 10 – 20 % sacharidů [25]



Obrázek 9 Komerční vzorky *Spirulina*

2.3 *Centella asiatica*

Centella asiatica je tropická léčivá rostlina pocházející ze zemí jihovýchodní Asie. Pochází z teplejších oblastí. Tato rostlina roste divoce na vlhkých, stinných místech a lze ji běžně vidět podél břehů řek, potoků, rybníků a zavlažovaných polí, Roste také podél kamenných zdí nebo jiných skalnatých oblastí [26].



Obrázek 10 *Centella asiatica* [27]

2.4 *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula je rod eukaryotických mikroorganismů, konkrétně kvasinek, který se široce vyskytuje u zvířat, rostlin, řek, jezer a oceánů. Buňky má bohaté na živiny, jako jsou karotenoidy, proteiny a polysacharidy, ale obsahují také aminokyseliny, polynenasycené mastné kyseliny, vitamín E. *Rhodotorula mucilaginosa* je dominantním druhem v pobřežních vodách [28].

2.5 Růst a vývoj mikroorganismů

Vývoj mikroorganismů je závislý na vnějším prostředí, musí v něm být dostatečné množství surovin, využívaných k syntéze buněčné hmoty a dostatečné množství zdroje využitelné energie. Mikroorganismy mají i schopnost přizpůsobovat se vnějším podmínkám, buď změnou enzymového vybavení buněk, nebo mohou i do určité míry změnit i složení a tvar buněk [29].

2.5.1 Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy

Na růst a vývoj organismů má vliv zejména teplota, pH prostředí, vodní aktivita.

- **Teplota**

Teplota je jeden z hlavních faktorů pro rychlost rozmnožování mikroorganismů. Existují tři základní teploty:

- Minimální: nejnižší teplota, při které se určitý mikroorganismus rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí
- Optimální: při této teplotě se daný mikroorganismus rozmnožuje největší rychlostí
- Maximální: nejvyšší teplota, při které je mikroorganismus ještě schopen se rozmnožovat [11].

- **pH prostředí**

Růst mikroorganismů je ovlivněn koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý druh mikroorganismů se může rozmnožovat v určitém rozmezí pH [29].

- **Vodní aktivita**

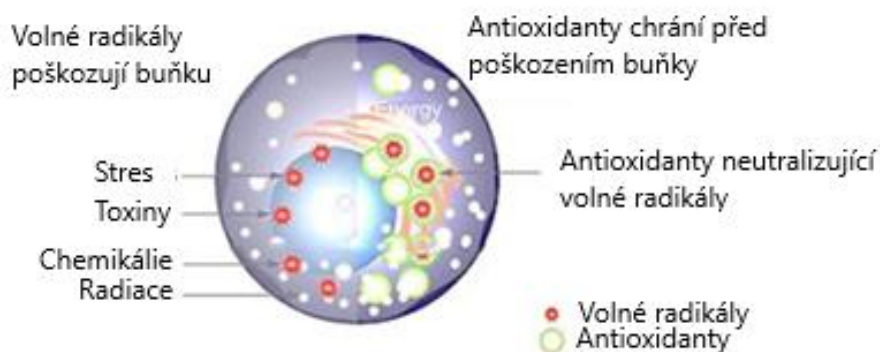
Voda je nezbytnou součástí buněčné hmoty, představuje 75 až 90 % hmotnosti mikrobiálních těl. Všechny chemické reakce, které probíhají v živé buňce, probíhají pouze ve vodném prostředí [29].

2.6 Aktivní látky sinic a mikrořas

Řasy a sinice obsahují řadu biologicky aktivních látek, jako jsou karotenoidy, MAA a scytonemin [30]. Mikrořasy a sinice byly identifikovány jako bohatý zdroj biologicky aktivních sloučenin s antivirovými, antibakteriálními, protiplísňovými a protirakovinnými účinky [31]. Mikrořasy obsahují vitamíny, jako je vitamín C, který může zabránit usazování melaninu a bělit pokožku. Vitamín E může opravit kožní bariéru, a dokonce léčit některá kožní onemocnění [32].

2.7 Antioxidační látky

Antioxidant je substrát, který zabraňuje oxidaci molekul uvnitř buňky. Jde o známý chemický proces, který umožňuje odstranění elektronů nebo vodíku z látky. Během oxidační reakce vznikají volné radikály. Protože jsou radikály reaktivní, tak spouští řetězovou reakci. To může vést k poškození či úplnému usmrcení buňky. Antioxidační činidla jsou schopna ukončit řetězovou reakci eliminací volných radikálových meziproduktů (viz Obrázek 11). Antioxidanty lze považovat za redukční činidla, protože samy sebe oxidují. Příklad antioxidační látky jsou kyselina askorbová, thioly nebo polyfenoly [31].



Obrázek 11 Oxidační reakce v buňce [31]

Antioxidační látky lze rozdělit do několika skupin:

- Inhibitory oxidačních reakcí radikálů (preventivní antioxidanty), které inhibují tvorbu volných lipidových radikálů
- Inhibitory přerušující šíření autooxidační řetězové reakce (řádné antioxidanty)
- Zhášeci singletového kyslíku
- Synergisté vlastních antioxidantů
- Redukční činidla, které přeměňují hydroperoxidy na stabilní složky neradikálovým způsobem
- Chelátory kovů, které přeměňují kovové prooxidanty
- Inhibitory pro-oxidačních enzymů [33]

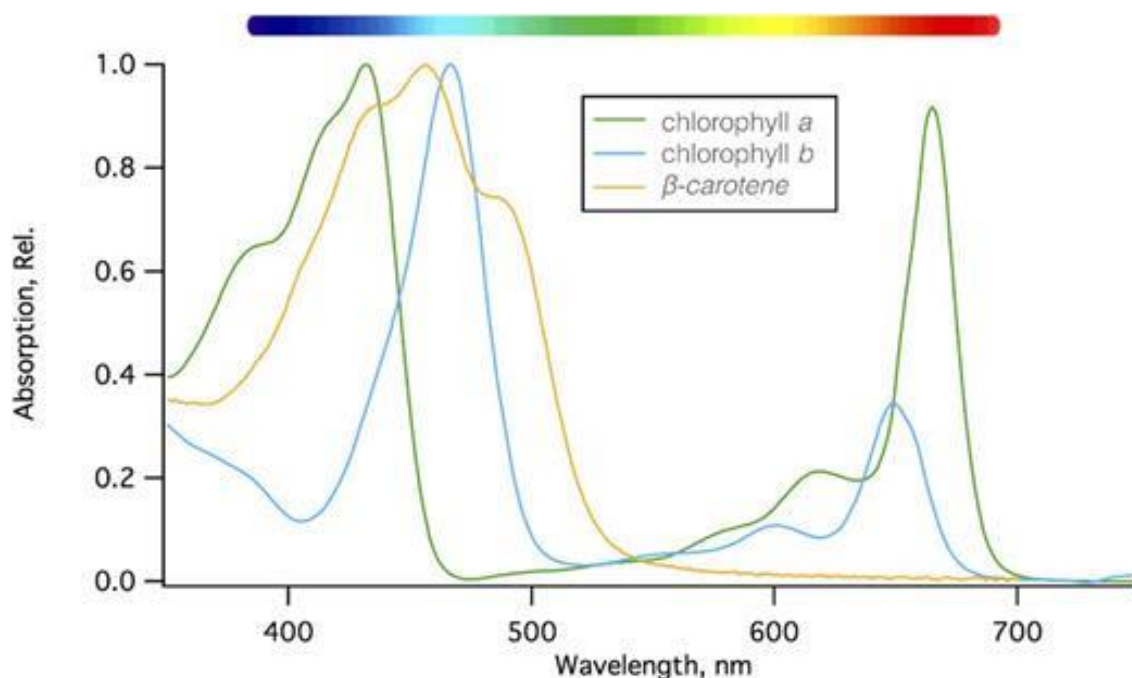
2.7.1 Fenolické látky

Fenolové sloučeniny jsou široce rozšířeny v rostlinné říši a tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin sekundárních metabolitů rostlin. Z chemického hlediska mají alespoň jeden aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin a lze je klasifikovat jako jednoduché fenoly a polyfenoly v závislosti na počtu fenolových jednotek v molekule. Z biologického hlediska jim byla přiřazena řada aktivit, z nichž nejvýznamnější je antioxidační aktivita. Tato aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin a povaze substitucí na aromatických kruzích. Další biologické aktivity jsou antikarcinogenní, antimutagenní a protizánětlivé [34].

2.7.2 Vlastnosti pigmentových barviv

Barva je jedním z prvků přírody. Barviva a pigmenty jsou barevné, protože absorbují pouze určitou vlnovou délku viditelného světla. Jejich struktury mají arylové kruhy, které mají delokalizované elektronové systémy. Tyto struktury jsou zodpovědné za absorpci elektromagnetického záření [35].

Chlorofyly absorbují modré a červené světlo, a tak se jeví jako zelené, zatímco karotenoidy absorbují pouze světlo v modré barvě, a tak se jeví žluto-červeně (viz Obrázek 12). Barvy jsou zřetelnější na podzim, protože chlorofyl je první pigment, který se rozkládá [36].



Obrázek 12 Absorpční spektra pigmentů [36]

2.7.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou třídou přirozeně se vyskytujících pigmentů syntetizovaných rostlinami, řasami a fotosyntetickými bakteriemi. Tyto bohatě zbarvené molekuly jsou zdrojem žluté, oranžové a červené barvy mnoha rostlin. V rostlinách mají karotenoidy důležitou funkci zhášení singletového kyslíku, oxidantu vznikajícího během fotosyntézy [37]. Mnoho sinic obsahuje β -karoten, zeaxanthin, echinenon a myxoxantofyl [38].

2.7.3.1 β -karoten

β -karoten je oranžovo-žlutá sloučenina rozpustná v tucích, kterou lze extrahovat z mikrořas. Jde o přirozeně se vyskytující prekurzor retinolu (vitamin A) s potenciálními protinádorovými a chemopreventivními účinky. β -karoten hraje důležitou roli v imunitní regulaci. Lidské tělo přeměňuje β -karoten na vitamin A, který je nezbytný pro těhotné ženy a děti [39].

2.7.3.2 Další karotenoidy

Zeaxanthin

Zeaxanthin je jedním z nejběžnějších karotenoidů vyskytujících se v přírodě. Je to pigment, který dává mnoha rostlinám jejich charakteristickou barvu. Patří mezi antioxidanty a tato vlastnost přispívá k jeho příznivým účinkům [40].

Echinenon

Echinenon se používá jako oranžový pigment, antioxidant a provitamin A [41].

Myxoxantofyl

Myxoxantofyl je glykosylovaný monocyklický karotenoid, který se přirozeně vyskytuje v sinicích, ale dosud nebyl vyvinut žádný izolační proces, který by jej získal z jeho přirozeného zdroje [42].

2.7.4 Chlorofyly

Chlorofyl je pigment, který lze nalézt ve vnitřní části chloroplastu. Mezi jeho funkce patří sběr světla, přenos energie, fotochemická redoxní reakce a také fotoprotekce. Je nekovalentně vázaný na protein za superkomplexu pigment-protein. Fotofyzikální vlastnosti a funkce chlorofylu spočívají v jeho chemické struktuře. Chlorofyly jsou definovány jako cyklické tetrapyrroly nesoucí charakteristický isocyklický pětičlenný kruh [43].

2.8 Toxicita

Chemická toxicita je pro lidské zdraví velmi nebezpečná, protože po delším užívání může způsobit několik typů závažných onemocnění. Cesta do těla může být potravou, vodou nebo vzduchem [44].

Mikrobiální toxiny jsou toxiny produkované mikroorganismy, včetně bakterií, hub a virů. Jsou důležitými determinanty virulence odpovědnými za mikrobiální patogenitu. Mikroorganismy tvoří samostatnou taxonomickou skupinu, protože jsou definovány jako příliš malé na to, aby je bylo možné vidět pouhým okem. Nejběžnějším způsobem, jak studovat účinky toxických materiálů na mikroorganismy, je sledování inhibice růstu životaschopných buněk na agarovém médiu [45].

2.8.1 Cytotoxicita látek, používaných v kosmetických přípravcích

Toxicita methylalkoholu je závislá na čase a koncentraci a jeho toxický účinek je inhibován ethylalkoholem. Kvůli zmírňujícím účinkům ethylalkoholu se dospělo k závěru, že methylalkohol je bezpečný při použití k denaturaci ethylalkoholu používaného v kosmetických přípravcích [46].

V kosmetických přípravcích je zakázáno používat chemické látky-nebezpečné pro zdraví, tedy ty, které jsou toxické, žíravé, karcinogenní nebo mutagenní. Seznam látek, které nesmí v kosmetických přípravcích být, zahrnuje např. efedrin, antibiotika, kyselinu boritou, chloroform a další [47].

2.9 SPF faktor

SPF faktor je ochranný sluneční faktor, který je definován jako UV energie potřebná k vytvoření minimální dávky erytému (MED) na chráněné kůži v poměru k UV energii nutné k vytvoření MED na nechráněné kůži. Minimální erytemová dávka je definována jako nejnižší časový interval nebo dávka ozáření UV světlem dostatečná k vytvoření minimálního erytému nechráněné kůže [48].

Čím vyšší SPF, tím účinnější je produkt v prevenci spálení sluncem. Metody in vitro pro stanovení SPF zahrnují měření absorpance. Mansur a kol. (1986) vyvinul velmi jednoduchý matematický model rovnice [48].

2.10 UV záření

Sluneční UV záření je nejenergičtějším zářením, které je schopno proniknout atmosférou a dosáhnout zemského povrchu [49]. UV záření může inhibovat fotosyntézu ničením listů rostlin, což následně ovlivňuje celý ekosystém. Ultrafialové záření se vyskytuje ve vlnových délkách od 100 nm do 400 nm a je rozděleno do tří oblastí: [50]

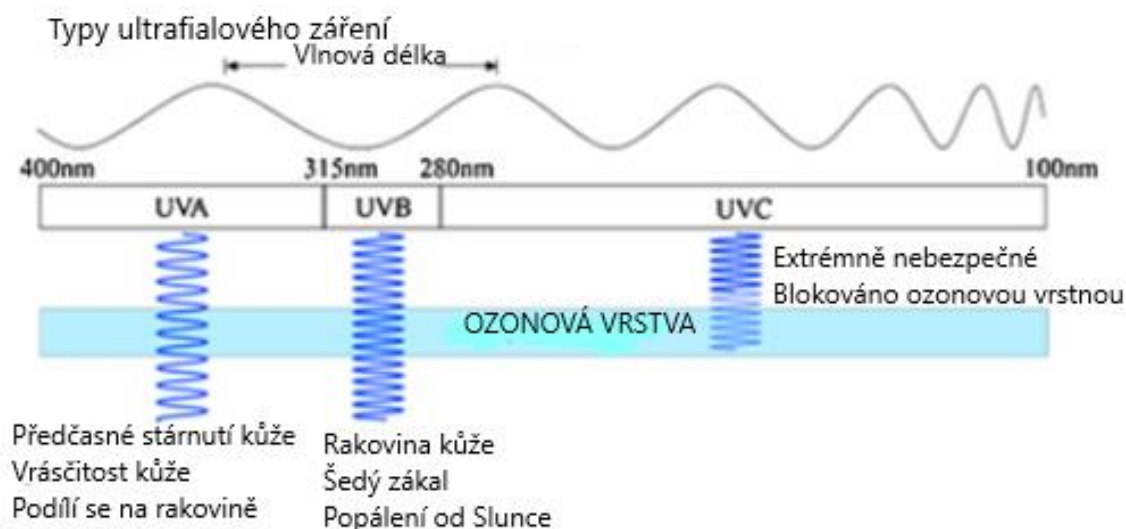
- UVA (315 – 400 nm): Proniká hlouběji do dermis. Poškozuje DNA nepřímo tvorbou volných radikálů a oxidativním poškozením.
- UVB (280 – 315 nm): Je z velké části absorbováno epidermis. Způsobuje přímé poškození DNA s charakteristickými mutacemi, které předurčují k rakovině kůže.
- UVC (100 – 280 nm): Je absorbováno před dosažením zemského povrchu.

Sluneční záření dopadající na zemský povrch je tvořeno převážně:

UVA – 90 %

UVB – 10 %

Zemskou atmosférou proniká méně než 2,5 % slunečního [51].



Obrázek 13 Schéma vlnových délek různých záření [51]

2.11 Kosmetika

2.11.1 Dětská kosmetika

Dětská kůže se od dospělé liší funkčně i morfologicky. Díky těmto odlišnostem vyžaduje vyšší péči a ohleduplnost. Při výběru kosmetiky pro děti je třeba dbát na to, aby kosmetické produkty zachovávaly vlhkost kůže, dovozovaly volné dýchání kůže, měly protizánětlivé účinky a neobsahovaly složky, které by mohly způsobovat alergie.

Tloušťka dětské kůže je poloviční než u dospělého člověka. Rohová vrstva pokožky je velmi tenká, kolagenní vlákna jsou tenčí než u kůže dospělého člověka a elastická vlákna nejsou v raném dětství téměř vůbec vyvinuta [52].

2.11.2 Krém

Krémy mají za úkol zvláčňovat a zjemňovat kůži. Na jejím povrchu tvoří ochrannou vrstvu. Mívají konzistenci jemné masti, ale především se jedná o tzv. tuhé emulze. Jejich součástí bývá tuk rostlinného, živočišného nebo minerálního původu [53].

Krémy na pleť jsou směsí s vodou. Pokud je obsah vody ve směsi vysoký, jedná se o tělové mléko [54].

2.12 Přírodní zdroje aktivních látek v kosmetickém průmyslu

Řasy, sinice a rostliny vytvářejí aktivní látky, které mohou být zajímavé pro kosmetický průmysl. Aktivní složky extrahované z určitých mikrořas se v současnosti využívají v kosmetických přípravcích. Význam aktivních složek pocházejících z mikrořas je v tom, že mohou být použity k prevenci skvrn, opravě poškozené pokožky nebo inhibovat zánětlivý proces. Výtažky z mikrořas mají navíc různé bioaktivní látky, které urychlují proces hojení a udržují vlhkost pokožky [55]. Mezi hlavní bioaktivní složky z mikrořas patří karotenoidy, lykopen, astanxanthin, fykobiliproteiny, antioxidanty, polysacharidy, glycerol, lektiny, glykoproteiny a nemrznoucí proteiny [56]. Podle některých výzkumných zpráv je známo, že produkty z řas a sinic jsou vhodné pro použití do kosmetických přípravků z toho důvodu, že jsou široce používány k léčbě různých kožních problémů, působí jako zvlhčovač, zlepšují texturu a jsou účinnými složkami opalovacích krémů [57].

3 CÍLE PRÁCE

V rámci této bakalářské práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- rešerše – přírodní producenti látek s antimikrobiálním účinkem, antioxidantů a vitaminů (přehled)
- příprava extraktů z vybraných kvasinek, řas a rostlin
- charakterizace hlavních obsahových složek extraktů
- stanovení biologických účinků a bezpečnosti připravených extraktů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité kmeny řas, sinic a rostlin

4.1.1 Sinice

- *Chroococcidiopsis* cf. CCALA 45
- *Nostoc* cf. CCALA 123
- *Scytonema* cf. CCALA 170
- *Anabaena torulosa* CCALA 003
- Komerční *Spirulina vitalvibe* (Čína)
- Komerční *Bio Spirulina* (Čína)
- Komerční *Spirulina Ekokoza* (Česká republika)
- Komerční *Algae Spirulina* (Španělsko)

4.1.2 Řasy

- *Scenedesmus acutus* CCALA 904
- *Porphyridium cruentum*
- Komerční *Palmaria palmata* (Francie)
- Komerční *Ascophyllum nodosum* (Česká republika)

4.1.3 Rostliny

- Komerční *Centella* (Francie)
- *Heřmánek*
- *Mateřídouška*
- *Levandule*
- *Kopřiva*
- *Olivový list*

4.1.4 Kvasinka

- *Rhodotorula mucilaginosa*

4.2 Použité chemikálie a materiál

4.2.1 Chemikálie použité pro kultivaci řas a sinic

- Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)
- Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (CZE)
- Chlorid draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)
- Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)
- Uhličitan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)

4.2.2 Chemikálie použité pro tvorbu extraktů a jejich analýzu

- ABTS HPLC ≥ 98 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ethanol, 96 % p.a., Penta (ČR)
- Ethanol 96 % pro UV–VIS, Penta (ČR)

- Folin–Ciocalteuovo činidlo p.a., Penta (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., Lach–Ner (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma Aldrich (Německo)
- Methanol p.a., Penta (ČR)
- Trolox, Sigma Aldrich (Německo)

4.2.3 Chemikálie použité pro výrobu kosmetických produktů

- Dimetikon 350 cs, Míča a Harašta s.r.o. (CZE)
- Ercawax MB1, Míča a Harašta s.r.o. (CZE)
- Parařinový olej, Míča a Harašta s.r.o. (CZE)
- Vazelina bílá, Míča a Harašta s.r.o. (CZE)

4.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy GH–202, A&D Europe (Německo)
- Automatický vortex, Vortex genie 2, Scientific industries (USA)
- Box ochranný laminární, Airstream ESCO Class II BSC (Německo)
- CellCulture CO2 Inkubátor, ESCO (Německo)
- Centrifuga U–32R, BOECO (Německo)
- Centrifuga Z 36 HK, Hermle Labortechnik (Německo)
- ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (Německo)
- GC/FID sestava:
 - Sestava GC, ThermoQuest S.p.A. (ITA)
 - Detektor FID
 - Kapilární kolona DB-wax o rozměrech: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)
- Lyofilizátor, Labconco (USA)
- Míchačka IKA RW 11 basic, IKA WERKE (Německo)
- Nanodrop Spektrofotometr N50, Implen (Německo)
- NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH (Německo)
- Sušárna inkubátor INB 400, Memmert (Německo)
- Třepačka, Heidolph unimax 1010, Heidolph instruments (Německo)
- Ultrazvuk PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SVK)
- Váhy AND HL-200i, A & D Company, Japonsko (CHN)
- Vakuová rotační odparka RV 06 ML, IKA (Německo)
- Visioscope PC 35 (Německo)
- Vodní lázeň GFL 1032, Gesellschaft für Labortechnik (Německo)
- Vortex REax Top, Heidolph (Německo)

4.4 Kultivace

Pro kultivaci mikrořas a sinic byla použita média dle doporučení dodavatele viz Tabulka 1. Nejprve byly kmeny zaočkovány do Erlenmayerových baněk. Pro produkci biomasy na další extrakce byly kmeny přeočkovány do reakčních lahví typu Simax o objemu 0,5 l. Láhve byly po celou dobu experimentu provzdušňovány. Jako zdroj světla sloužila lampa.

Tabulka 1 Složení media Z [10]

Chemikálie	Zásobní roztok [g.l ⁻¹ dH ₂ O]	V na 1 litr [ml]
NaNO ₃	46,7	10
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5,9	10
K ₂ HPO ₄	3,1	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5	10
Na ₂ CO ₃	2,1	10
Fe-EDTA sol.		0,2
Trace metal sol.		0,08

Složení Fe-EDTA roztoku a Trace metal roztoku jsou uvedeny v Příloha 1 [10].

Tabulka 2 Složení Porphyrinium media [10]

Roztok č. 1		Roztok č. 2		Roztok č. 3	
Látka	m [g] do 1 l	Látka	m [g] do 250 ml	Látka	m [mg] do 1 l
KCl	4,00	Fe-EDTA	4,60	H ₃ BO ₃	3,09
NaCl	3,13			MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,20
KNO ₃	1,24			CoSO ₅ ·7H ₂ O	1,40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,50			CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,24
K ₂ HPO ₄	0,66			ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,43
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,17			(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,84
KI	0,05				
KBr	0,05				

4.5 Extrakce mikroorganismů nakultivovaných na FCH

4.5.1 Extrakce za tmy

Do plastových zkumavek bylo naváženo určité množství vzorku a vzorek byl zalit určitým množstvím 30% ethanolu (na 100 mg vzorku 10 ml rozpouštědla) nebo methanol:ethylacetátu (1:1). Tato suspenze byla ponechána ve tmě při 7°C 24 hodin. Po uplynutí této doby byly zkumavky zcentrifugovány při 6 000 otáčkách 5 minut. Supernatant byl odpipetován do jiných čistých plastových zkumavek.

Tyto extrakce byly provedeny u:

- *Chroococcidiopsis cf. CCALA 45*
- *Nostoc cf. CCALA 123*
- *Scytonema cf. CCALA 170*

- *Anabaena torulosa* CCALA 003
- *Scenedesmus acutus* CCALA 904
- *Rhodotorula mucilaginosa*

4.6 Extrakce mikroorganismů komerčně zakoupených

4.6.1 Extrakce za světla

Vzorky *Spirulina* byly odváženy na čistých plastových zkumavek a byly zality určitým objemem destilované vody, 60% a 96% ethanolu a methanol:ethylacetátem (1:1). Tato suspenze byla ponechána na třepačce při 37 °C 24 hodin. Po uplynutí této doby byly zkumavky zcentrifugovány při 6 000 otáčkách 5 minut. Supernatant byl odpipetován do jiných čistých plastových zkumavek.

Tyto extrakce byly provedeny u:

- *Spirulina* Vitalvibe (Čína)
- Bio *Spirulina* (Čína)
- *Spirulina* Ekokoza (Česká republika)
- *Algae Spirulina* (Španělsko)
- *Palmaria palmata* (Francie)
- *Ascophyllum nodosum* (Česká republika)
- *Centella* (Francie)

4.7 Charakterizace extraktů

4.7.1 Celková výtěžnost extraktů

Pro zjištění celkové výtěžnosti extraktů ze sinic bylo odpipetováno přesné množství do zvážených zkumavek typu Eppendorf. Zkumavky s extrakty byly umístěny do digestoře a v ní byly ponechány odpařit ve tmě. Po odpaření byly zkumavky znovu zváženy a byla zjištěna hmotnost a z ní vypočtena celková hmotnostní koncentrace všech látek.

4.7.2 Stanovení fenolických látek

K 10 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného vodou v poměru 1:9 byl přidán 1 ml vody a 50 µl vzorku. Vzorek byl promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃ a vzorek byl opět promíchán na vortexu a ponechán stát 15 minut. Po uplynutí této doby byla měřena absorbance vzorku při 750 nm. Jako blank byl použit stejný postup, jen místo vzorku bylo přidáno 50 µl destilované vody. Koncentrace fenolických látek byla stanovena pomocí kalibrační křivky kyseliny gallové v koncentračním rozmezí 0,107 – 0,752 mg/ml.

$$A = 1,775 \cdot c \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9955 \quad (2)$$

4.7.3 Stanovení antioxidační aktivity

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

$$A = 1,4553 \cdot c \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9936 \quad (2)$$

4.7.4 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Byla připravena činidla

- A: 0,5 g vanin sodno-drasený $\cdot 4 H_2O$, 25 g Na_2CO_3 , 125 ml 1 M NaOH, 250 ml destilované vody
- B: 1 g vanin sodno-drasený $\cdot 4 H_2O$, 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 5 ml 1M NaOH, 45 ml destilované vody
- C: 1 objem Folin-Ciocalteuova činidla a 15 objemů destilované vody

K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,9 ml činidla A. Roztok byl inkubován 10 minut ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po uplynutí této doby byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml činidla B. Roztok byl protřepán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 3 ml činidla C a inkubován 10 minut ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po skončení inkubace byl roztok ochlazen a byla změřena absorbance při 650 nm. Celková koncentrace proteinů ve vzorcích byla vypočtena z kalibrační křivky albuminu v koncentračním rozmezí 39,43 – 98,57 μ g/ml.

$$A = 0,003 \cdot c \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9955 \quad (2)$$

4.7.5 Stanovení obsahu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

Do 2 ml skleněné vialky bylo naváženo 10 ± 2 mg lyofilizované biomasy a přidáno 1,8 ml rozpouštědla (15% H_2SO_4 v methanolu; 0,5 mg/ml C17 jako interní standard) a vzorek byl inkubován 2 hodiny při 85 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti byl celý objem lahvičky přenesen do 4 ml s přidavkem 0,5 ml 0,005 M NaOH a 1 ml hexanu. Směs byla vortexována po dobu 5 minut a po oddělení fází bylo 0,1 ml horní vrstvy hexanového extraktu odpipetováno k 0,9 ml hexanu do čistých zkumavek pro GC.

4.8 Měření absorpčního spektra extraktů pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Vzorky byly zředěny na požadovanou koncentraci a bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu 200 – 800 nm.

4.8.1 Výpočet SPF

Pro výpočet SPF bylo využito metody uvedené v bodě 2.9. Byly použity hodnoty absorbance vzorků v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Tyto hodnoty byly následně dosazeny do rovnice uvedené v bodě 2.11 a byl vypočten SPF.

4.8.2 Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů

Každý extrakt byl studován pomocí spektrofotometru Nanophotometer IMPLEN a vzorky byly umístěny do křemenné kyvety a proměřeno absorpční spektrum v rozsahu 400–700 nm. Měření byla provedena třikrát. Na základě absorpčních spekter byl stanoven obsah chlorofylu a, b a obsah a celkový obsah karotenoidů podle metody popsané Wellburnem (1994). Obsah pigmentů byl vyjádřen jako µg na ml extraktu a byl vypočítán pomocí následujících rovnic [23].

$$\text{Chlorofyl } a = (11,75 \cdot A_{662}) - (2,53 \cdot A_{645}) \quad (1)$$

$$\text{Chlorofyl } b = (18,61 \cdot A_{645}) - (3,96 \cdot A_{662}) \quad (2)$$

$$\text{Karotenoidy} = ((1000 \cdot A_{470}) - (2,27 \cdot ch_a) - (81,4 \cdot ch_b))/227 \quad (3)$$

4.9 Antimikrobiální testy

4.9.1 Příprava médií

Bylo připravené tekuté médium o složení, které je uvedeno v tabulce. Potřebné množství média bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody a sterilováno v tlakovém hrnci 45 minut při teplotě 120 °C.

Tabulka 3 Použité látky pro přípravu tekutých médií

Mikroorganismus	Médium
<i>Escherichia coli</i>	Lysogeny Broth – 25 mg/l

4.9.2 Kultivace mikroorganismů

Připravené tekuté médium bylo ochlazené na laboratorní teplotu, poté bylo sterilně přelito do Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml. Do baňky s médiem byl naočkován mikroorganismus, který byl uchován v kryozkumavce. Takto připravená baňka byla ponechána na třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.9.2.1 Bujónová mikrodiluční metoda

Testování probíhalo pomocí mikrotitrační destičky, která měla 96 jamek. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl tekutého živného média, koncentrační řady látek po 50 µl. Na závěr byla přidána kultura mikroorganismu o objemu 50 µl. Kontrola média byla provedena napipetováním 200 µl média. Pro kontrolu vzorků bylo napipetováno 100 µl média a 33 µl

vzorku. Jamky s obsahem 100 µl sterilovaného média a 50 µl naředěné kultury byly použity jako kontrola mikroorganismů. Poté probíhala kultivace na třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin. Měření absorbance v čase 0 a po 24 hodinách na přístroji Synergy HTX Multi-Mode Reader byla sledována antimikrobiální aktivita.

4.10 Dotazník pro rodiče

Před samotnou přípravou krémů byl vytvořen dotazník pro rodiče. Celkem se zúčastnilo 15 respondentů z řad žen i mužů. Cílem dotazníku bylo zjistit, jaké produkty rodiče pro své děti nakupují nejčastěji a jakou mají nejraději konzistenci. Dotazník je uveden v Příloha 2.

4.11 Optimalizace krémů

4.11.1 Složení základních emulzí

Cílem přípravy emulzí o/v bylo vytvoření homogenní směsi, emulze o/v byly připravovány za laboratorní teploty. Byly připravovány emulze o objemu 50 ml. Složení připravovaných emulzí je uvedeno viz Tabulka 4.

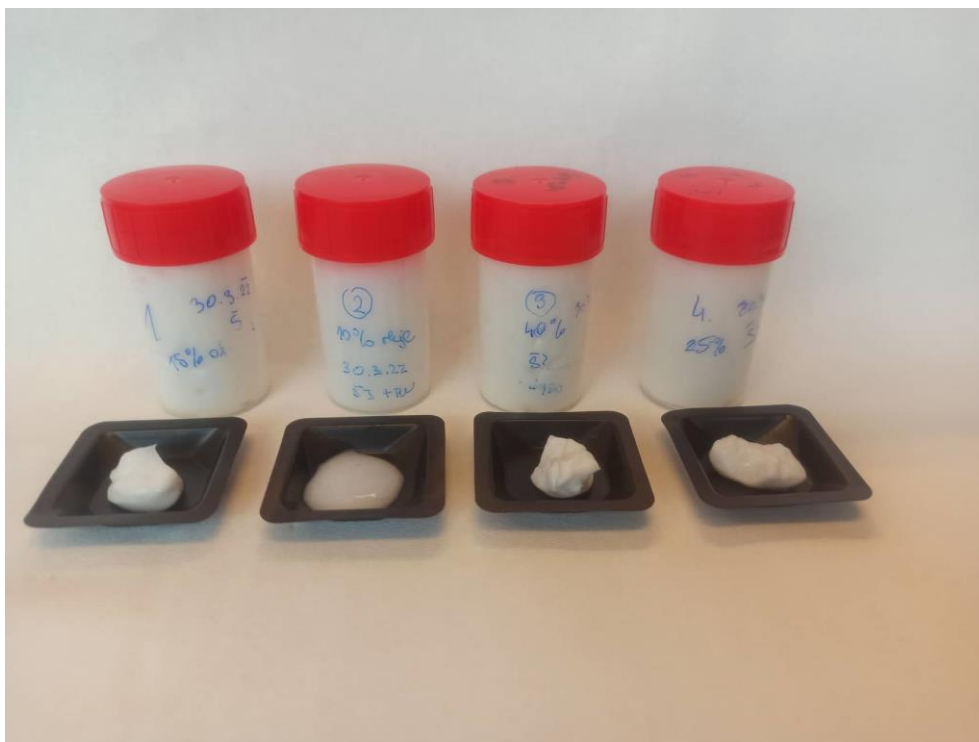
Tabulka 4 Složení emulze o/v při optimalizaci krémů

	1. recept	2. recept
Olejová fáze	Emulsun	Cetearyl alkohol
	Cetearyl alkohol	Parafinový olej
	Slunečnicový olej	Erkamuls
		Dimethicon
		Bílá vazelína
Vodná fáze	Destilovaná voda	Destilovaná voda
	Glycerin 100%	Glycerin 100%

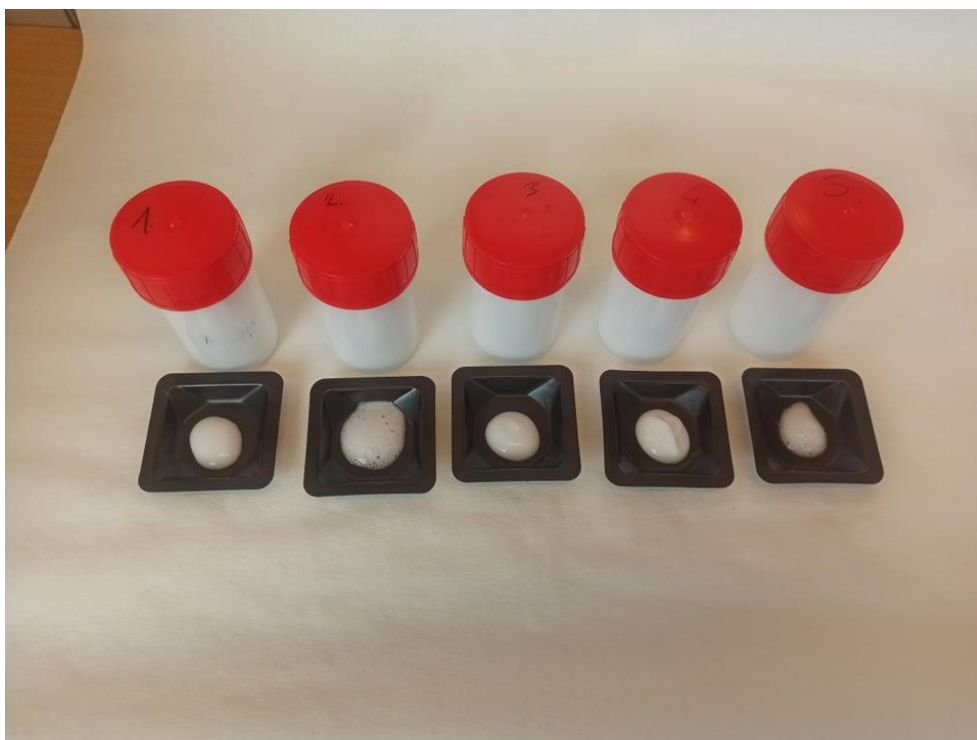
První recept byl připravován s 10, 15, 25 a 40% obsahem slunečnicového oleje. Recept druhý byl připravován s 2, 4, 7 a 9% obsahem.

4.11.2 Postup přípravy

- V kádince o objemu 50 ml byla připravena olejová fáze, do které bylo odváženo předepsané množství emulgátoru Emulsunu, cetearyl alkoholu a slunečnicového oleje. Olejová fáze byla umístěna do vodní lázně, která byla rozehrátá na 80°C. Fáze byla zahřívána postupně do úplně homogenizace.
- V druhé kádince o objemu 100 ml byla připravena vodní fáze, do které bylo odváženo předepsané množství destilované vody a byl do ní přidán glycerin. Vodní fáze byla také vložena do vodní lázně, rozehrátá na 80°C.
- Po úplné homogenizaci bylo do kádinky s vodní lázní umístěno vysokorychlostní míchadlo. Postupně do ní byla vmíchávána tekutá olejová fáze. Emulze byla promíchávána do zchladnutí.



Obrázek 14 Emulze o/v s Emulsunem



Obrázek 15 Emulze o/v s parafínovým olejem

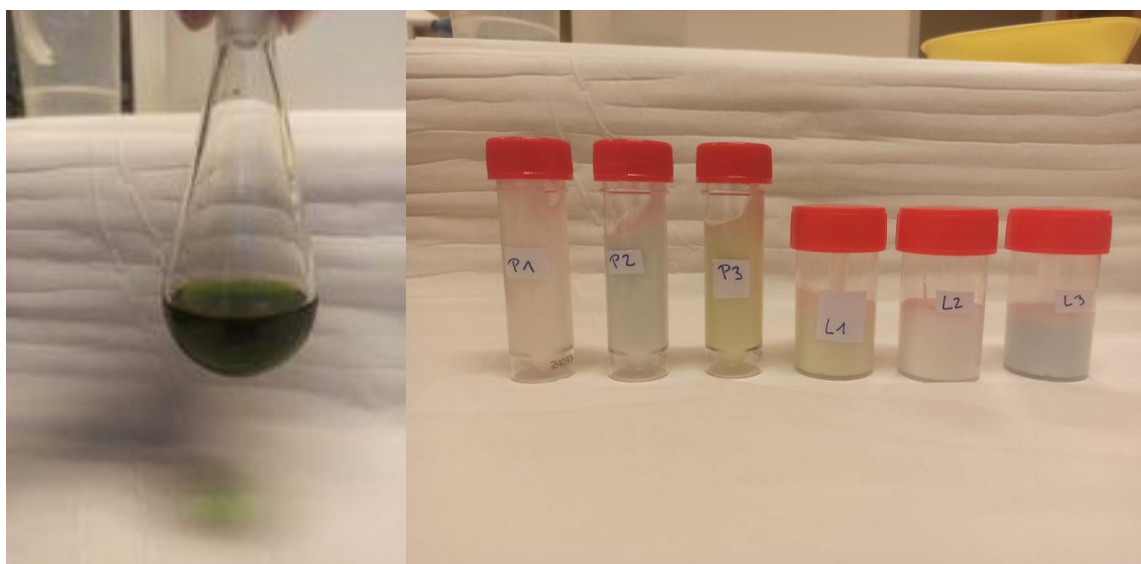
4.12 Příprava emulzí s aktivní složkou

Byly vybrány dva extrakty mikroorganismů, jeden komerčně zakoupený a druhý kultivovaný na fakultě. Dále byly vybrány dva recepty na přípravu emulzí. Byl připraven objem 1200 ml od každého vybraného receptu. Postup přípravy krémů je uveden v bodě 4.11.2.

Objem 1200 ml byl rozdělen na tři části po 400 ml. Do jedné emulze byl přidán vodný extrakt *Spirulina* (1D), do druhé extrakt z *Anabaena*, která byla extrahována směsí methanol:ethylacetát. Před přidáním do emulze byla odpařena na vakuové rotační odparce a pevný podíl byl rozpuštěn v určitém množství ethanolu.

Celkově bylo připraveno 6 krémů: dvě řady vzorků, kde jeden zůstal čistý, jeden byl s přídavkem sinice *Spirulina* a druhý s přídavkem extraktu ze sinice *Anabaena*.

Krémy byly rozděleny do plastových krabiček a rozdány 20 respondentům.



Obrázek 16 Extrakt sinice *Anabaena* v ethanolu; rozdělené krémy

4.13 Testování vlivu emulzí s extrakty na lidskou pokožku

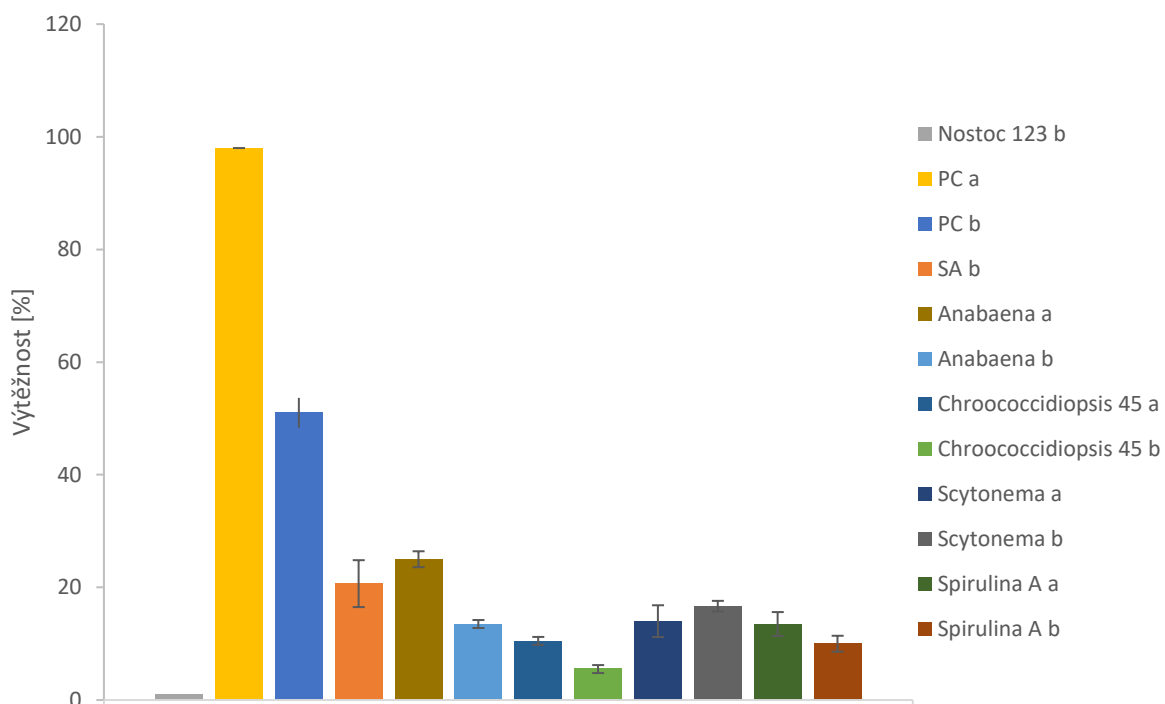
Samotného testování se zúčastnilo 20 respondentů z řad žen i mužů. Každému respondentovi byl při první aplikaci dán dotazník k vyplnění. Krém si respondenti nanášeli na pokožku předloktí každý večer po koupeli před spaním po dobu 20ti dní. Po uplynutí této doby dostali respondenti další dotazník k vyplnění. Bylo vybráno 5 respondentů, kterým byly před aplikací proměřeny vybrané charakteristiky kůže. Byly proměřovány tyto parametry: maz, deskvamace, procento pórů, skvrn a vrásek, pomocí přístroje Visioscope PC 35. Po uplynutí doby 14ti dnů byli tito respondenti znovu testováni. Dotazník je uveden v Příloha 3.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Extrakty z mikrořas kultivovaných na FCH

5.1.1 Celková výtěžnost extraktů

Celková výtěžnost extraktů byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Byla zjištěna hmotnostní koncentrace látek v extraktu, která byla vynásobena celkovým objemem extraktu a vztažena na navážku. Takto vypočítané hodnoty byly vyneseny v procentech do sloupcového grafu (viz Obrázek 17).

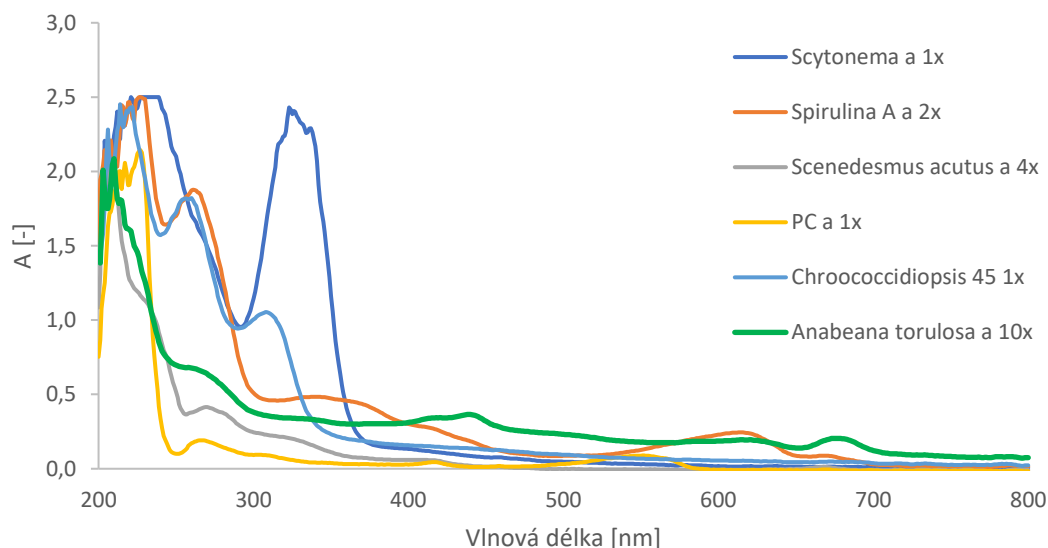


Obrázek 17 Výtěžnost MO kultivovaných na FCH

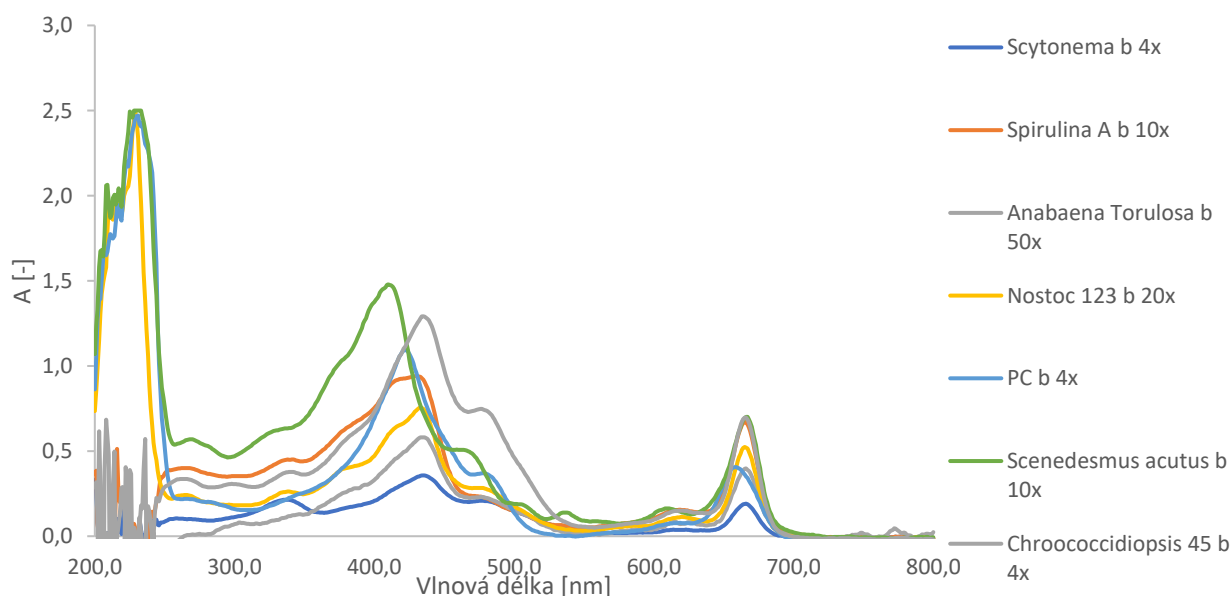
V grafu jsou extrakty označené písmeny a; b, písmeno a zastupuje extrakční rozpouštědlo 30% etanol a písmeno b zastupuje methanol:ethylacetát (1:1). Z grafu lze vidět, že žádná linearita mezi výtěžností a extrakčním rozpouštědlem není. Vyextrahované látky nemusí být všechny aktivní, jde pouze o celkový obsah sušiny v extraktech. Největší procentuální výtěžnost měla řasa *Porphyridium cruentum* extrahovaná 30% ethanolem (98 %). Její výtěžnost byla téměř 100%, což je nepravděpodobné. Naopak nejmenší procentuální výtěžnost měl *Nostoc* extrahovaný methanol:ethylacetátem, a to pouhé 1 %.

5.1.2 Absorpční spektrum

Byla proměřena absorpční spektra podle postupu uvedeném v bodě 4.8.



Obrázek 18 Absorpční spektrum MO kultivovaných na FCH a vyextrahovaných 30% ethanolem
Na tomto grafu (Obrázek 18) lze vidět absorpční spektra nakultivovaných mikroorganismů, které byly extrahovány 30% ethanolem. Chybí zde charakteristické píky chlorofylů a karotenoidů, z čehož vyplývá, že 30% ethanol není dobrým extrakčním rozpouštědlem pro získ chlorofylů a karotenoidů.



Obrázek 19 Absorpční spektra MO kultivovaných na FCH a vyextrahovaných methanol:ethylacetátem (1:1)

Na těchto absorpčních spektrech (Obrázek 19) lze pozorovat charakteristické píky o různé intenzitě pro látky obsažené v zelených mikrořasách a sinicích, například chlorofyly. Ze spektra jde vidět charakteristický trojpík v oblasti 650 nm – 700 nm, odpovídající karotenoidům. Na rozdíl od 30% ethanolu extrakční rozpouštědlo methanol:ethylacetát (1:1) vyextrahovalo chlorofyly a karotenoidy. Píky o nejvyšší intenzitě měla *Anabaena*. Existují studie, které

podporují skutečnost, že množství chlorofylu pozitivně koreluje s hustotou buněk nebo biomasou. *Anabaena* je vynikajícím zdrojem chlorofylu a [58].

5.1.3 Fenolické látky

Pro stanovení celkových fenolických látek v extraktech byla použita kalibrační křivka kyseliny gallové. Do její rovnice byl dosazovány hodnoty absorbancí změřené stejně jako kalibrační křivka podle postupu uvedeném v bodě 4.7.2.

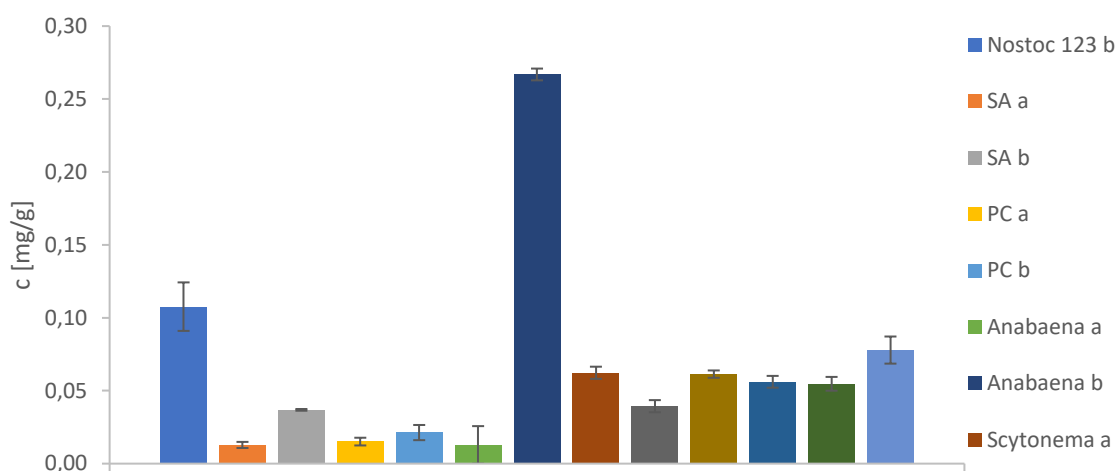
Tabulka 5 Fenolické látky extraktů z MO kultivovaných na FCH

MO	Odchylka
<i>Nostoc</i> 123 b	$0,071 \pm 0,020$
SA a	ND
SA b	$0,007 \pm 0,046$
PC a	ND
PC b	ND
<i>Anabaena</i> a	$0,059 \pm 0,010$
<i>Anabaena</i> b	$0,072 \pm 0,010$
<i>Scytonema</i> a	$0,012 \pm 0,002$
<i>Scytonema</i> b	$0,021 \pm 0,003$
<i>Chroococcidiopsis</i> a	$0,012 \pm 0,004$
<i>Chroococcidiopsis</i> b	$0,020 \pm 0,007$
<i>Spirulina</i> A a	$0,024 \pm 0,001$
<i>Spirulina</i> A b	$0,030 \pm 0,010$

Bylo proměřeno 13 vzorků, které byly kultivované na FCH, 7 vzorků bylo extrahováno v methanol:ethylacetátu (1:1) a zbylých 6 vzorků v 30% ethanolu. Každý ze vzorků byl proměřen 3x a výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 5. Nejvyšší obsah fenolických látek měla *Anabaena*, která byla extrahována do methanol:ethylacetátu, a to ($0,072 \pm 0,010$). Naopak u třech mikroorganismů nebyl obsah fenolů vůbec detekován. Celkové zastoupení fenolických látek u proměřovaných mikroorganismů byl nízký, což nesouhlasí se studiemi, které říkají, že sinice a řasy mají obsah fenolických látek vyšší. Obecně ale platí, že změny v množství fenolických sloučenin v extraktu závisí na typu a polaritě extrakčního rozpouštědla [59].

5.1.4 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu, který je uveden v bodě 4.7.3 Pro výpočet obsahu antioxidačních látek v extraktech byla použita kalibrační křivka Troloxu.

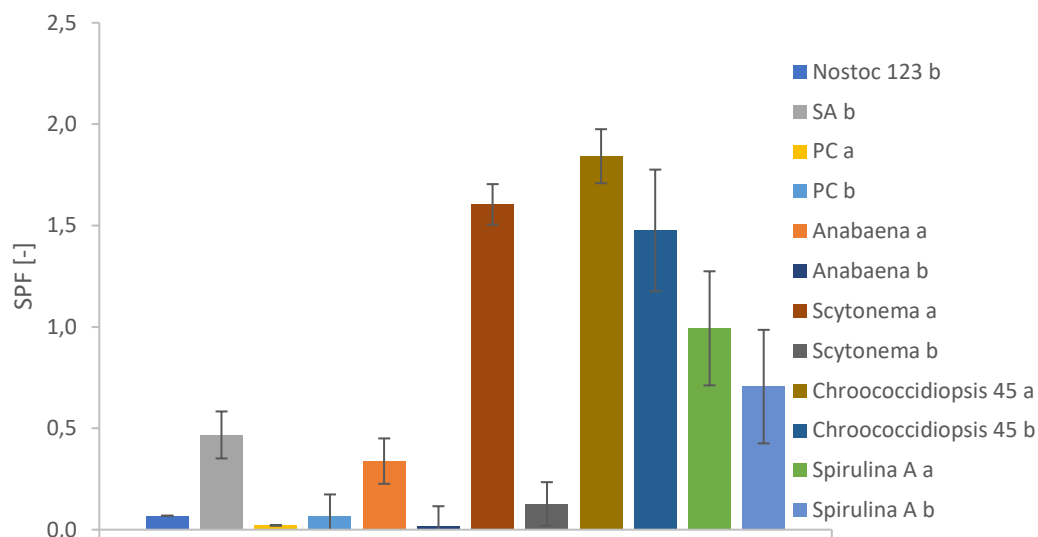


Obrázek 20 Antioxidační aktivita extraktů z MO kultivovaných na FCH

Stejně jako v předchozí metodě bylo proměřeno celkem 13 vzorků. Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky, závislosti absorbance A na koncentraci Troloxu, byl zjištěn úbytek absorbance vzorku, který byl přepočten na ekvivalentní množství Troloxu. Každý vzorek byl proměřen 3x a následně vypočtena průměrná hodnota. Výsledné průměrné hodnoty s chybovými úsečkami jsou uvedeny v Obrázek 20. Z grafu (Obrázek 20) lze vidět, že největší antioxidační aktivitu měla *Anabaena*, která byla extrahována v methanol:ethylacetátu (1:1), a to 0,27 mg/g. *Anabaena* měla průměrně 2,5x vyšší antioxidační aktivitu než ostatní vzorky. Vzorek sinice *Nostoc* 123 vyextrahovaný také do methanol:ethylacetátu měl antioxidační aktivitu oproti ostatním vzorkům také dobrou (0,11 mg/g). Ostatní vzorky měly antioxidační aktivitu zanedbatelnou, prakticky žádné antioxidační látky neobsahovala řasa *Porphyridium cruentum*, a to ani v jednom extrakčním rozpouštědle.

5.1.5 SPF faktor

Pro výpočet SPF byly použity hodnoty absorbancí naměřené podle bodu 4.8 a SPF byl vypočten podle rovnic v uvedených v bodě 2.9. Takto vypočtené hodnoty SPF byly přehledně shrnuty do sloupcového grafu (Obrázek 21).

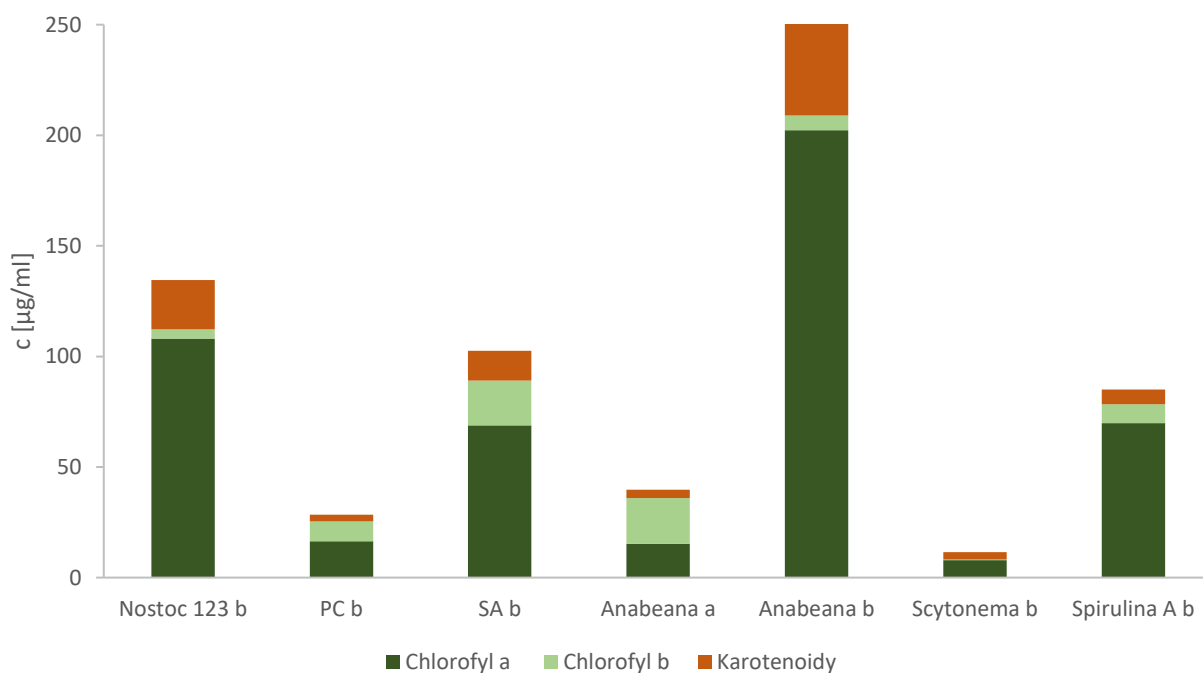


Obrázek 21 SPF faktor extraktů z MO kultivovaných na FCH

Z grafu je patrné, že nejvyšší SPF faktor měly obě extrakce *Chroococcidiopsis*, lepší však do 30% ethanolu (SPF 1,84). Druhá nejlepší byla *Scytonema*, extrahována do 30% ethanolu. U extraktu z *Chroococcidiopsis* extrahoveného do methanol:ethylacetátu byly velké odchylky. Naopak *Porphyridium cruentum*, *Nostoc* a *Anabaena* nevykazovali téměř žádný ochranný faktor vůči Slunci.

5.1.6 Obsah chlorofylů a celkových karotenoidů

Bylo proměřeno absorpční spektrum podle postupu uvedeném v bodě 4.8 a z něj vypočítán obsah chlorofylů a celkových karotenoidů podle rovnic uvedených v bodě 4.8.2.



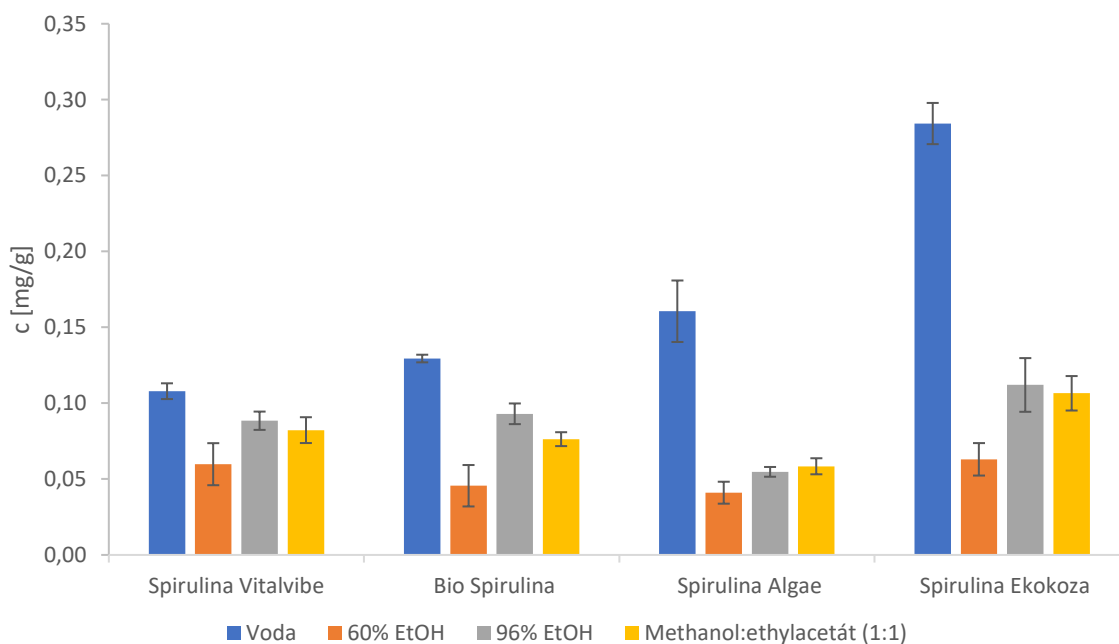
Obrázek 22 Obsah chlorofylů a karotenoidů

Na Obrázku 22 lze vidět grafické znázornění chlorofylu a, b a celkových karotenoidů. U extraktů b, tedy vyextrahovaných methanol:ethylacetátem (1:1) se vyextrahovalo více chlorofylů a karotenoidů. Většina extraktů extrahovaných 30% ethanolem byly z grafu odebrány, kvůli velmi nízkému obsahu. Obsah chlorofylů a karotenoidů byl u methanol:ethylacetátových extraktů více jak 100x lepší. Nejvyšší obsah chlorofylů (208 $\mu\text{g/ml}$) i karotenoidů (46 $\mu\text{g/ml}$) měla *Anabaena*. I v druhém rozpouštědle se vyextrahovaly tyto analyty a byly stanovitelné, poměr se však významně lišil u obou rozpouštědel. Poměr chlorofylů vůči karotenoidům se u každého extraktu lišil.

5.2 Extrakty z komerčně zakoupených mikrořas

5.2.1 Antioxidační aktivita

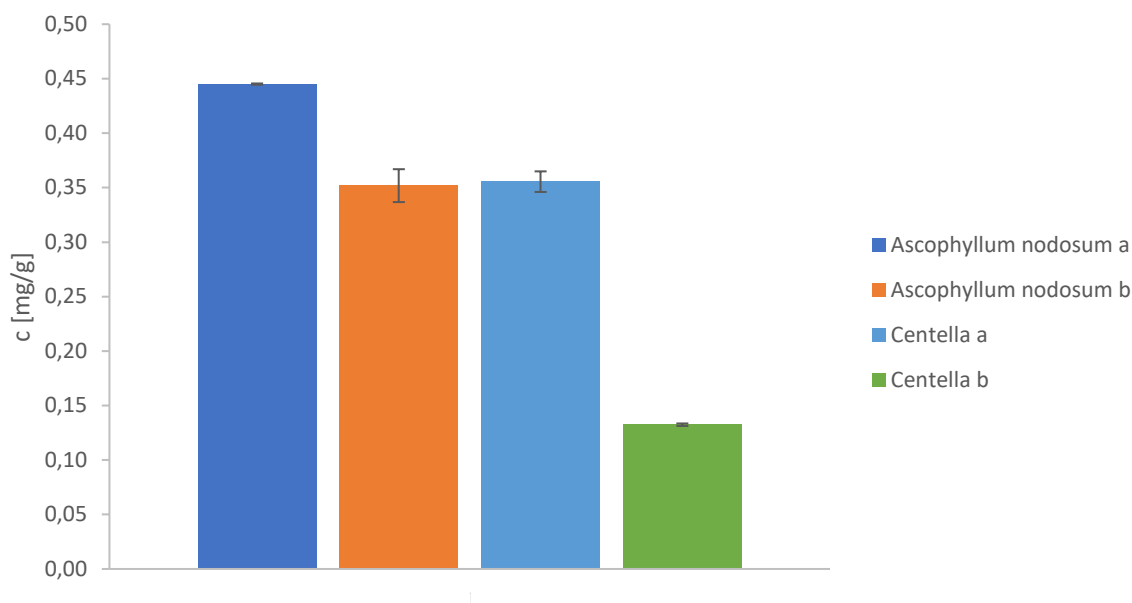
Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu, který je uveden v bodě 4.7.3. Pro výpočet obsahu antioxidačních látek v extraktech byla použita kalibrační křivka Troloxu. Byla změřena antioxidační aktivita komerčních preparátů *Spirulina*, rostlin a kvasinky. Další měření probíhalo pouze s vybranými vzorky.



Obrázek 23 Antioxidační aktivita extraktů z komerčně zakoupených vzorků *Spirulina*

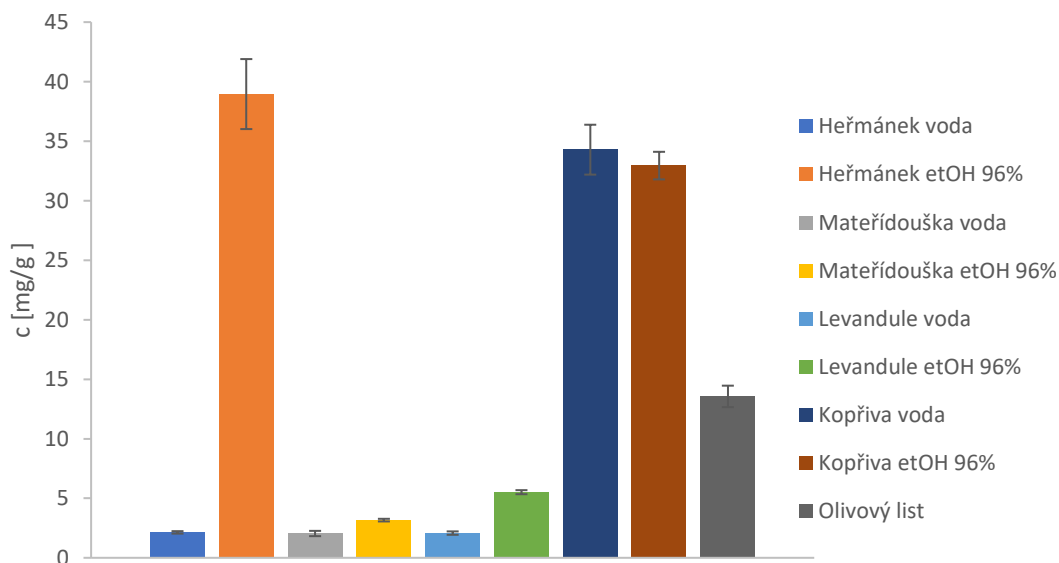
Stejně jako v předchozí metodě bylo proměřeno prvně 16 vzorků preparátu *Spirulina*. Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky, závislosti absorbance A na koncentraci Troloxu, byl zjištěn úbytek absorbance vzorku, který byl přepočten na ekvivalentní množství Troloxu. Každý vzorek byl proměřen 3x a následně vypočtena průměrná hodnota. Výsledné průměrné hodnoty s chybovými úsečkami jsou uvedeny v Obrázek 23. Z grafu jde vidět, že největší hodnoty antioxidační aktivity měly vzorky *Spirulina*, které byly extrahovány do vody, konkrétně nejvyšší antioxidační aktivitu měla *Spirulina* od firmy Ekokoza (0,28 mg/g). Nejlepší vlastní vzorek byla sinice *Anabaena* v extrakčním rozpouštědle methanol:ethylacetát, která měla antioxidační aktivitu velmi podobnou, a to 0,27 mg/g. U vzorku *Spirulina* Vitalvibe téměř nezáleží na rozpouštědle, rozdíly mezi rozpouštědly jsou malé. U posledních vzorků je téměř

5tinásobný rozdíl mezi vodou a ostatními rozpouštědly. Ostatní vzorky měly antioxidační aktivitu podobnou, nejhůře na tom byly vzorky extrahované do 60% ethanolu, zejména *Spirulina Algae* (0,041 mg/g).



Obrázek 24 Antioxidační aktivita organismů

Dále bylo proměřeno 8 dalších vzorků, do grafu (Obrázek 24) byly vyneseny pouze 4, jejichž antioxidační aktivita byla vysoká. U dalších 4 vzorků (*Palmaria palmata* vyextrahovaná do vody a methanol:ethylacetátu (1:1) a kvasinka *R. mucilaginosa* vyextrahovaná do stejných extrakčních rozpouštědel) nebyla antioxidační aktivita detekovaná. Nejvyšší antioxidační aktivitu měla řasa *Ascophyllum nodosum*, extrahovaná do 30% ethanolu, a to 0,45 mg/g. Rostlina *Centella*, extrahovaná do methanol:ethylacetátu byla nejnižší (0,13 mg/g).



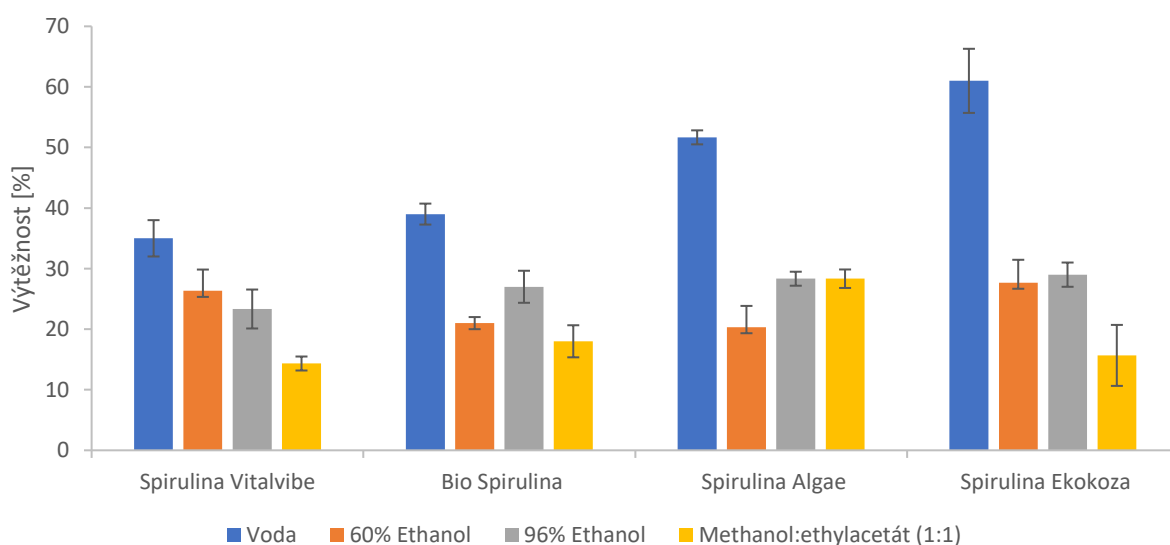
Obrázek 25 Antioxidační aktivita rostlin

Nakonec byla proměřena antioxidační aktivita rostlinných extraktů (Obrázek 25). Nejvyšší hodnota byla naměřena u heřmánku, který byl extrahován do 96% ethanolu (38,96 mg/g). Vysokou antioxidační aktivitu měla i kopřiva, která byla extrahována 2 způsoby, a to do vody a také 96% ethanolu. Naopak nejnižší (přesto vyšší než mikroorganismy) antioxidační aktivitu měly rostliny extrahované do vody a mateřídouška s levandulí extrahované do 96% ethanolu, konkrétně levandule extrahovaná do vody, a to 2,08 mg/g.

Vzorky rostlin byly proměřeny jen z toho důvodu, abychom mohli porovnat antioxidační aktivitu s ostatními vzorky. Bylo vybráno těchto 5 druhů rostlin z toho důvodu, že všechny jsou považovány za antioxidanty, což se i potvrdilo. Kopřiva v obou extrakčních rozpouštědlech a heřmánek v 96% ethanolu měly průměrnou antioxidační aktivitu 36 mg/g. Ostatní rostliny neměly antioxidační aktivitu tak vysokou, ale pořád vyšší než mikroorganismy, se kterými bylo pracováno. I přestože měly rostliny nejvyšší antioxidační účinnost, nebyly vybrány pro další měření, a to z toho důvodu, že jejich růst je časově náročný, za to kultivace mikroorganismů ne.

5.2.2 Celková výtěžnost extraktů

Celková výtěžnost extraktů byla stanovena podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.1. Byla zjištěna hmotnostní koncentrace látek v extraktu, která byla vynásobena celkovým objemem extraktu a vztažena na navážku. Takto vypočítané hodnoty byly vyneseny v procentech do sloupcového grafu (viz Obrázek 26).

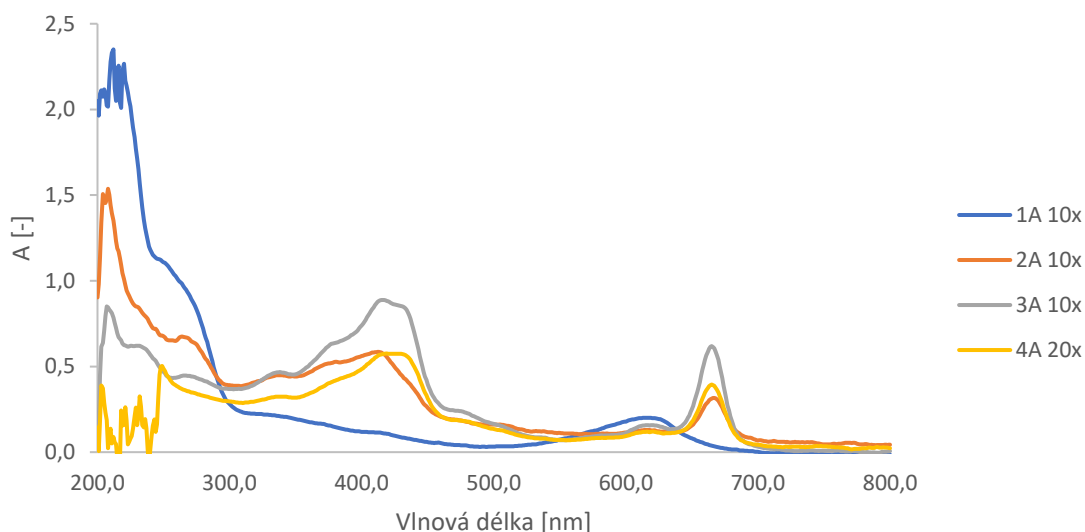


Obrázek 26 Celková výtěžnost extraktů z komerčně zakoupených sinic *Spirulina*

Na tomto grafu lze vidět výtěžnost extrakce pro extrakty připravené ze vzorků komerčně dostupných sinic *Spirulina*. Pozorujeme, že u vodných extraktů byla výtěžnost větší než u ostatních extraktů. Konkrétně nejvyšší procentuální výtěžnost měla *Spirulina* Ekokoza, která byla extrahována do vody, a to 61 %. Látky, které byly vyextrahovány, nemusí být všechny aktivní, jedná se pouze o obsah sušiny v extraktech. Ostatní vzorky jsou si velice podobné a nejhůř na tom jsou vzorky extrahované do methanol:ethylacetátu, konkrétně *Spirulina* Vitalvibe, která měla výtěžnost pouhých 14,33 %.

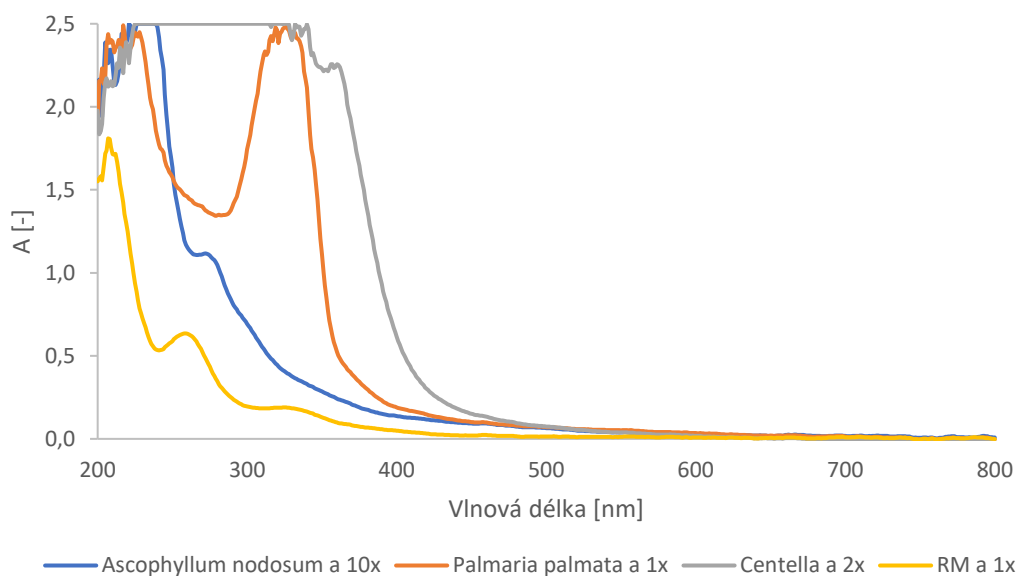
5.2.3 Absorpční spektrum

Pro měření absorpčního spektra byly vzorky naředěny extrakčním rozpouštědlem a proměřeny podle postupu uvedeného v bodě 4.8.



Obrázek 27 Absorpční spektrum *Spirulina* Vitalvibe ve 4 různých extrakčních rozpouštědlech

Na tomto absorpčním spektru (viz Obrázek 27) je znázorněna jedna komerčně zakoupená *Spirulina* ve čtyřech různých extrakčních rozpouštědlech. Lze vidět charakteristické píky chlorofylů a karotenoidů. Vzorek 1A má menší intenzitu, což potvrzuje domněnku, že se ve vodném extraktu vyextrahovalo méně chlorofylů a karotenoidů, což lze předpokládat z jejich lipofilního charakteru. Dále se u tohoto vzorku objevil pík okolo vlnové délky 610 nm, to mohlo být způsobeno vyextrahovaným proteinem fykocyaninem. Vzorek byl tmavě modrý, a tudíž by měl absorbovat v oranžové až červené oblasti spektra [60]. Naopak největší intenzitu píku chlorofylů i karotenoidů mají vzorky, které byly extrahovány do 60% ethanolu. Další druhy komerčně zakoupených preparátů *Spirulina* ve stejných extrakčních rozpouštědlech lze vidět viz Příloha 4.

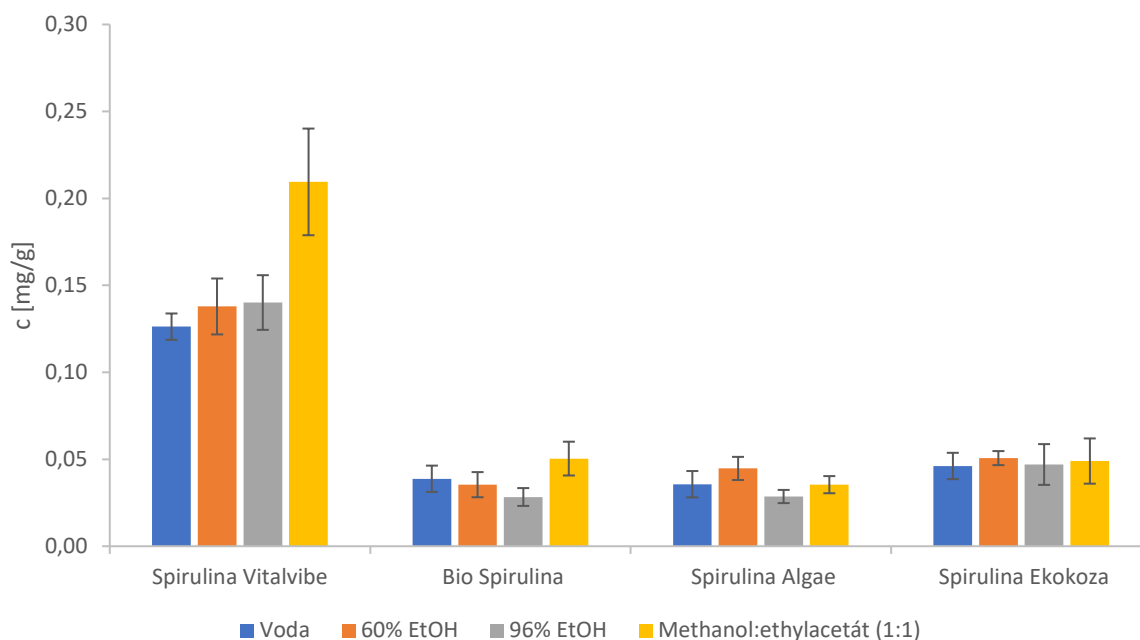


Obrázek 28 Absorpční spektrum zakoupených MO

Na Obrázku 28 vidíme absorpční spektrum 2 řas, rostliny a kvasinky, které byly vyextrahovány do vody. Z grafu vidíme, že chybí píky chlorofylů i karotenoidů, které nebyly v extraktu detekovány. U kvasinky to bylo zřejmě z důvodu nenarušení buněčné stěny kvasinky při extrakci. Absorpční spektrum s extrakčním rozpouštědlem methanol:ethylacetát (1:1) lze vidět v Příloha 5.

5.2.4 Fenolické látky

Pro stanovení celkových fenolických látek v extraktech byla použita kalibrační křivka kyseliny gallové. Do její rovnice byl dosazovány hodnoty absorbancí změřené stejně jako kalibrační křivka podle postupu uvedeném v bodě 4.7.2.

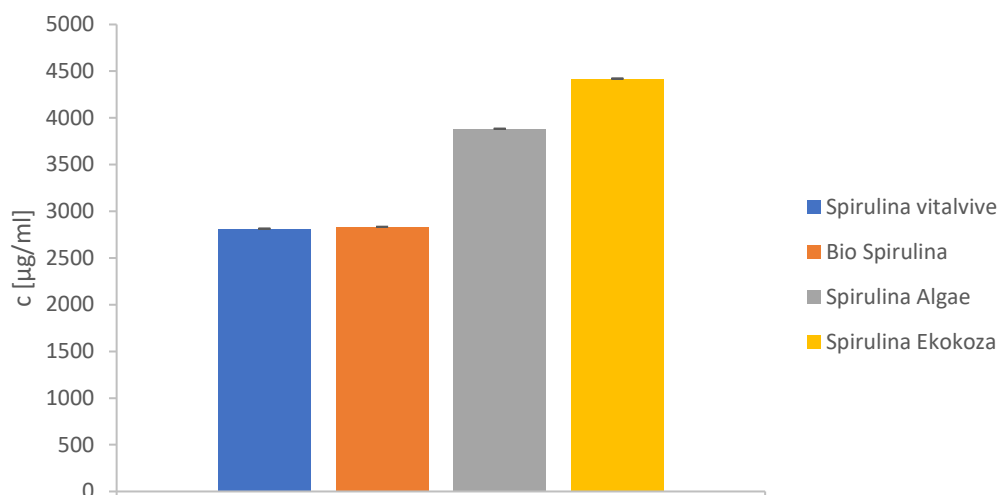


Obrázek 29 Fenolické látky extraktů z komerčně zakoupených *Spirulinách*

Bylo proměřeno 16 vzorků, které byly komerčně zakoupeny, byly extrahovány do 4 různých rozpouštědel, do vody, 60% a 96% ethanolu a methanol:ethylacetátu (1:1). Každý ze vzorků byl proměřen 3x a výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafu (Obrázek 29). Z grafu lze vyčíst, že největší obsah fenolických látek měla *Spirulina Vitalvibe*, která byla extrahována do methanol:ethylacetátu, a to 0,21 mg/g. I ostatní extrakce této sinice byly průměrně 3x lepší než extrakty ostatních preparátů *Spirulina*. Naopak fenolické látky ostatních extraktů si byly velmi podobné. Úplně nejhůř na tom byla *Bio Spirulina*, extrahována 96% ethanolem, která měla obsah fenolických látek pouze 0,0283 mg/g.

5.2.5 Stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou

Proteiny byly stanovovány pouze u vodných extraktů podle postupu uvedeném v bodě 4.7.4. Pro výpočet obsahu proteinů ve vodných extraktech byla použita kalibrační křivka albuminu.

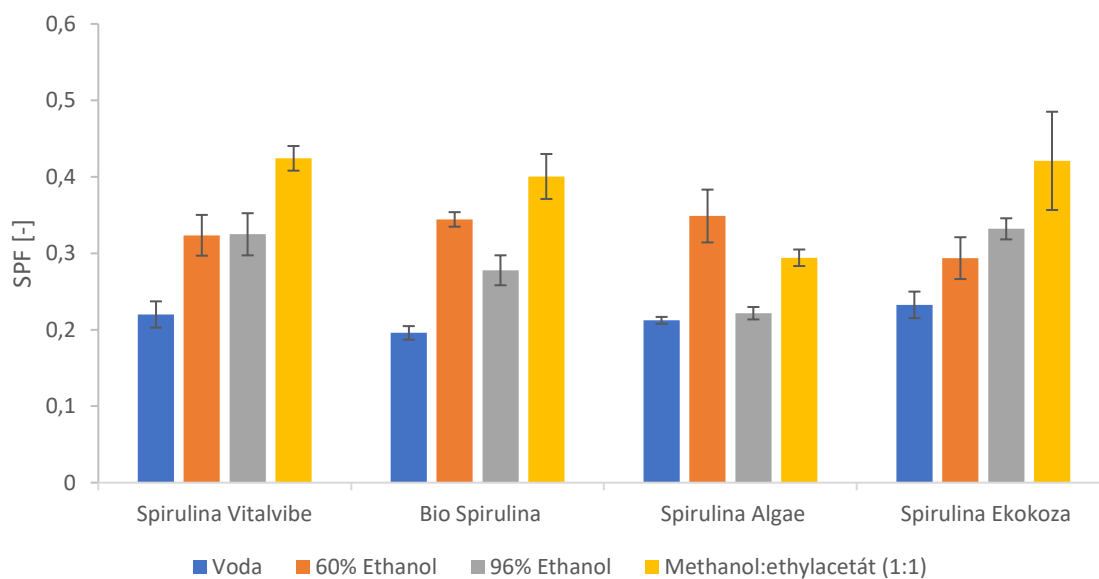


Obrázek 30 Obsah proteinů u vodných extraktů

U vodných extraktů *Spirulina* byl stanoven obsah proteinů. Byly proměřeny 4 vzorky. Každý ze vzorků byl proměřen 3x, zprůměrované výsledné hodnoty jsou uvedeny v Obrázek 30. Největší obsah proteinů měla *Spirulina* Ekokoza (4,42 mg/ml). Jednalo se o proteiny globulární, které jsou rozpustné ve vodě. Naopak nejnižší zastoupení proteinů měla *Spirulina* Vitalvibe (2813,3 µg/ml).

5.2.6 SPF faktor

Pro výpočet SPF byly použity hodnoty absorbancí naměřené podle bodu 4.8 a SPF byl vypočten podle rovnic v uvedených v bodě 2.9. Takto vypočtené hodnoty SPF byly přehledně shrnuty do sloupcového grafu (Obrázek 31).



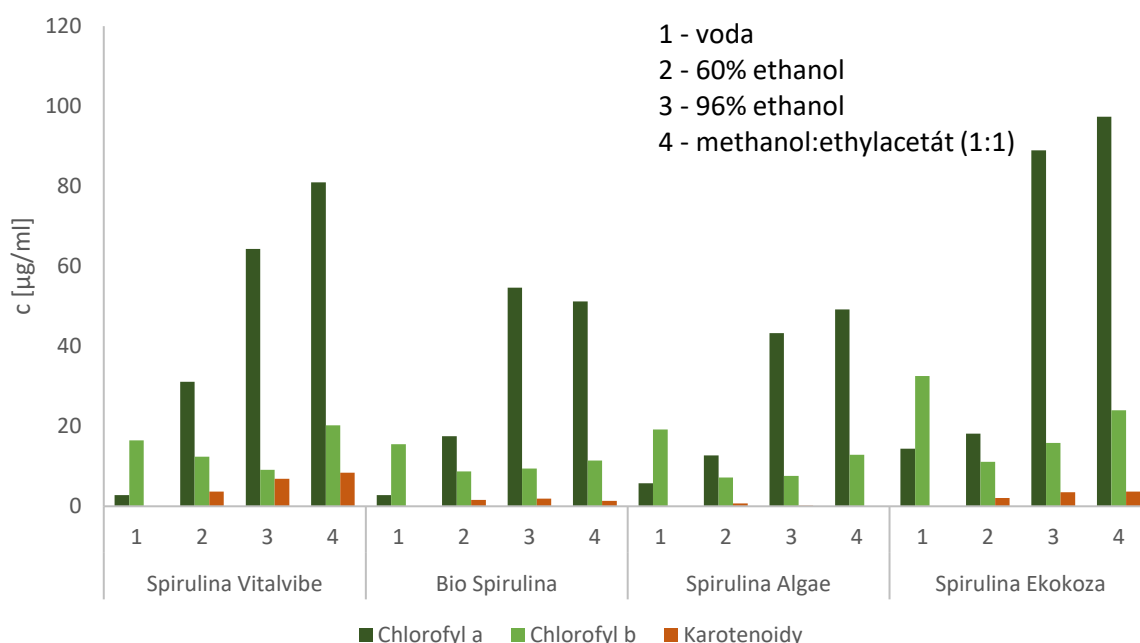
Obrázek 31 SPF faktor komerčně zakoupených preparátů *Spirulina*

Na tomto grafu můžeme vidět SPF faktor, který byl vypočten z absorpčních spekter. SPF faktor je nejvyšší u *Spirulina*, které byly extrahovány do methanol:ethylacetátu (1:1), konkrétně

nejvyšší měla *Spirulina Vitalvibe* (SPF 0,42). Vysoký ochranný faktor vůči Slunci měly i vzorky extrahované do 60% ethanolu. Nejnižší SPF faktor měly vodné extrakty, úplně nejnižší Bio *Spirulina*, a to SPF 0,20). Další graf s vypočteným SPF faktorem pro další komerční organismy můžeme vidět viz Příloha 6.

5.2.7 Obsah chlorofylů a celkových karotenoidů

Bylo proměřeno absorpční spektrum podle postupu uvedeného v bodě 4.8 a z něj vypočítaný obsah chlorofylů a celkových karotenoidů podle rovnic uvedených v bodě 4.8.2.

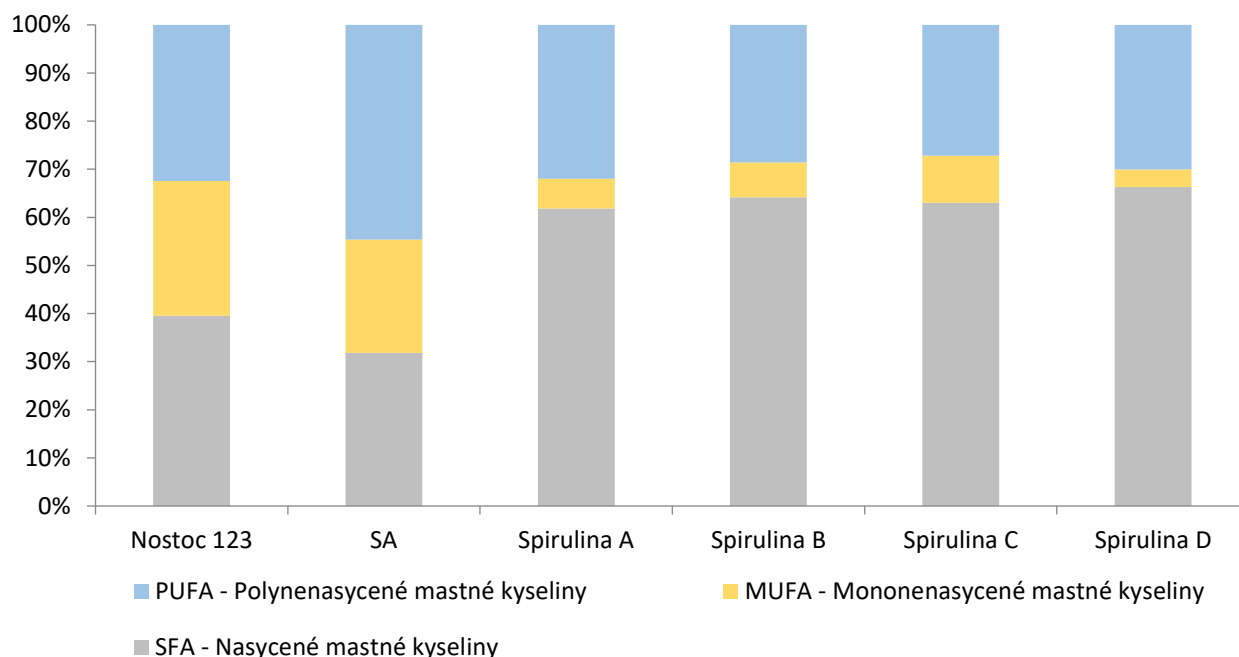


Obrázek 32 Obsah chlorofylů a karotenoidů v extraktech ze sinice *Spirulina*

Na tomto grafu (Obrázek 32) lze vidět grafické znázornění obsahu chlorofylu a, b a celkových karotenoidů. Největší obsah vyextrahovaných chlorofylů měly vzorky extrahované do směsi methanol: ethylacetát, ale v rámci vzorků měly vysoký obsah chlorofylů i extrakty z 96% ethanolu, což se dalo očekávat. Úplně nejvyšší zastoupení měla *Spirulina Ekokoza*, a to 97 µg/ml chlorofylu a 24 µg/ml chlorofylu b. Naopak nejméně chlorofylů se vyextrahovalo vodou a 60% ethanolem. Karotenoidy se nevyextrahovaly vodou a 60% ethanolem, což se dalo předpokládat z jejich lipofilního charakteru. Pouze pomocí 96% ethanolu a methanol:ethylacetátu se vyextrahovalo malé množství, nejvyšší u *Spirulina Vitalvibe* v methanol:ethylacetátu, a to 8,4 µg/ml. Podrobný grafický přehled vyextrahovaných pigmentů lze vidět v Příloha 7.

5.2.8 Stanovení obsahu mastných kyselin

Obsah mastných kyselin byl stanoven u extraktů komerčně zakoupených sinic *Spirulina* a u dvou extraktů z mikroorganismů kultivovaných na FCH, konkrétně u sinice *Nostoc* a řasy *Scenedesmus acutus*. Postup je uveden v bodě 4.7.5.

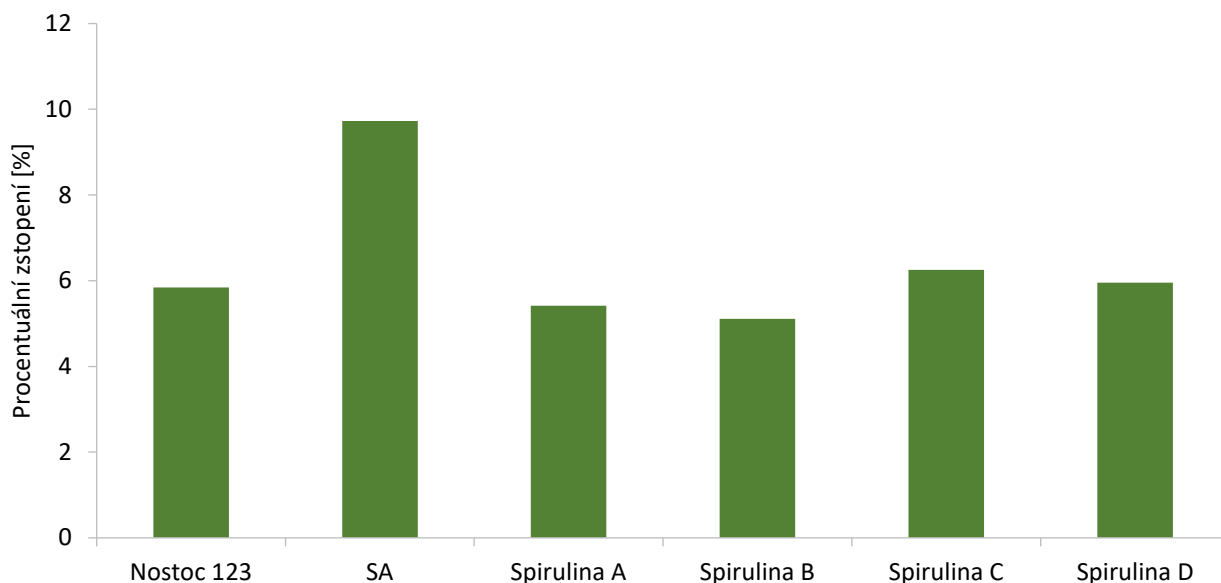


Obrázek 33 Obsah jednotlivých mastných kyselin

Z grafu (Obrázek 33) je patrné, že nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin měla řasa *Scenedesmus acutus*, a to 45 hm. %. Ostatní mikroorganismy měly v průměru kolem 30 hm. %. Obsah nasycených mastných kyselin měly *Spirulina* přibližně stejný, a to v průměru 64 hm. %. Nejnížší zastoupení SFA má *Scenedesmus acutus* (31,79 hm. %). Nejvíce mononenasycených kyselin bylo stanoveno u *Nostoc* (28 hm. %). Naopak nejnížší podíl měly všechny komerční preparáty *Spirulina*.

Tabulka 6 Seznam mastných kyselin, který obsahoval vzorek s nevyšším zastoupením PUFA

Seznam kyselin	SFA	MUFA	PUFA
<i>Scenedesmus acutus</i>	C13	C18:1c	C18:2c
	C16		C18:3d6
			C18:3d3



Obrázek 34 Procentuální zastoupení lipidů v biomase

Na grafu (Obrázek 34) lze vidět procentuální zastoupení lipidů v biomase. Největší procentuální zastoupení lipidů měla řasa *Scenedesmus acutus*. Obecně ale celkové množství lipidů v biomase dosahovalo průměrně 6,5 %, což je o něco méně, než by mělo. Podle studií by měl obsah lipidů u sinic být kolem 10,7 – 12,3 % [60].

5.3 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita extraktů byla měřená na základ změny zákalu. Postup je uveden v bodě 4.9. Účinek byl testovaný na bakterii *E. coli*.

5.3.1 Antimikrobiální účinek ampicilinu

Pomocí bujónové diluční metody byla stanovena minimální inhibiční koncentrace ampicilinu u *E. coli*. Byla sestavená koncentrační řada v rozmezí 0,25 – 16 µg/ml. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 7. Z tabulky můžeme vidět, že minimální inhibiční koncentrace je 4 µg/ml.

Tabulka 7 Antimikrobiální aktivita ampicilinu

Ampicilin	
c [µg/ml]	Antimikrobiální aktivita
0,25	+
0,5	+
1	+
2	++
4	+++
8	+++
16	+++

Antimikrobiální aktivita: (-) 0 %; (+) 0 – 50 %; (++) 50 – 80 %; (+++) 80 – 100 %

Tabulka 8 Antimikrobiální aktivita extraktů

	Bio <i>Spirulina</i> ve vodě		<i>Spirulina</i> Algae ve vodě	
	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita
<i>E. coli</i>	500	+	500	+
	250	+	250	+
	125	+	125	-
	62,5	+	62,5	+
	31,25	+	31,25	-
	15,625	+	15,625	+
	Bio <i>Spirulina</i> v 60% ethanolu		Bio <i>Spirulina</i> v 96% ethanolu	
	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita
	500	+	500	+++
	250	+	250	++
	125	+	125	+
	62,5	+	62,5	-
	31,25	+	31,25	-
	15,625	-	15,625	-
	<i>Spirulina</i> Vitalvibe v methanol:ethylacetátu		<i>Spirulina</i> Ekokoza v methanol:ethylacetátu	
	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita	c [μl/ml]	Antimikrobiální aktivita
	500	+	500	+
	250	-	250	-
	125	-	125	-
	62,5	-	62,5	-
	31,25	-	31,25	-
	15,625	-	15,625	-

Antimikrobiální aktivita: (-) 0 %; (+) 0 – 50 %; (++) 50 – 80 %; (+++) 80 – 100 %

Z tabulky Tabulka 8 je patrné, že připravené extrakty vykazovaly určitou antimikrobiální účinnost, která se pohybovala v poměrně nízkém rozmezí hodnot, konkrétně 10 – 50 %. MIC sinice *Spirulina* byla stanovena na 500 μl/ml. U Bio *Spirulina* byla MIC určena na 125 μl/ml. Graf antimikrobiální účinnosti je uveden v Příloha 8.

5.4 Dotazník pro rodiče

Za účelem získání informací ohledně používané dětské kosmetiky byl vytvořen dotazník pro rodiče, jak bylo uvedeno v bodě 4.10. V následující tabulce (Tabulka 9) můžete vidět shrnuté výsledky odpovědí získaných od 16 respondentů.

Tabulka 9 Výsledky dotazníku pro rodiče

Počet respondentů	15	
Otázka	Odpovědi	Procentuální zastoupení [%]
Věk dítěte	0-6 měsíců	26,7
	6-12 měsíců	13,3
	1 - 3 roky	26,7
	3 - 5 let	0
	5+ let	33,3
Zkoušíte rád/a nové značky kosmetiky?	Ano	6,7
	Spíše ano	6,7
	Spíše ne	60
	Ne	26,7
Když si kupujete nový produkt, je pro Vás důležité prvně fyzicky prohlédnout produkt (jak lákavý má obal)?	Ano	6,7
	Spíše ano	20
	Spíše ne	60
	Ne	13,3
Věnujete pozornost složení kosmetických produktů?	Ano	60
	Spíše ano	13,3
	Spíše ne	26,7
	Ne	0
Jaké látky, které jsou obsaženy v komerční kosmetice, by podle Vás neměly být v přírodní?	Silikony	60
	Syntetická barviva	60
	Sulfáty	86,7
	Hliník	73,3
	Ropné látky	73,3
Dáváte přednost přírodní kosmetice?	Ano	53,3
	Spíše ano	40
	Spíše ne	6,7
	Ne	0
Co Vás ovlivňuje při koupi nového produktu?	Recenze	60
	Cena	66,7
	Vzhled	6,7
	Vůně	26,7
	Značka	26,7
	Složení	20
Jaký typ produktu kupujete?	Tělové mléko	33,4
	Tělový krém	26,7
	Tělový olej	13,3
	Mast	26,7
Jakou konzistenci produktu upřednostňujete?	Gelovitá	6,7
	Mastná	33,3
	Lehká	46,7
	Vstřebávací a hydratační	6,7
	Tekutá	6,7
Co od daného produktu očekáváte?	Ochrana vůči Slunci	6,7
	Hydrataci	60
	Zklidňující účinek	26,7
	Léčivý účinek	6,7

Nejčastěji zastoupený věk dítěte respondentů byl 0 – 6 měsíců a 1 – 3 roky. Většina odpovídajících nezkouší ráda nové značky kosmetiky. Více jak polovina respondentů na otázku, jestli sledují složení kosmetiky a jestli dávají přednost přírodní kosmetice, odpověděla, že ano. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje při koupi nového produktu, je cena a recenze. Nejčastěji kupovaným produktem je tělové mléko a krém. Konzistenci upřednostňují lehkou a od produktu, který kupují, požadují zejména hydratační účinek.

5.5 Výsledky testování vlivu emulzí s extrakty na lidskou pokožku

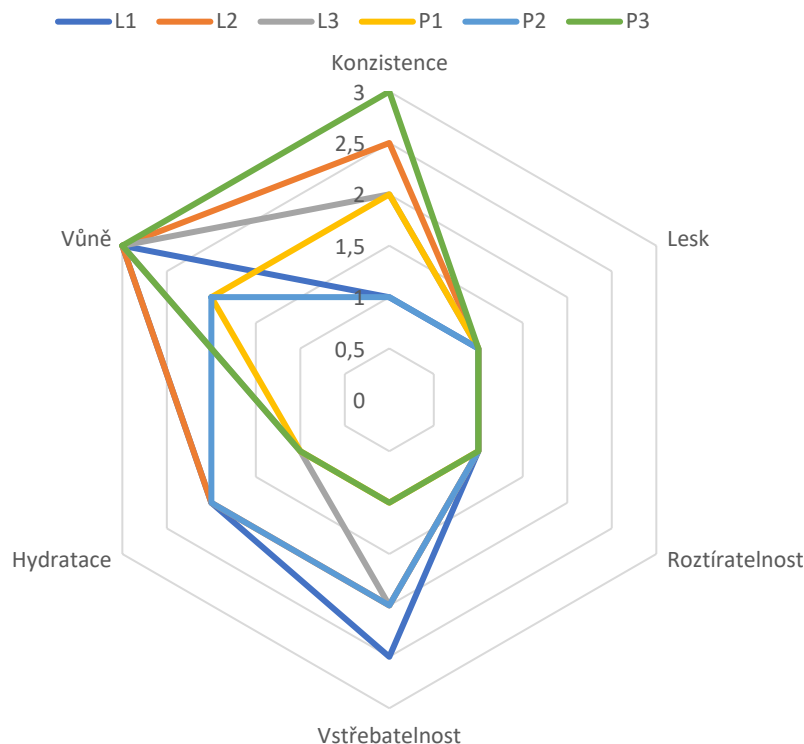
Z předchozích analýz byly vybrány dva vzorky extraktů, které byly dále přidány jako aktivní látky do dvou emulzních základů. Jejich popis je uveden v Tabulka 4. Připravené emulze byly podrobeny senzorické analýze. Respondenti si aplikovali krémy po dobu 14 dnů, a to každý večer po koupeli na předloktí. Dotazník vyplňovali po prvním užití a po 14ti dnech používání. Výsledky senzorických testů jsou uvedeny v dalších grafech (viz Obrázek 35 a Obrázek 36).

Tabulka 10 Charakteristika respondentů

Respondenti	Počet
Žena	17
Muž	3
Průměrný věk	19 - 25 let

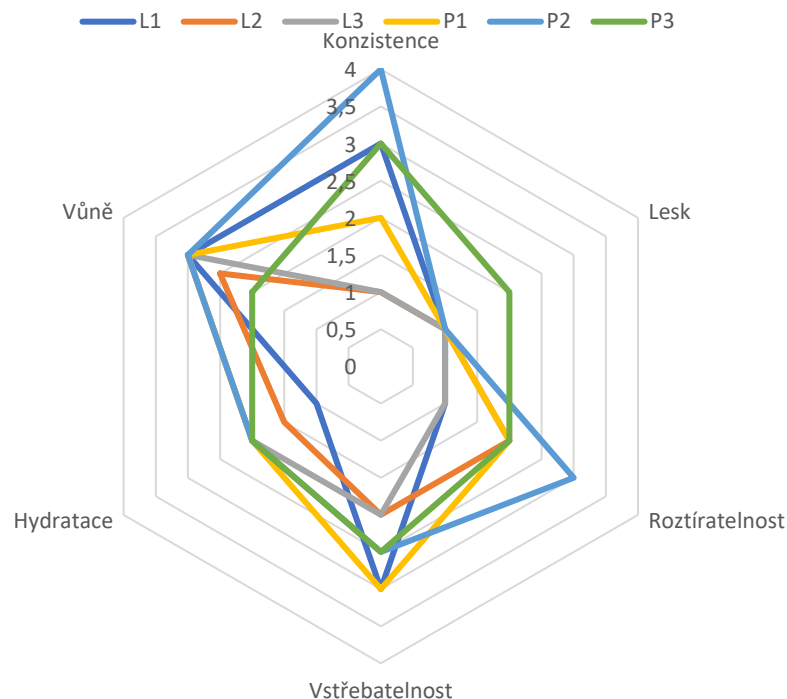
Tabulka 11 Rámcové složení emulzí

L1	parařinový	Anabaena
L2		čistý
L3		Spirulina
P1	Emulsun	čistý
P2		Spirulina
P3		Anabaena



Obrázek 35 Výsledky dotazníku po první aplikaci krémů na pokožku

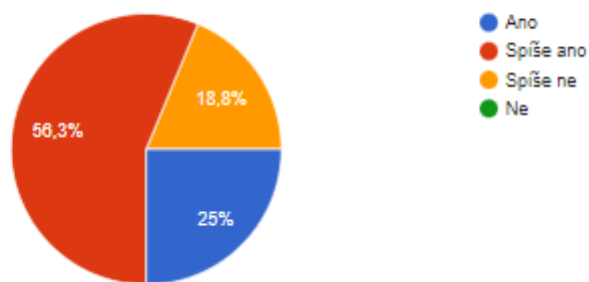
Na grafu (Obrázek 35) jsou znázorněny hodnoty senzorických parametrů všech 6 krémů připravených podle postupu uvedeného v bodě 4.12. Parametry krémů byly známkovány podle číselné stupnice od 1 do 5, tj. 1-nejlepší, 5-nejhorší. Všechny krémy měly špatné hodnocení vůně, konzistence každého krému byla hodnocena jinak. Lesk a konzistence krémů byla podle respondentů podobná. Nejlépe byl hodnocen krém P2, což byl krém s Emulsunem a přídatkem extraktu *Spirulina*. Naopak nejhůře hodnocený byl L2, což byl krém parafinový bez extraktu. Krém P2 měl podle respondentů nejlepší vůni, konzistenci a hydrataci, naopak krém L2 měl konzistenci i hydrataci nejhůře hodnocenou. Parametry lesk a roztíratelnost byly u všech vzorků emulzí hodnoceny stejnou průměrnou známkou, a to 1.



Obrázek 36 Výsledky dotazníku po 14ti dnech aplikace

Po 14 dnech používání byl nejhůře hodnocen krém P2, což byl krém s Emulsunem a přídavkem extraktu *Spirulina*, kterému se zhoršila konzistence i roztíratelnost. Parametry lesk a hydratace byly respondenty hodnoceny stejně. Naopak nejlépe byl hodnocen krém L2, což byl krém parafínový bez extraktu. U tohoto krému byla lépe hodnocena vůně, hydratace a konzistence. Roztíratelnost se o stupeň zhoršila (Obrázek 36).

Byly jste s produkty spokojeni?



Obrázek 37 Spokojenost respondentů s krémy

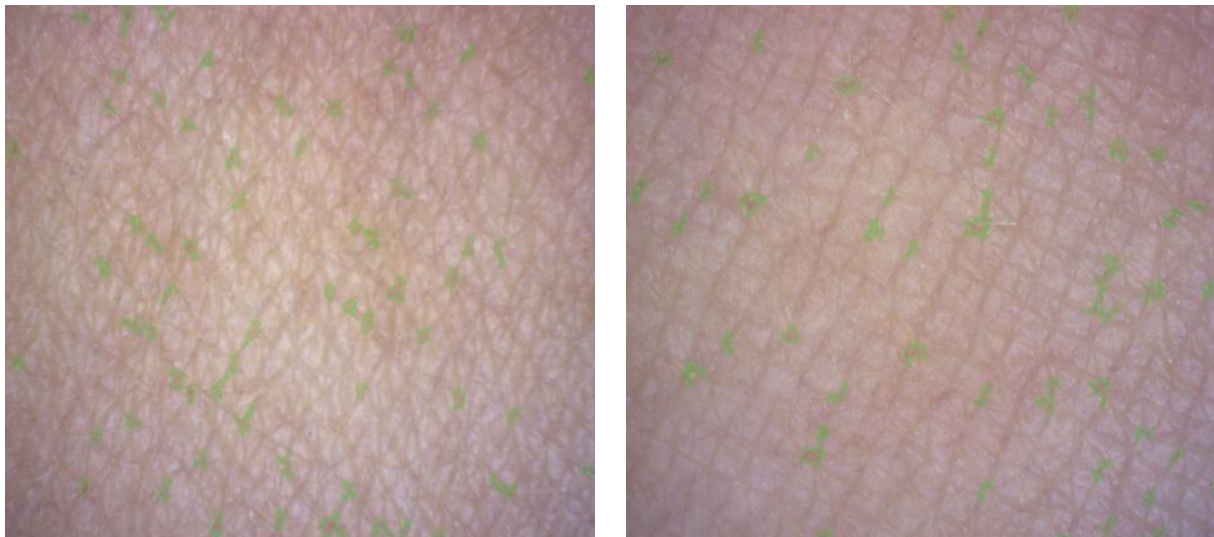
Na tomto grafu lze vidět, jak byli respondenti spokojeni s krémy. Z grafu (Obrázek 37) je patrné, že 2/3 respondentů byly alespoň částečně s krémy spokojeny. Nespokojená byla jen menšina, konkrétně 18,8 %.

Tabulka 12 Parametry kůže po 14denní aplikaci krémů na pokožku

Respondent	Krém	Deskvamace	Póry [%]	Skvrny [%]	Vrásky [%]
1	Před použitím	57,95	2,4	0	16,7
	L1	55,9	1,9	0,0	23,1
	L2	83,1	4,0	0,0	15,1
	L3	54,7	2,2	0,0	20,0
	P1	9,9	3,0	1,4	18,8
	P2	69,9	3,6	0,0	19,2
	P3	67,3	3,1	0,0	18,9
2	Před použitím	53,7	0,6	0,0	23,1
	L1	17,5	1,8	0,9	18,5
	L2	31,0	3,7	0,0	16,8
	L3	8,3	2,5	0,0	15,7
	P1	2,9	3,3	0,0	22,4
	P2	38,2	2,6	0,0	19,9
	P3	37,3	2,7	0,0	19,0
3	Před použitím	80,9	1,4	0,0	24,0
	L1	34,3	2,0	0,0	22,9
	L2	29,6	3,4	0,0	21,6
	L3	73,8	4,1	0,0	20,1
	P1	75,6	2,8	0,0	24,7
	P2	50,4	1,5	0,0	22,8
	P3	68,6	3,7	0,0	19,8
4	Před použitím	55,6	3,0	0,8	18,5
	L1	6,3	2,7	0,0	21,6
	L2	77,3	2,5	0,0	22,6
	L3	63,3	3,2	0,0	23,3
	P1	68,2	2,6	0,0	20,9
	P2	17,0	2,9	1,2	22,9
	P3	14,1	2,3	1,0	18,9
5	Před použitím	45,1	1,7	0,0	19,3
	L1	33,2	2,4	0,0	16,2
	L2	54,0	3,5	0,0	16,0
	L3	19,7	3,4	0,0	15,7
	P1	10,3	3,2	0,0	23,0
	P2	21,5	2,3	0,0	23,3
	P3	15,5	3,1	0,0	19,4

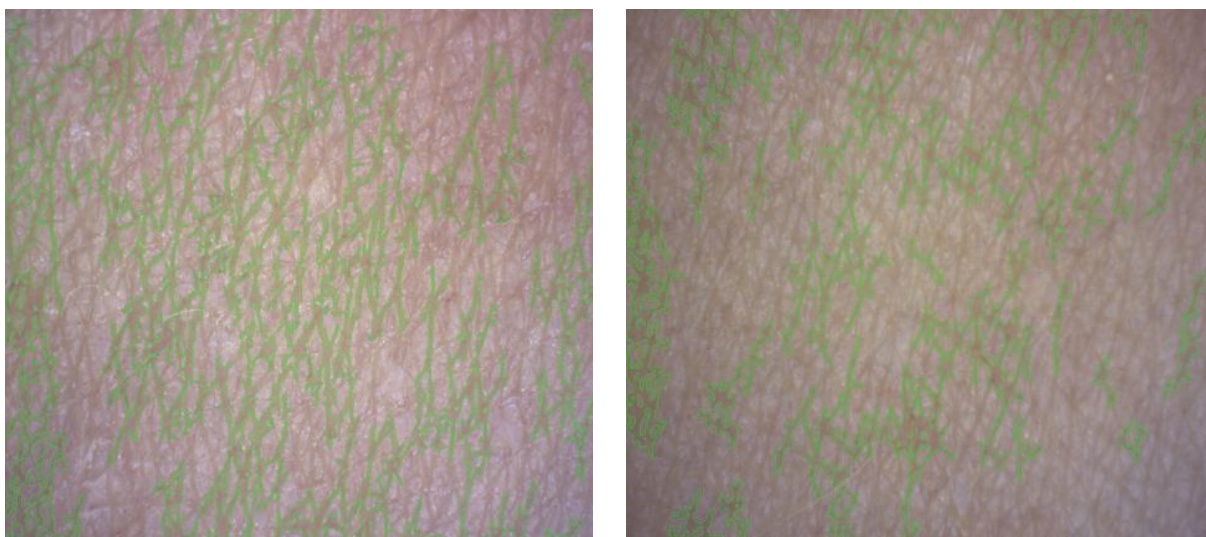
V tabulce můžeme vidět parametry kůže, které byly proměřeny před použitím a po 14ti dnech používání krémů s využitím přístroje Visioscope PC 35 dle postupu uvedeného v kapitole 4.13. U každého respondenta bylo proměřeno 6 míst, kam byly krémy aplikovány. Byla proměřena i produkce kožního mazu, ale ten byl z porovnávaných parametrů vyjmut, protože hodnota byla u všech nulová, a to zřejmě z toho důvodu, že se proměřovala pokožka předloktí, kde se moc mazu nevyskytuje.

Deskvamace (olupování) kůže se u většiny respondentů po používání krémů zlepšila. Procento pórů se mírně zvětšilo, naopak procento skvrn zůstalo stejné, téměř nulové u všech. Nakonec bylo proměřeno procento vrásek, které bylo u každého respondenta individuální. U někoho se mírně zlepšilo, naopak u jiných se zhoršilo.



Obrázek 38 Procento pórů před použitím krému; Po použití krému u respondenta č. 4

Na obrázku Obrázek 38 jde vidět procento pórů před a po 14denním používání krémů. Zlepšení je nepatrné, pouhé 0,3 %, při používání krému L1, což je parafinový krém s přídavkem extraktu *Anabaena*.



Obrázek 39 Procento vrásek před použitím krému; Po použití krému u respondenta č. 2

Na obrázku Obrázek 39 můžeme vidět procento vrásek před a po 14denním používání krému L3, což je krém parafinový s přídavkem extraktu *Spirulina*. Zlepšení vrásek činilo 7,4 %.

5.5.1 Bezpečnost extraktů

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této bakalářské práce (viz 2.8.1), velmi důležitým aspektem je bezpečnost kosmetických přípravků pro děti. Kosmetické produkty by neměly obsahovat škodlivé chemické látky, které jsou karcinogenní, mutagenní, což u některých extraktů představovalo použití methanolu v extrakční směsi. Z tohoto důvodu byl před přidáním do emulze extrakt *Anabeana* v methanol:ethylacetátu odpařen na vakuové rotační odparce a pevný podíl byl rozpuštěn v určitém množství ethanolu.

Po odpaření extrakčního rozpouštědla byl změřen obsah zbytkového methanolu pomocí plynové chromatografie a methanol nebyl detekován.

Do emulzí bylo přidáno pouze malé procento extraktů (3,25 %). Extrakty měly antioxidační účinek, částečný antimikrobiální účinek a neobsahovaly toxická rozpouštědla. Další testy bezpečnosti by přesahovaly rozsah předložené práce a budou provedeny v navazujících studiích.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou kosmetického produktu pro děti s přídavkem přírodního extraktu. Byly připravovány extrakty z řas, sinic, rostlin a kvasinky. Uvedené extrakty byly následně charakterizovány pomocí stanovení koncentrace aktivních látek, jako jsou fenolické látky, chlorofyly, karotenoidy a proteiny. Dále byla změřena antioxidační aktivita, vypočítán SPF faktor, stanoveny mastné kyseliny a testována antimikrobiální aktivita proti *E.coli*. Nakonec byly připraveny krémy, které byly testovány přímo na lidské pokožce.

Extrakce za světla při 37°C do vody, ethanolu a směsi methanol:ethylacetát byly provedeny na komerčně dostupných mikrořasách *Spirulina*, *Ascophyllum nodosum*, *Palmaria palmata* a na rostlině *Centella*. Největší obsah fenolických látek byl změřen u *Spirulina* vitalvibe, zatímco antioxidační aktivita byla nejvyšší u vodných extraktů a u rostliny *Centella*. SPF faktor byl vyšší u ethanolových extraktů.

Extrakce za tmy při 7°C byly provedeny u vzorků mikroorganismů kultivovaných v laboratořích FCH. Bylo zjištěno, že největší obsah fenolických látek a nejvyšší antioxidační aktivitu má *Anabaena* extrahovaná do směsi methanol:ethylacetát. Co se týče SPF faktoru, tak ten byl naopak nejvyšší u *Chroococcidiopsis* extrahovaného do 30% ethanolu.

Byla stanovena antioxidační aktivita i u vybraných rostlin, u kterých se předpokládá, že mají antioxidační vlastnosti. Bylo provedeno srovnání antioxidačních aktivit mikrobiálních extraktů s rostlinnými. Mnohem vyšší antioxidační aktivitu měly rostliny, s těmi se ale dále nepracovalo, protože pěstování rostlin je časově náročné. Z časového hlediska byly vybrány mikroorganismy, které nejsou na kultivaci tak náročné a obsahují podobné aktivní látky, i když v nižší koncentraci.

Dále byly vypočteny obsahy chlorofylů a karotenoidů, nejvyšší obsah chlorofylů i karotenoidů měla řasa *Anabaena*, která byla extrahována do směsi methanol:ethylacetát. U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* bylo vyextrahováno málo karotenoidů z důvodu toho, že kvasinky mají pevné buňky a použité extrakce nestačily pro narušení buněčné stěny kvasinky.

Nakonec byl stanoven obsah mastných kyselin a antimikrobiální účinek sledovaný pomocí bujónové diluční metody. Nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin měla řasa *Scenedesmus acutus*. Obsah nasycených mastných kyselin měly vzorky sinic *Spirulina* přibližně stejný. Nejvíce mononenasycených kyselin bylo stanoveno u sinice *Nostoc*. Nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase měla řasa *Scenedesmus acutus*. Antimikrobiální účinek vybraných extraktů byl pozorovaný na kmenu *E. coli*. Připravené extrakty vykazovaly určitou antimikrobiální účinnost, která se pohybovala v nízkém rozmezí, a to konkrétně mezi 10 – 50 %. Byl stanoven obsah mastných kyselin u komerčních vzorků sinice *Spirulina* a u dvou vzorků, které byly kultivovány na fakultě. Nejvyšší zastoupení polynenasycených mastných kyselin měla řasa *Scenedesmus acutus*, která měla i nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase. Všechny 4 komerčně dostupné vzorky sinice *Spirulina* měly obsah mastných kyselin velmi podobný.

V poslední části byly vybrány 2 extrakty, které měly nejlepší vlastnosti. Jeden byl vlastní vzorek, kultivován na FCH a druhý byl komerčně zakoupen. Byly vybrány extrakty: *Anabaena* b (extrahována do směsi methanol:ethylacetát) a 1D (vodný extrakt *Spirulina* od firmy Ekokoza). Z nich byly vytvořeny 4 emulze.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této bakalářské práce, tak důležitým aspektem je bezpečnost kosmetických přípravků pro děti. Kosmetika nesmí obsahovat škodlivé chemické látky, které jsou karcinogenní, mutagenní, což methanol je. Proto před přidáním do emulze byl extrakt *Anabeana* v směsi methanol:ethylacetát odpařen na vakuové rotační odparce a pevný podíl byl rozpuštěn v daném množství ethanolu. Po odpaření extrakčního rozpouštědla byl změřen obsah zbytkového methanolu pomocí plynové chromatografie a methanol nebyl detekován.

V rámci aplikační části bylo celkem připraveno 6 krémů, parafrinové krémy a krémy s Emulsunem. Tyto emulze byly testovány na lidské pokožce po dobu 14ti dnů. U žádné z testovaných osob se nevyskytlo poškození kůže, jako je ekzém či vyrážka. U emulzí byla hodnocena v rámci senzorické analýzy též konzistence, lesk, roztíratelnost, vstřebatelnost, hydratace a vůně. Po první aplikaci dopadl nejlépe krém s Emulsunem a přidavkem extraktu *Spirulina*, po 14ti dnech bylo hodnocení odlišné a nejlépe dopadl krém parafrinový bez přidavku extraktu.

Celkově lze shrnout, že v rámci práce byly připravovány extrakty z mikroorganismů buď komerčně zakoupených nebo kultivovaných na FCH. Všechny připravené extrakty vykazovaly antioxidační aktivitu a obsahovaly aktivní látky, jako jsou polyfenoly, chlorofyly a karotenoidy. Extrakty byly použity do kosmetických přípravků a otestován jejich účinek in vivo, senzorické vlastnosti a bezpečnost z hlediska obsahu toxických látek. Navazující práce by se mohla zabývat stanovením cytotoxicity všech připravených extraktů, stabilitou vytvořených emulzí a jejich mikroskopickým pozorováním.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] ASIF, Mohammad. Biologically active compounds from natural and marine natural organisms with antituberculosis, antimalarial, leishmaniasis, trypanosomiasis, anthelmintic, antibacterial, antifungal, antiprotozoal, and antiviral activities. *TANG [HUMANITAS MEDICINE]* [online]. 2016, **6**(4), 221-2219 [cit. 2022-04-29]. ISSN 2233-8985. Dostupné z: doi:10.5667/tang.2014.0017
- [2] SHALABY, Emad. *Algae as promising organisms for environment and health* [online]. 2014, **6**(9), 1338-1350 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.4161/psb.6.9.16779
- [3] URBAN, Zdeněk a Tomáš KALINA. *Systém a evoluce nižších rostlin* [online]. Praha: SPN [cit. 2021-11-22]. Dostupné z: <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:d1747d10-869c-11e4-a0ea-005056827e52?page=uuid:b3f18ef0-bc9c-11e4-ba2b-5ef3fc9bb22f&fulltext=Viry,%20prokaryota,%20%C5%99asy,%20houby%20a%20li%C5%A1ejn%C3%ADky>
- [4] RAVEN, John A. a Mario GIORDANO. Algae. *Current Biology* [online]. 2014, **24**(13), 590-595 [cit. 2022-04-19]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2014.05.039
- [5] DOMOZYCH, David S., Marina CIANCIA, Jonatan U. FANGEL, Maria Dalgaard MIKKELSEN, Peter ULVSKOV a William G. T. WILLATS. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2012, **3** [cit. 2022-04-19]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2012.00082
- [6] PEPPER, Ian L. a Terry J. GENTRY. Microorganisms Found in the Environment. *Environmental Microbiology* [online]. Elsevier, 2015, 9-36 [cit. 2022-04-19]. ISBN 9780123946263. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00002-8
- [7] *Algae* [online]. In: . [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <http://www.scienceclarified.com/A-Al/Algae.html>
- [8] AGUSTINA, S, N N AIDHA, E OKTARINA a I SETIAWATI. Antioxidant activity of Porphyridium cruentum water extracts for cosmetic cream. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2020, **980**(1) [cit. 2022-03-23]. ISSN 1757-8981. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/980/1/012042
- [9] FRANK, H.A. a R.J. COGDELL. 8.6 Light Capture in Photosynthesis. *Comprehensive Biophysics* [online]. Elsevier, 2012, 94-114 [cit. 2022-04-19]. ISBN 9780080957180. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00808-0

- [10] *Culture collection of autotrophic organisms* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://ccala.butbn.cas.cz/en>
- [11] RAI, Shiva Kumar, Dennis J. NÜRNBERG, Gregor L. WEISS, Martin PILHOFER a Karina STUCKEN. Occurrence of genus *Scenedesmus* Mayen (Chlorophyceae) from East Nepal: Biology and Pathogenesis. *Nepalese Journal of Biosciences* [online]. 2021, **3**(1), 26-37 [cit. 2022-04-18]. ISSN 2091-1343. Dostupné z: doi:10.3126/njbs.v3i1.41425
- [12] LE GALL, L, Muhammad JAHANGIR, Robert VERPOORTE a Young Hae CHOI. Cultivation of *Palmaria palmata* (Palmariales, Rhodophyta) from isolated spores in semi-controlled conditions. *Aquaculture* [online]. 2004, **229**(1-4), 181-191 [cit. 2022-04-21]. ISSN 00448486. Dostupné z: doi:10.1016/S0044-8486(03)00390-9
- [13] MOURITSEN, Ole G, Lars WILLIAMS, Rasmus BJERREGAARD a Lars DUELUND. Seaweeds for umami flavour in the New Nordic Cuisine. *Flavour* [online]. 2012, **1**(1) [cit. 2022-04-21]. ISSN 2044-7248. Dostupné z: doi:10.1186/2044-7248-1-4
- [14] PEREIRA, Leonel, Liam MORRISON, Pushp Sheel SHUKLA a Alan T. CRITCHLEY. A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2020, **32**(6), 3561-3584 [cit. 2022-04-21]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-020-02246-6
- [15] HÄDER, Donat-P. Phycocolloids from macroalgae. *Natural Bioactive Compounds* [online]. Elsevier, 2021, 187-201 [cit. 2022-04-21]. ISBN 9780128206553. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820655-3.00009-4
- [16] SIVONEN, K. Cyanobacterial Toxins. *Encyclopedia of Microbiology* [online]. 3. San Diego State University, San Diego, CA, USA, 2009, s. 290 - 307 [cit. 2022-01-24]. ISBN 9780123739445. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739445000055>
- [17] DOSTÁL, Petr. *Evoluce a systém stélkatých organismů a cévnatých výtrusných rostlin*. 1. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2005. ISBN 80-7290-201-6.
- [18] SPRINGSTEIN, Benjamin L., Dennis J. NÜRNBERG, Gregor L. WEISS, Martin PILHOFER a Karina STUCKEN. Structural Determinants and Their Role in Cyanobacterial Morphogenesis. *Life* [online]. 2020, **10**(12) [cit. 2022-04-19]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life10120355
- [19] CHORUS, Ingrid a Jamie BARTRAM. *Toxic Cyanobacteria in Water* [online]. 1. London and New York: E & FN Spon, 1999 [cit. 2022-01-24]. ISBN 0-419-23930-8.

Dostupné z:

https://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxycyanchap2.pdf

- [20] CURTIS, Patrick D. Bacterial Development. *Reference Module in Life Sciences* [online]. Elsevier, 2019 [cit. 2022-04-15]. ISBN 9780128096338. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20669-9
- [21] SHIMKETS, L.J. Development, Prokaryotic: Variety and Versatility☆. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2015 [cit. 2022-04-16]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02310-2
- [22] KOMÁREK, Jiří, Hedy KLING a Jaroslava KOMÁRKOVÁ. FILAMENTOUS CYANOBACTERIA. *Freshwater Algae of North America* [online]. Elsevier, 2003, 117-196 [cit. 2022-04-16]. ISBN 9780127415505. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012741550-5/50005-2
- [23] FABROWSKA, Joanna, Beata MESSYASZ, Jakub SZYLING, Jędrzej WALKOWIAK a Bogusława ŁĘSKA. Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycological Research* [online]. 2018, **66**(1), 52-57 [cit. 2022-03-23]. ISSN 13220829. Dostupné z: doi:10.1111/pre.12191
- [24] VONSHAK, AVIGAD. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology CellBiology And Biotechnology* [online]. UK: Taylor & Francis Ltd, 1997 [cit. 2022-04-16]. ISBN 0-203-48396-0. Dostupné z: <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Vonshak-A/1997-Vonshak-S.pdf>
- [25] *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences: A Review: Spirulina a source of bioactive compounds and nutrition* [online]. 2017, [cit. 2022-04-16]. ISSN 0974-2115. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/318119453_A_Review_Spirulina_a_source_of_bioactive_compounds_and_nutrition
- [26] CHANDRIKA, Udumalagala Gamage a Peramune A.A.S. PRASAD KUMARA. *Gotu Kola (Centella asiatica)* [online]. Elsevier, 2015, 125-157 [cit. 2022-04-21]. *Advances in Food and Nutrition Research*. ISBN 9780128036068. Dostupné z: doi:10.1016/bs.afnr.2015.08.001
- [27] PRASAD, Archana, A.K. MATHUR a Archana MATHUR. Advances and emerging research trends for modulation of centelloside biosynthesis in *Centella asiatica* (L.) Urban- A review. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, **141** [cit. 2022-04-21]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2019.111768
- [28] GE, Ye, Kaisen HUANG, Weitian XIE, Chunhou XU, Qiucheng YAO a Ying LIU. Effects of *Rhodotorula mucilaginosa* on the Immune Function and Gut Microbiota of

- Mice. *Frontiers in Fungal Biology* [online]. 2021, **2** [cit. 2022-04-28]. ISSN 2673-6128. Dostupné z: doi:10.3389/ffunb.2021.705696
- [29] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha: Academia, 2008. ISBN 80-200-1024-6.
- [30] SINGH, Rachana, Parul PARIHAR, Madhulika SINGH, Andrzej BAJGUZ, Jitendra KUMAR, Samiksha SINGH, Vijay P. SINGH a Sheo M. PRASAD. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2022-04-19]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00515
- [31] RAO, V. Rajeswer. Antioxidant Agents. *Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives* [online]. Elsevier, 2016, 137-150 [cit. 2022-03-23]. ISBN 9780128037973. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803797-3.00007-2
- [32] ZHUANG, Dingling, Ning HE, Kuan Shiong KHOO, Eng-Poh NG, Kit Wayne CHEW a Tau Chuan LING. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere* [online]. 2022, **291** [cit. 2022-03-23]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132932
- [33] POKORNÝ, Jan. Are natural antioxidants better – and safer –than synthetic antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2007, **109**, 14 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.2007000646291
- [34] ROLEIRA, Fernanda M.F., Carla L. VARELA, Saul C. COSTA a Elisiário J. TAVARES-DA-SILVA. *Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity* [online]. Elsevier, 2018, 115-156 [cit. 2022-03-23]. Studies in Natural Products Chemistry. ISBN 9780444640574. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1
- [35] KUMAR, Ashok, Utkarsh DIXIT, Kaman SINGH, Satya PRAKASH GUPTA, Mirza S. JAMAL BEG a Akansha PATEL. Structure and Properties of Dyes and Pigments: potential risk to human health and possible remediation. *Dyes and Pigments - Novel Applications and Waste Treatment* [online]. IntechOpen, 2021, 157-172 [cit. 2022-04-18]. ISBN 978-1-83968-614-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.97104
- [36] JOHNSON, Matthew P. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* [online]. 2016, **60**(3), 255-273 [cit. 2022-04-19]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20160016
- [37] ROSS, A.C., B. H. CABALLERO, R. J. COUSINS, K. L. TUCKER a T. R. ZIEGLER. *Modern nutrition in health and disease* [online]. 11. Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2012 [cit. 2022-04-15]. ISBN 9781469816593. Dostupné z:

<https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/modern-nutrition-in-health-and-disease-eleventh-edition>

- [38] TAKAICHI, Shinichi. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* [online]. 2011, **9**(6), 1101-1118 [cit. 2022-04-19]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md9061101
- [39] ZHUANG, Dingling, Ning HE, Kaun Shiong KHOO, Eng-Poh NG, Kit Wayne CHEW a Tau CHAUN. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Science Direct* [online]. 2022, (2) [cit. 2022-02-15]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132932>
- [40] BALIGA, Manjeshwar Shrinath, Arnadi Ramachandrayya SHIVASHANKARA, Sunitha VENKATESH, Harshith P. BHAT, Princy Louis PALATTY, Ganesh BHANDARI a Suresh RAO. Phytochemicals in the Prevention of Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *Dietary Interventions in Liver Disease* [online]. Elsevier, 2019, 79-89 [cit. 2022-04-19]. ISBN 9780128144664. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814466-4.00007-0
- [41] MATSUURA, Hiroshi, Makoto M. WATANABE a Kunimitsu KAYA. Echinenone production of a dark red-coloured strain of *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2012, **24**(4), 973-977 [cit. 2022-04-19]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-011-9719-7
- [42] NOVÁKOVÁ, Michaela, Tereza FÁBRYOVÁ, Doris VOKURKOVÁ, Iva DOLEČKOVÁ, Jiří KOPECKÝ, Pavel HROUZEK, Lenka TŮMOVÁ a José CHEEL. Separation of the Glycosylated Carotenoid Myxoxanthophyll from *Synechocystis Salina* by HPLC and Evaluation of Its Antioxidant, Tyrosinase Inhibitory and Immune-Stimulating Properties. *Separations* [online]. 2020, **7**(4) [cit. 2022-04-19]. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations7040073
- [43] HARDO PANINTINGJATI BRODOSUDARMO, Tatas, Leenawaty LIMANTARA, Rosita DWI CHANDRA a HERIYANTO. Chloroplast Pigments: Structure, Function, Assembly and Characterization. *Plant Growth and Regulation - Alterations to Sustain Unfavorable Conditions* [online]. IntechOpen, 2018 [cit. 2022-04-15]. ISBN 978-1-78984-285-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.75672
- [44] CHAUDHARY, Vinod Kumar, Shailendra Kumar SINGH, Arun Lal SRIVASTAV, Anurag SINGH, Naveen PATEL a Akansha PATEL. Chemical water contaminants: potential risk to human health and possible remediation. *Contamination of Water* [online]. Elsevier, 2021, 157-172 [cit. 2022-04-19]. ISBN 9780128240588. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824058-8.00001-3
- [45] *Microbial Toxicity Studies* [online]. [cit. 2022-02-15]. ISBN 978-81-322-0864-8.

- [46] Final Report on the Safety Assessment of Methyl Alcohol. *International Journal of Toxicology* [online]. 20(2), 57-85 [cit. 2022-05-14]. ISSN 1092874X. Dostupné z: doi:10.1080/109158101750300955
- [47] ČÍŽKOVÁ, Eva. *Kosmetické přípravky*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., 2017. Průvodce spotřebitele. ISBN 978-80-87719-55-8.
- [48] DUTRA, Elizângela Abreu, Daniella Almança Gonçalves da Costa OLIVEIRA, Erika Rosa Maria KEDOR-HACKMANN a Maria Inês Rocha Miritello SANTORO. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [online]. 2004, 40(3), 381-385 [cit. 2022-04-15]. ISSN 1516-9332. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-93322004000300014
- [49] GRÖBNER, Julian. Ultraviolet Radiation ultraviolet radiation (UV): Distribution ultraviolet radiation (UV) distribution and Variability ultraviolet radiation (UV) variability. *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology* [online]. New York, NY: Springer New York, 2012, 11149-11158 [cit. 2022-04-16]. ISBN 978-0-387-89469-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-0851-3_453
- [50] LIU, H., B. HU, L. ZHANG, X.J. ZHAO, K.Z. SHANG, Y.S. WANG a J. WANG. Ultraviolet radiation over China: Spatial distribution and trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2017, 76, 1371-1383 [cit. 2022-04-16]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.03.102
- [51] WRIGHT, Fiona a Richard B. WELLER. Risks and benefits of UV radiation in older people: More of a friend than a foe?. *Maturitas* [online]. 2015, 81(4), 425-431 [cit. 2022-04-16]. ISSN 03785122. Dostupné z: doi:10.1016/j.maturitas.2015.05.003
- [52] KOKTAVÝ, Pavel. Přehled hygienických a kosmetických přípravků pro děti. *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, 12(5), 4 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/05/19.pdf>
- [53] *Kosmetika*. 1. Praha: Praha: Práce, 1968. ISBN 24-082-68.
- [54] HARALD, Bresser. *Krása a zdraví kůže*. 1. Olomouc: Dobra & Fontána, 1999. ISBN 80-86179-24-9.
- [55] MOURELLE, M., Carmen GÓMEZ a José LEGIDO. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. *Cosmetics* [online]. 2017, 4(4) [cit. 2022-03-23]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics4040046
- [56] SAHA, Swastika, Sushil K. SHUKLA, Hare R. SINGH, Bhaskar SINGH a Santosh K. JHA. Bioactive compounds from microalgae. *An Integration of Phycoremediation*

- Processes in Wastewater Treatment* [online]. Elsevier, 2022, 337-358 [cit. 2022-04-19]. ISBN 9780128234990. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823499-0.00005-5
- [57] SURABHI, Joshi, Mishra K ROSHANI a Vivek NARAYAN UPASANI. Applications of algae in cosmetics. *International Journal of Innovative Research in Science: Engineering and Technology* [online]. 2018, 7(2), 10 [cit. 2022-05-15]. Dostupné z: doi:10.15680/IJIRSET.2018.0702038
- [58] ROSALES LOAIZA, Néstor, Patricia VERA, Cateryna AIELLO-MAZZARRI a Ever MORALES. COMPARATIVE GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FOUR STRAINS OF Nostoc AND Anabaena (CYANOBACTERIA, NOSTOCALES) IN RELATION TO SODIUM NITRATE. *Acta Biológica Colombiana* [online]. 2016, 21(2), 347-354 [cit. 2022-05-18]. ISSN 1900-1649. Dostupné z: doi:10.15446/abc.v21n2.48883
- [59] ARGUELLES, Eldrin. TOTAL PHENOLIC CONTENT AND IN VITRO ANALYSIS OF ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, AND ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION PROPERTIES OF CHROOCOCCUS MINUTUS (KÜTZING) NÄGELI (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA). *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* [online]. 170-181 [cit. 2022-05-17]. ISSN 1015-3918. Dostupné z: doi:10.33483/jfpau.1005986
- [60] SALLAL, A. K., N. A. NIMER a S. S. RADWAN. Lipid and fatty acid composition of freshwater cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* [online]. 1990, 136(10), 2043-2048 [cit. 2022-05-18]. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-136-10-2043

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS: 2,2'-azinobis[3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát]

SPF: Faktor ochrany před slunečním zářením

TEAC: Antioxidační kapacita ekvivalentní

Troloxu Trolox: 6-hydroxy2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

UV záření: Ultrafialové záření

UVA: Ultrafialové záření v oblasti od 400 nm do 320 nm

UVB: Ultrafialové záření v oblasti od 320 nm do 280 nm

UVC: Ultrafialové záření v oblasti od 280 nm do 100 nm

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1

Tabulka 13 Složení Fe-EDTA roztoku

Fe-EDTA	
Látka	Množství
HCl (35%)	2,2 ml
dH ₂ O	250 ml
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4,5 g
Na ₂ EDTA	4,65 g

Tabulka 14 složení Trace metal roztoku

Trace metal	
Látka	Množství na 100 ml [g]
H ₃ BO ₃	0,31
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,223
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,003
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,0088
KBr	0,0119
KI	0,0083 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0287
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,0154
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0146
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0125
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	0,0198
Cr(NO ₃) ₂ ·7H ₂ O	0,0037
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	0,0035
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	0,0474

9.2 Příloha 2

Dětská kosmetika

1. Věk dítěte

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ 0 - 6 měsíců
☐ 6 - 12 měsíců
☐ 1 - 3 roky
☐ 3 - 5 let
☐ 5+

2. Zkoušíte ráda nové značky kosmetiky?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Ano
☐ Spíše ano
☐ Spíše ne
☐ Ne

3. Když si kupujete nový produkt, je pro Vás důležité první fyzicky prohlédnout produkt (jak lákavý má obal)?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Ano
☐ Spíše ano
☐ Spíše ne
☐ Ne

7. Co Vás ovlivňuje při koupi nového produktu?

Zaškrtněte všechny platné možnosti.

- ☐ Recenze
☐ Cena
☐ Vzhled
☐ Vůně
☐ Značka
☐ Jiné: _____

8. Jaký typ produktu kupujete?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Tělové mléko
☐ Tělový krém
☐ Tělový olej
☐ Mast
☐ Jiné: _____

9. Jakou konzistenci produktu upřednostňujete?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Gelovitá
☐ Mastná
☐ Lehká
☐ Jiné: _____

4. Věnujete pozornost složení kosmetických produktů, které kupujete?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Ano
☐ Spíše ano
☐ Spíše ne
☐ Ne

5. Jaké látky, které jsou obsaženy v konveční kosmetice, by podle Vás neměly být v přírodní?

Zaškrtněte všechny platné možnosti.

- ☐ Silikony
☐ Syntetická barviva
☐ Sulfáty
☐ Hliník
☐ Ropné látky a deriváty ropy
☐ Jiné: _____

6. Dáváte přednost přírodní kosmetice?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Ano
☐ Spíše ano
☐ Spíše ne
☐ Ne

10. Co od daného produktu očekáváte?

Označte jen jednu elipsu.

- ☐ Ochranu vůči Slunci
☐ Hydrataci
☐ Zklidňující účinek
☐ Léčivý účinek
☐ Jiné: _____

	1	2	3	4	5
L1	☐	☐	☐	☐	☐
L2	☐	☐	☐	☐	☐
L3	☐	☐	☐	☐	☐
P1	☐	☐	☐	☐	☐
P2	☐	☐	☐	☐	☐
P3	☐	☐	☐	☐	☐

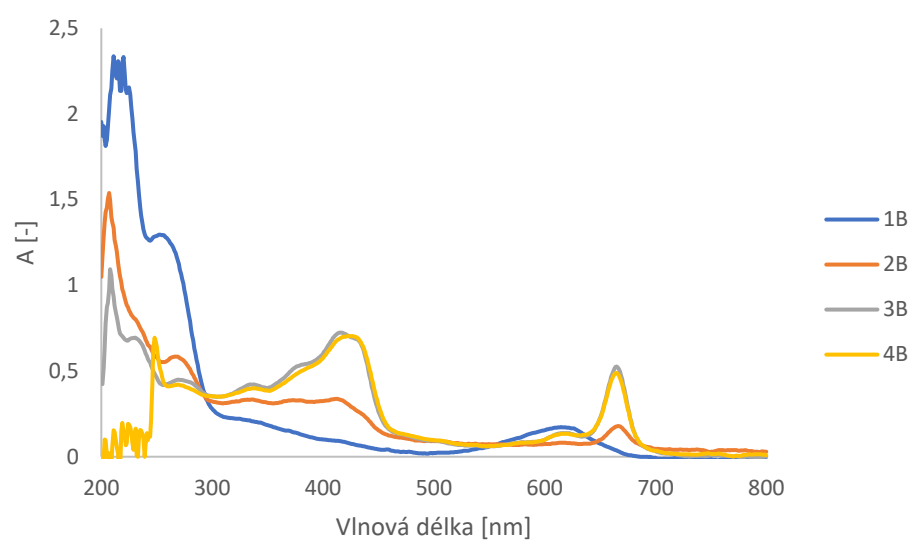
14. Seřadte krémy od nejlepšího po nejhorší (1 - nejlepší) *

Zaškrtněte všechny platné možnosti.

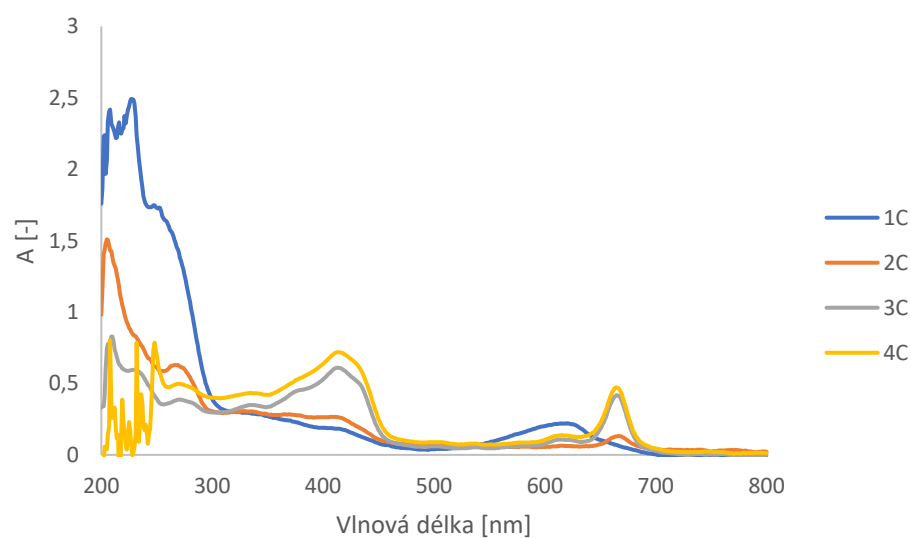
	1	2	3	4	5	6
L1	☐	☐	☐	☐	☐	☐
L2	☐	☐	☐	☐	☐	☐
L3	☐	☐	☐	☐	☐	☐
P1	☐	☐	☐	☐	☐	☐
P2	☐	☐	☐	☐	☐	☐
P3	☐	☐	☐	☐	☐	☐

15. Co byste na testovaných produktech vylepšili nebo změnili? *

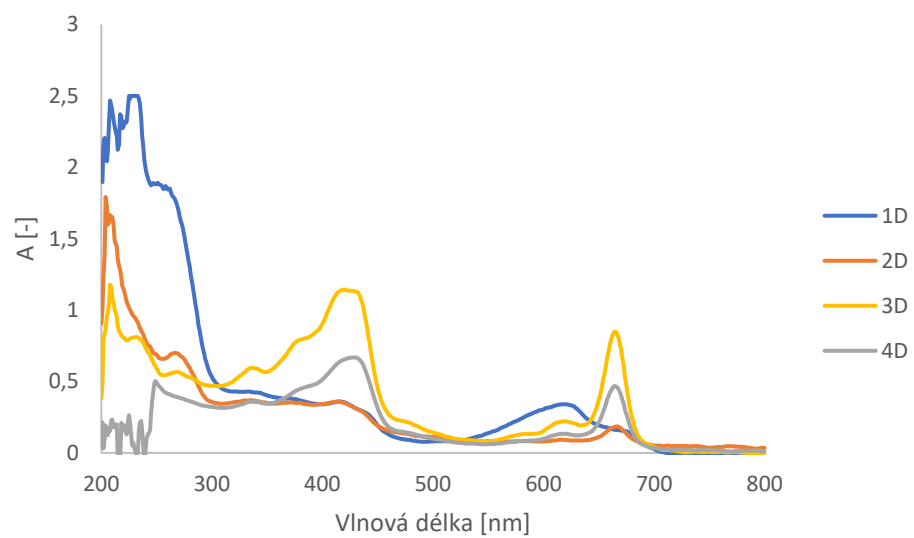
9.4 Příloha 4



Absorpční spektrum Bio Spiruliny ve 4 různých extrakčních rozpouštědlech

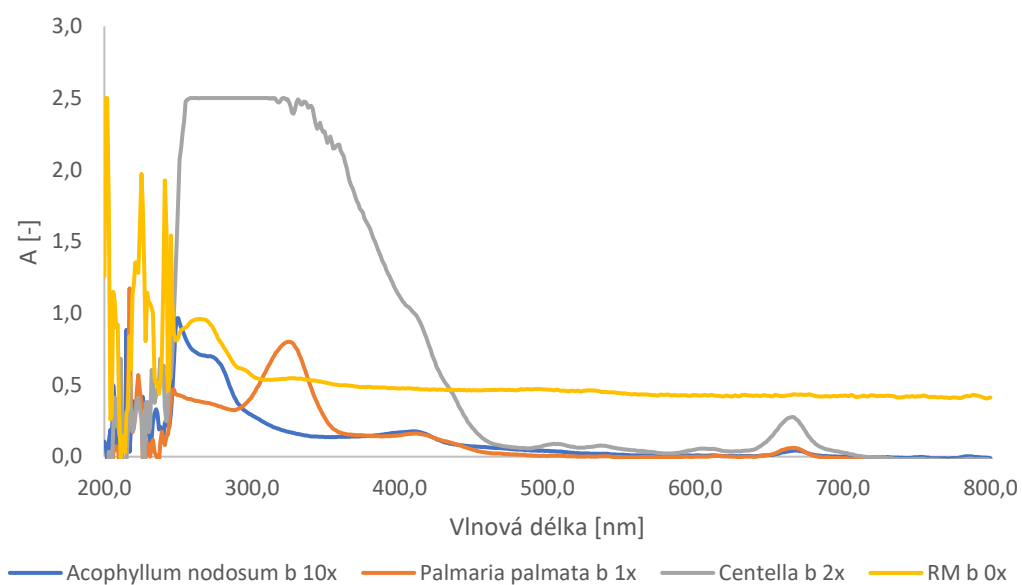


Absorpční spektrum Algae Spiruliny ve 4 různých extrakčních rozpouštědlech



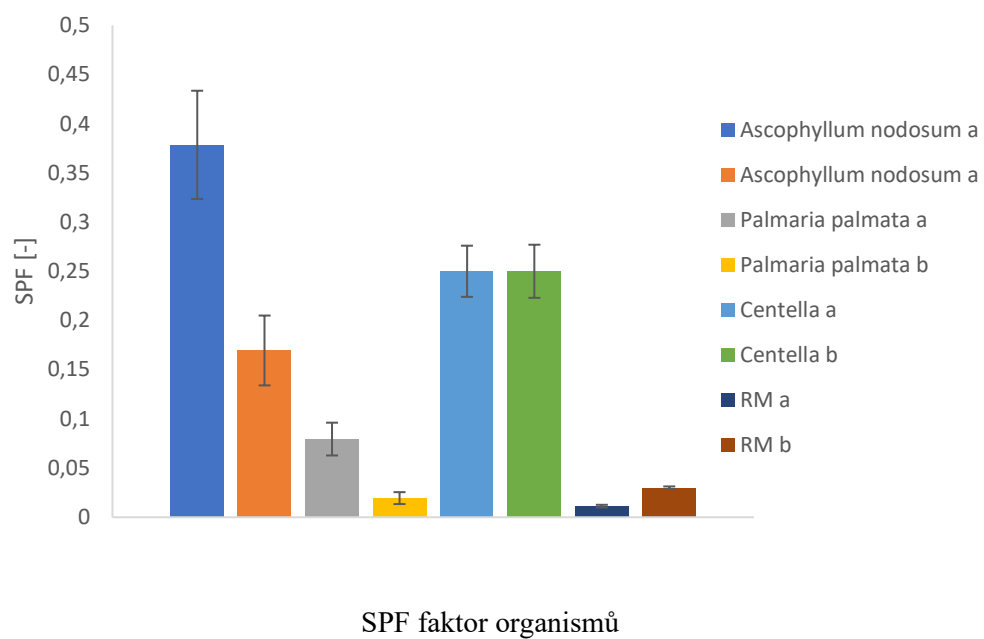
Absorpční spektrum Spiruliny Ekokozy ve 4 různých extrakčních rozpouštědlech

9.5 Příloha 5

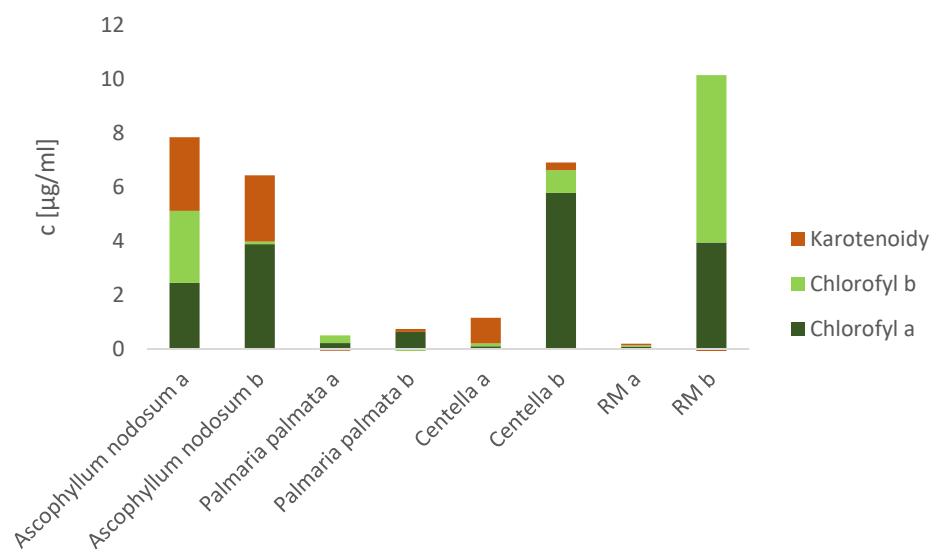


Absorpční spektrum s extrakčním rozpouštědlem methanol:ethylacetát (1:1)

9.6 Příloha 6



9.7 Příloha 7



Obsah chlorofylů a karotenoidů

9.8 Příloha 8

Tabulka 15 Seznam zkratk uvedených v grafech

Zkratka	Vysvětlení
1B	Bio <i>Spirulina</i> ve vodě
1C	<i>Spirulina</i> Algae ve vodě
2B	Bio <i>Spirulina</i> v 60% ethanolu
3B	Bio <i>Spirulina</i> v 96% ethanolu
4A	<i>Spirulina</i> Vitalvibe v methanol:ethylacetátu
4D	<i>Spirulina</i> Ekokoza v methanol:ethylacetátu

