



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# ENKAPSULACE AKTIVNÍCH LÁTEK A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE V ANTI- AGING KOSMETICE

ENCAPSULATION OF ACTIVE SUBSTANCES AND POSSIBILITIES OF THEIR  
APPLICATION IN ANTI-AGING PRODUCTS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Iveta Horváthová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1702/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Iveta Horváthová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Enkapsulace aktivních látek a možnosti jejich aplikace v anti-aging kosmetice

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Příprava různých typů liposomových částic s obsahem vybraných aktivních látek
- 3) Charakterizace připravených nanočástic a ověření možnosti jejich aplikace v kosmetických produktech
- 4) Testování interakce připravených liposomů s humánními kožními buňkami
- 5) Vyhodnocení výsledků a diskuse

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.

Toto zadání je součástí diplomové práce.

---

Bc. Iveta Horváthová

studentka

---

Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.

vedoucí práce

---

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

---

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.

děkan

## **Abstrakt**

Diplomová práce byla zaměřena na enkapsulaci vybraných aktivních látek a možnosti jejich aplikace v kosmetických produktech s anti-aging účinky. Bylo vybráno 6 aktivních látek odlišného charakteru – lipofilní vitamín E a vitamín A, hydrofilní vitamín B<sub>1</sub> a vitamín B<sub>2</sub>, a fenolické látky kyselina ferulová a kyselina chlorogenová. Teoretická část byla zaměřena na obecnou charakteristiku vybraných aktivních látek, jejich využití a popis používaných metod. V rámci praktické části byly charakterizovány aktivní látky z hlediska jejich antioxidační aktivity a následně enkapsulovány do liposomů ze sójového a slunečnicového lecitinu. U připravených liposomů byla stanovována enkapsulační účinnost, velikost, stabilita a dlouhodobá stabilita po 4 týdnech skladování. Následně byly vybrány nejvhodnější liposomy s obsahem aktivních látek, u kterých byla rovněž analyzována jejich bezpečnost pro lidské kožní buňky pomocí MTT testu cytotoxicity na keratinocytech HaCaT. Dále byly připraveny 3 typy kosmetických výrobků – denní krém, noční krém a pleťové sérum. Každý druh kosmetického výrobku byl dále rozdělen na 4 typy – výrobek neobsahující žádné aktivní látky, výrobek obsahující aktivní látky v neenkapsulované formě, výrobek obsahující aktivní látky v enkapsulované formě a výrobek obsahující prázdné liposomy. Jako účinné látky byly přidány všechny naše testované látky. Finální produkty byly testovány 14 dní na 15 dobrovolnicích. Před a po používání produktů byly změřeny parametry pokožky a tím byl analyzován vliv přípravků na omlazení pokožky. Dále dobrovolnice hodnotily sensorickou analýzu kosmetických produktů. Součástí této práce bylo také zpracování online dotazníku ohledně anti-aging kosmetiky pro veřejnost, abychom zjistili, do jaké míry je tento druh kosmetiky mezi lidmi populární.

## **Klíčová slova**

Vitamíny, fenolické látky, antioxidační aktivita, liposomy, anti-aging kosmetika, keratinocyty, MTT testy

## **Abstract**

The aims of this thesis were encapsulation of selected active substances and their possible application in cosmetic products with anti-aging effects. 6 kinds of active substances were studied – lipophilic vitamin E and vitamin A, hydrophilic vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>2</sub>, and phenolic compounds ferulic acid and chlorogenic acid. In theoretical part, the general characteristics of active compounds and their use are described. It also includes the description of used methods. Practical part was focused on characterisation of active compounds from the perspective of antioxidant activity and encapsulation into liposomes from soy and sunflower lecithin. Encapsulation effectivity, size, stability and long-term stability of liposomes after four weeks were determined. The most suitable liposomes with active compounds were also tested for safety on human skin cells using the MTT test of cytotoxicity on keratinocytes HaCaT. Furthermore, 3 types of cosmetic products were prepared – day cream, night cream and skin serum. Each kind of cosmetic product was divided into 4 types – the product without any active compounds, the product containing free active compounds, the product with liposomes with active compounds and the product containing empty liposomes. As active compounds all our tested substances were used. Final products were tested 14 days on 15 female volunteers. Before and after products usage parameters of their skin were measured to analyze effect of products on skin rejuvenation. Volunteers were also rating sensory analysis of cosmetic products. The part of this thesis was also creating an online questionnaire about anti-aging cosmetics for publicity to find out the popularity of this kind of cosmetics.

## **Keywords**

Vitamins, phenolic compounds, antioxidant activity, liposomes, anti-aging cosmetics, keratinocytes, MTT tests

HORVÁTHOVÁ, Iveta. *Enkapsulace aktivních látek a možnosti jejich aplikace v anti-aging kosmetice* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138747>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petra Skoumalová.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Skoumalové, Ph.D. za vedení mé práce a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Agátě Bendové a Ing. Renatě Uhlířové za jejich čas, pomoc a trpělivost v laboratořích a při zpracovávání výsledků. Mé poděkování také patří ochotným kolegyním, doktorandkám a laborantkám fakulty chemické, které si daly práci a čas při testování vyrobených kosmetických produktů. Nakonec bych chtěla poděkovat mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

# OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Vitamíny .....	10
2.1.1 Vitamíny skupiny B .....	10
2.1.2 Vitamín B <sub>1</sub> .....	10
2.1.3 Vitamín B <sub>2</sub> .....	12
2.2 Vitamín A .....	13
2.2.1 Struktura a vlastnosti .....	13
2.2.2 Význam a výskyt.....	14
2.2.3 Nedostatek a nadbytek.....	14
2.3 Vitamín E.....	14
2.3.1 Struktura a vlastnosti .....	14
2.3.2 Význam a výskyt.....	15
2.3.3 Nedostatek a nadbytek.....	15
2.4 Fenolické látky .....	15
2.4.1 Kyselina chlorogenová .....	16
2.4.2 Kyselina ferulová .....	17
2.5 Využití v kosmetickém a potravinářském průmyslu.....	18
2.5.1 Kyselina chlorogenová .....	18
2.5.2 B-komplex .....	19
2.5.3 Vitamín E.....	19
2.5.4 Vitamín A .....	19
2.5.5 Kyselina ferulová .....	19
2.7 Antioxidační aktivita .....	19
2.8 Kůže.....	20
2.8.1 Pokožka .....	20
2.8.2 Škára .....	20
2.8.3 Podkožní vazivo .....	21
2.8.4 Absorpční schopnost kůže .....	21
2.8.5 Stárnutí kůže .....	21
2.9 Buněčné kultury .....	21
2.9.1 Keratinocyty.....	21

2.9.2	MTT test cytotoxicity .....	22
2.10	Enkapsulace .....	22
2.10.1	Sprejové sušení .....	22
2.10.2	Kokrystalizace.....	23
2.10.3	Emulgace .....	23
2.10.4	Enkapsulace do liposomů .....	23
2.11	Metody analýzy .....	25
2.11.1	Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla.....	25
2.11.2	Stanovení stability částic pomocí potenciálu zeta.....	25
3.	Experimentální část.....	26
3.1	Použité přístroje a chemikálie .....	26
3.1.1	Použité přístroje a pomůcky .....	26
3.1.2	Použité chemikálie ke spektrometrickým stanovením .....	26
3.1.3	Použité chemikálie pro přípravu zásobních roztoků a liposomů .....	26
3.1.4	Použité chemikálie pro HPLC .....	26
3.1.5	Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT testy.....	27
3.2	Použité humánní buňky .....	27
3.3	Příprava vybraných látek .....	27
3.4	Stanovení antioxidační aktivity.....	27
3.5	Příprava liposomů .....	28
3.5.1	Charakterizace připravených liposomů .....	28
3.6	Kultivace keratinocytů.....	29
3.6.1	Výměna živného média .....	30
3.6.2	Pasážování .....	30
3.7	MTT test cytotoxicity .....	30
3.8	Příprava kosmetických produktů a senzorická analýza .....	31
3.8.1	Postup přípravy kosmetických výrobků .....	31
4.	Výsledky a diskuze .....	32
4.1	Stanovení antioxidační aktivity.....	32
4.2	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	33
4.3	Stanovení velikosti a distribuce částic.....	34
4.3.1	Stanovení velikosti a distribuce částic.....	34
4.4	Stanovení dlouhodobé stability .....	35

4.5	Stanovení stability částic .....	36
4.5.1	Stanovení stability částic po 4 týdnech .....	36
4.6	MTT test .....	37
4.7	Analýza parametrů kůže po používání připravených kosmetických produktů.....	40
4.8	Senzorické vyhodnocení pořadových testů.....	50
4.9	Dotazník o anti-aging kosmetice.....	53
5.	Závěr .....	54
6.	Zdroje.....	56
7.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	62
8.	Přílohy.....	63



## 1. ÚVOD

Kosmetické výrobky jsou využívány lidmi již po velmi dlouhou dobu. Pro své rozsáhlé užití se s kosmetikou setkáváme denně a stala se tak důležitou součástí našeho života. Mezi její role patří zejména péče o pleť, léčení kožních chorob, péče o vlasy a nehty a v neposlední řadě také zkrášlování. Vzhledem k tomu, že si lidé chtějí udržet co nejdéle mladý vzhled, jsou nyní velmi oblíbené přípravky na omlazení pokožky. Tyto přípravky obsahují látky, které mají antioxidační účinky. Mezi nejznámější antioxidační látky patří například vitamín E nebo vitamín C, které bývají často obsaženy právě v kosmetice proti stárnutí pleti. Tyto látky se podílí na zachytávání volných radikálů, které poškozují molekuly důležité pro náš organismus. Při pravidelném používání výrobků s antioxidanty by mohlo dojít ke zpomalení projevů stárnutí pleti, ovšem důležitý je také náš životní styl, který má na biologické stárnutí velký vliv.

Aby aktivní látky prošly do kůže tam, kam potřebujeme, je potřeba je nějakým způsobem nerušeně transportovat. Z tohoto důvodu jsou oblíbeným odvětvím kosmetiky nanotechnologie, které dokáže účinnou látku zabalit a transportovat na cílené místo bez toho, aniž by cestou unikala. V kosmetice se uplatňuje enkapsulace aktivních substancí do tzn. liposomů. Krom toho enkapsulace zamezuje možné degradaci aktivní látky při výrobě, skladování a užívání.

Tato práce se zaměřuje na využití 6 aktivních látek v anti-aging kosmetice, které jsou známé pro své blahodárné účinky na pleť. Vitamín B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> jsou důležité pro správné fungování pokožky, vitamín A pomáhá s regenerací pokožky, a vitamín E, kyselina chlorogenová a ferulová jsou významné antioxidanty. Kombinací těchto látek můžeme dosáhnout nejen dobrého stavu pleti a zpomalení procesů stárnutí, ale také díky antimikrobiálnímu charakteru mohou být přípravky s obsahem těchto látek nápomocné při léčbě akné, které je v populaci velmi rozšířené.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vitamíny

Vitamíny jsou organické, nízkomolekulární látky, které v našem organismu plní různé funkce. Vzhledem k tomu, že si je tělo nedokáže syntetizovat samo, nebo alespoň ne v dostatečných dávkách, je potřeba je přijímat potravou. Nedostatek může vést k chorobným projevům a léčí se dodáním deficitních vitamínů. Strukturně se jedná o nejednotnou skupinu látek, často obsahují více složek různé chemické povahy. Vitamíny dělíme na dvě hlavní skupiny, a to na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích [1].

Mezi vitamíny rozpustné ve vodě řadíme vitamín C a vitamíny skupiny B. Tyto vitamíny plní funkci koenzymů a účastní se řady biochemických reakcí, například metabolismu a biosyntézy aminokyselin nebo slouží jako antioxidanty [2].

Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří vitamíny A, D, E a K. Jsou strukturně podobné isoprenoidním polymerům a rozpouští se v lipidech či olejích. V organismu se ukládají v tukové tkáni a v játrech a z těla se vylučují pomalu díky své lipofilní povaze. Příliš vysoký příjem vitamínů rozpustných v tucích může způsobit hypervitaminózu, která má specifické příznaky [3].

#### 2.1.1 Vitamíny skupiny B

B-vitamíny, jinak také B-komplex, je skupina 8 hydrofilních vitamínů. Vitamíny rozpustné ve vodě se na rozdíl od lipofilních neskladují v těle, ale jejich nadbytek je vylučován močí. Tyto vitamíny se vyskytují většinou v potravě společně, jelikož podstatné funkce metabolismu zajišťují pohromadě. Působí jako koenzymy řady anabolických a katabolických enzymatických reakcí. Jejich účinky hrají roli při procesech fungování mozku, zejména při produkci energie a syntézy DNA a RNA a četného množství signálních molekul a neurochemikálií. Jsou citlivé na vysoké teploty, vzdušný kyslík a světlo. Při nedostatku jakéhokoliv vitamínu B může člověk trpět buď hypovitaminózou, při úplné absenci vitamínu je pak člověk postižen avitaminózou. Může nastat i opačná situace, kdy člověk přijímá vitamínu přebytek. Tento chorobný stav nazýváme hypervitaminózou, ovšem ten u vitamínů B není tak častý, protože je jejich nadbytek vylučován močí. Příjem těchto vitamínů je důležitý, neboť mají pozitivní vliv na nervovou soustavu, trávicí ústrojí, zrak, játra, kůži a vlasy. Vyskytují se převážně v pivovarských kvasnicích, dále pak v pšeničných klíčcích, mase, rybách, vejcích, mléce, fazolích a ořechách [4], [5], [6].

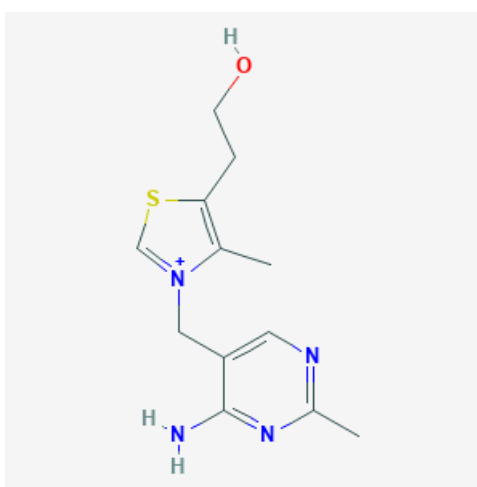
#### 2.1.2 Vitamín B<sub>1</sub>

Vitamín B<sub>1</sub>, také známý jako thiamin, je první z řady vitamínů B-komplexu. Jedná se o krystalickou, ve vodě dobře rozpustnou látku, která hraje důležitou roli v energetickém metabolismu člověka. Jeho nedostatek má negativní vliv na nervovou soustavu a srdeční činnost [7], [8].

### 2.1.2.1 Struktura a vlastnosti

Thiamin se skládá z pyrimidinového kruhu, který se váže na dusíkový atom thiazolu pomocí methylenového mostku (Obrázek 1). Setkáváme se s ním buď ve volné podobě, nebo se vyskytuje jako thiamin monofosfát, thiamin pyrofosfát a thiamin trifosfát. Aktivní forma thiaminu je thiamin pyrofosfát, jinak také thiamin difosfát a vzniká tak, že hydroxylová skupina v thiaminu je nahrazena difosfát esterovou skupinou [9], [10], [11].

Tento thiamin pyrofosfát působí jako kofaktor tři enzymů. Mezi tyto enzymy patří cytosolická transketoláza, mitochondriální pyruvát dehydrogenáza a  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenázy. Všechny tyto enzymy se účastní katabolismu sacharidů. Thiamin je málo stabilní a nejvyšší stability dosahuje v kyselých roztocích při pH 2-4. Při ohřevu dochází k jeho degradaci, která je způsobená štěpením methylenového mostku mezi pyrimidinovým kruhem a thiazolem [9], [10], [11].



Obrázek 1: Thiamin [12]

### 2.1.2.2 Význam a výskyt

Thiamin je nezbytný pro fungování srdce a nervové soustavy. Udržuje optimální hladinu kyslíku v krvi a tím zajišťuje správné využití energie. Má blahodárný účinek na psychiku, mírní deprese a napětí, je účinný v boji proti stresu a napomáhá zlepšovat náladu a paměť. Používá se také při léčení srdečních chorob [7], [8], [13], [14].

### 2.1.2.3 Důsledky nedostatku a nadbytku

Nedostatek tohoto vitamínu má negativní vliv na nervovou soustavu a odráží se na člověku v podobě podrážděnosti, zhoršení spánku, nervového vyčerpání, zmatenosti či ztráty vůle. Dále může způsobit nevolnosti nebo zhoršení funkce štítné žlázy. Zvyšuje se také riziko vzniku Alzheimerovi choroby. U alkoholiků může dojít k tzv. Wernicke–Korsakoff syndromu, kdy člověk upadne do bezvědomí. Při avitaminóze hrozí onemocnění beri-beri, která se může projevovat srdečními poruchami, jaterními záněty, laktátovou acidózou a v některých případech končí srdečním kolapsem a smrtí [5], [13], [15], [16].

Jelikož se thiamin neukládá v těle a je vylučován močí, nelze se tímto vitamínem předávkovat. Při pravidelně přijímaném nadbytku vitamínu B<sub>1</sub> dochází ke slabosti, podrážděnosti či bolestem

hlavy. Při podání vysoké dávky jednorázově se pak například zvýší produkce inzulínu nebo činnost štítné žlázy [8], [17].

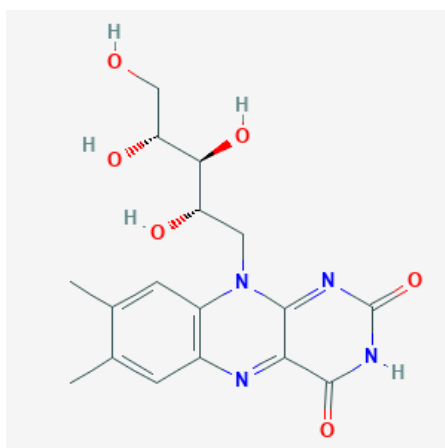
### 2.1.3 Vitamín B<sub>2</sub>

Vitamín B<sub>2</sub> neboli riboflavin, je druhý ze skupiny vitamínů B. Byl poprvé izolován v roce 1872 jako žlutý fluoreskující pigment v mléce chemikem Blythem. Vitamín B<sub>2</sub> je významný antioxidant a hraje důležitou roli v metabolismu živin [18].

#### 2.1.3.1 Struktura a vlastnosti

Riboflavin je složený z flavinového kruhu, který je substituován v poloze 10 postranním řetězcem D-ribitolu a methylován v poloze 7, 8 (Obrázek 2). S vitamínem B<sub>2</sub> se setkáváme buď ve volné formě, nebo se vyskytuje ve svých koenzymových formách jako flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD), které mají důležitou funkci v enzymatických reakcích. Jednou z těchto reakcí je například dýchací řetězec [19], [20].

Riboflavin je slabě rozpustný ve vodě, a pokud není vystaven světlu, tak je stabilní při oxidaci a zvýšené teplotě. Nejvyšší stability dosahuje při pH 2-5. Při pH nižším než 5 přechází flavinmononukleotid a flavinadenindinukleotid na riboflavin [19], [20].



Obrázek 2: Riboflavin [21]

#### 2.1.3.2 Význam a výskyt

Riboflavin je nezbytný pro správné fungování kůže a sliznic. Používá se při problémech s ekzémy, kožními plísněmi nebo alergiemi a podílí se na zachování zdravé pokožky, vlasů a nehtů. Napomáhá také zlepšovat zrak. Vitamín B<sub>2</sub> je významný antioxidant, který předchází škodlivé peroxidaci lipidů, při které dochází k poškození buněčných membrán. Působí také neuroprotektivně, díky čemuž má preventivní funkci proti neurologickým onemocněním jako jsou například roztroušená skleróza, migréna nebo Parkinsonova choroba [17], [18], [19].

Vitamín B<sub>2</sub> najdeme ve většině živočišných potravin. Hojně se vyskytuje v mase, sýru, rybách, vnitřnostech a vejcích. Velmi rozšířený je také v potravě rostlinného druhu, zejména v obilných klíčcích, luštěninách, listové zelenině, ořechích a bramborech. Bohatým zdrojem na riboflavin jsou také pivovarské kvasinky [17], [18], [19].

### 2.1.3.3 Důsledky nedostatku a nadbytku

Nedostatek riboflavinu, jinak také ariboflavinóza, je chorobný stav charakterizovaný postižením kůže a sliznice. Projevuje se citlivostí na světlo, trhlinkami v koutcích úst, svědivou pokožkou, ztrátou vlasů a dále také může být doprovázen onemocněním štítné žlázy a zažívacími problémy [15], [17], [19].

Při dlouhodobém nedostatku jsou ohroženy červené krvinky, což může vést k srdečním onemocněním a anémii. Deficit riboflavinu lze pozorovat u lidí, co používají nadměrně alkohol nebo nepřijímají dostatek bílkovin [15], [17], [19].

Při nedostatku vitamínu B<sub>2</sub> může dojít ke zvýšení rizika vzniku některých druhů rakoviny. Co se týče nadbytku, je vylučován opět močí a nejsou známe žádné vedlejší účinky [15], [17], [19].

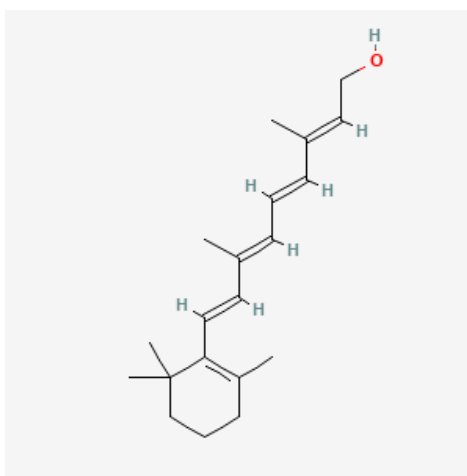
## 2.2 Vitamín A

Vitamín A, jinak také retinol, je další z řady vitamínů rozpustných v tucích. Jedná se o velmi důležitou látku spojovanou se správným fungováním zraku, sliznic, dělením buněk a růstu. Jeho prekurzorem jsou karoteny, které mají výraznou antioxidační aktivitu [1], [22].

### 2.2.1 Struktura a vlastnosti

Vitamín A se řadí do skupiny terpenoidů. Jedná se o polyisoprenovou sloučeninu, která ve své struktuře obsahuje cyklohexanový kruh s postranním řetězcem složeným ze dvou isoprenových jednotek (Obrázek 3). Aktivní formou vitamínu A jsou retinol, retinal a kyselina retinová. Velmi důležité jsou prekurzory vitamínu tzv. karotenoidy. Jedná se o přírodní lipofilní barviva ze skupiny tetraterpenoidů. Jsou významné pro svou vysokou antioxidační aktivitu. Prekurzorů vitamínu A je celá řada, avšak nejznámějším je karotenoid β-karoten, dále α-karoten a γ-karoten [23], [24], [25].

Vitamín A se vyskytuje v potravinách živočišného původu, zatímco jeho prekurzory hlavně v ovoci a zelenině. Retinol se vyskytuje buď ve volné formě, nebo vázaný na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem pomocí esterové vazby. Vitamín A je nažloutlý až načervenalý olej s mírnou vůní, a při nižší teplotou tuhne. Je stály v prostředí zásad, naopak v kyselém prostředí je nestabilní [1], [26], [27].



Obrázek 3: Vitamín A [28]

### 2.2.2 Význam a výskyt

Retinol je látka nepostradatelná pro správné fungování hned několika funkcí našeho těla. Produkuje slizniční hlen močového, zažívacího a dýchacího traktu, takže zabraňuje riziku infekcí. Je prekurzorem rodopsinu, což je zrakový pigment, tím pádem je životně důležitý pro náš zrak. Uplatňuje se při syntéze proteinů, dále také při diferenciaci a růstu buněk. Posiluje imunitu a prokázal se jako účinný bojovník proti degenerativním onemocněním. Oblíbený je také v kosmetice proti akné a vráskám. Prekurzory retinolu karotenoidy jsou pak významnými antioxidanty [26], [27], [29].

Nejvyšší obsah vitamínu A nalezneme v játrech a dalších vnitřnostech, mléce a mléčných výrobcích, rybách a mase. Karotenoidy se pak nachází v zelenině (listová zelenina, špenát mrkve, rajčata) a v ovoci (meruňky, broskve) [1], [28], [29].

### 2.2.3 Nedostatek a nadbytek

Nedostatek vitamínu A může vyvolat závažné problémy. Příčinou může být celiakie, poškození jater, chronická infekční onemocnění nebo průjem. Mezi časté projevy nedostatku patří poruchy zraku a šeroslepost. Dále je narušené fungování kůže a sliznic, což vede k suchosti, olupování a infekcím. Může také dojít například k problémům s produkcí zubní skloviny a ohrožení vývoje plodu u těhotných žen [1], [28].

Nadbytek vitamínu A je také nebezpečný. V případě akutní toxicity dochází k bolestem hlavy, zvýšení tlaku, nevolnosti, svědění kolem očí, zvracení, ospalosti a malátnosti. Vysoké dávky v kratším časovém rozpětí nebo nižší dávky v dlouhém časovém rozpětí můžou být teratogenní. U chronické toxicity dochází k bolesti kloubů, alopecii, kožním problémům a poškození jater [1], [28].

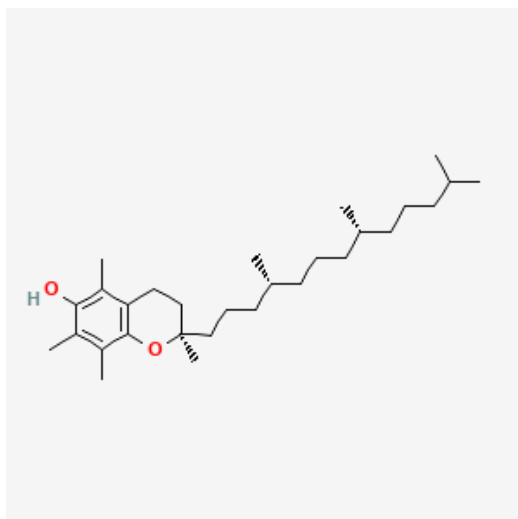
## 2.3 Vitamín E

Vitamín E je významný antioxidant řadící se do skupiny vitamínů rozpustných v tucích. Díky svým hojícím a antioxidačním účinkům je oblíbený v kosmetickém průmyslu, zejména v kosmetice zaměřující se na omlazení pleti. Krom toho stabilizuje plazmatické membrány, zabraňuje srážení krevních destiček a moduluje expresi genů [30], [31], [32], [33]

### 2.3.1 Struktura a vlastnosti

Vitamín E (Obrázek 4) se skládá z 8 sloučenin, které se dále dělí na dvě skupiny – tokoferoly a tokotrienoly, které se dohromady také nazývají tokochromanoly. Tyto substance obsahují chromanové jádro a postranní řetězec v poloze C<sub>2</sub>. Jako základní sloučenina je považován  $\alpha$ -tokoferol, který je také nejúčinnější. Název tokoferol vychází z derivátů tokolu substituovaných methylem. Přirozenou formu vitamínu E nalezneme v neesterifikovaném stavu [32], [33].

Tento vitamín je ve své neesterifikované formě citlivý obzvláště na světlo, teplo a bazické prostředí reaguje tím, že se oxiduje. Jeho estery ovšem méně oxidují, a proto jsou také více používané ve farmacii, kosmetice a potravinářství. Vitamín E je světle žlutý, viskózní olej nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v ethanolu a aprotických rozpouštědlech. Na vzduchu a světle vlivem oxidace tmavne. Polyethylenglykolové konjugáty vitamínu E tvoří díky svým amfifilním vlastnostem s vodou micely a tím se zlepšuje jejich absorpce a rozpustnost ve vodě [34], [35].



Obrázek 4: Vitamín E [36]

### 2.3.2 Význam a výskyt

Vzhledem k tomu, že vitamín E hraje zásadní roli při udržení zdraví a prevenci nemocí, tak je pro nás esenciální živinou. Jedná se především o významný antioxidant, který je schopný zachytit singletový kyslík a peroxylové radikály. Zlepšuje hojení pokožky a zpomaluje stárnutí pleti. Dále dokáže regulovat buněčnou signalizaci a proliferaci, genovou expresi a enzymovou aktivitu. Zabraňuje srážení krevních destiček a předchází kardiovaskulárním onemocněním a poškození kůže a očí vlivem věku. Působí preventivně proti neplodnosti. Vitamín E má dále schopnost stabilizovat membrány tím, že tvoří komplexy s destabilizujícími molekulami, a tím se zabráni narušení amfifilní rovnováhy uvnitř struktur. Také se prokázal jako biokompatibilní modifikátor v lékařství a biomateriálech [35], [37], [38].

S vitamínem E se setkáme především v rostlinných zdrojích a fotosyntetických organismech. Největší množství ho nalezneme v olejích z obilných semen, margarínu a ovoci. Dále je obsažen v listové zelenině a ořechách. Z živočišných zdrojů na něj narazíme v masu a vejcích. [35], [37], [38].

### 2.3.3 Nedostatek a nadbytek

Vzhledem k tomu, že vitamín E je v běžné potravě dost rozšířený, tak je nedostatek vitamínu spíše nepravděpodobný. Může se ovšem vyskytnout u lidí s poruchami absorpce tuků, s genetickými poruchami nebo podvýživou [37], [38].

Mezi projevy nedostatku patří jaterní nekróza a poruchy jaterní permeability. Nadměrné množství není nijak toxické, ale může dojít k například k nechutenství nebo únavě [37], [38].

## 2.4 Fenolické látky

Fenolické látky, jinak nazývané také polyfenoly, jsou přírodní sloučeniny produkované širokým spektrem rostlin jako sekundární metabolity. Vyšší rostliny jsou schopné syntetizovat až několik tisíc různých fenolických sloučenin. Obvykle jsou přítomny v buněčné vakuole jako rozpustné glykosidy, které obsahují sacharid. Tyto sloučeniny hrají roli především jako obranné látky rostlin při environmentálních stresech, jako jsou například nízké teploty či nakažení patogenními organismy. Mimo jiné mají také antioxidační schopnosti [40], [41], [42].

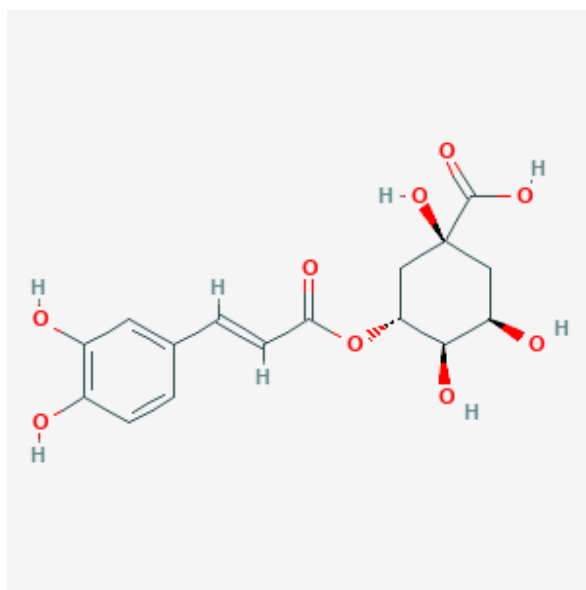
Strukturně se jedná o aromatické látky, které obsahují jeden nebo více hydroxylových substituentů. Vzhledem k aromatickému charakteru polyfenoly intenzivně absorbují záření v UV spektru, proto se uplatňují v kvalitativní a kvantitativní analýze spektrální metody. Fenolické látky se dělí na několik podskupin, přičemž nejznámější a nejvýznamnější jsou flavonoidy, fenolické kyseliny, přírodní barviva a lignany [40], [41], [42].

### 2.4.1 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová je ester kyseliny kávové a chinové, který řadíme do mezi fenolické kyseliny. Setkáváme se s ní hlavně v kávě a čaji, přičemž v kávě je to nejhojněji zastoupený polyfenol. Dále je obsažena například v kakau, citrusových plodech, jablkách, hruškách či bobulovém ovoci. Kyselina chlorogenová má fenolovou skupinu, díky které působí jako přírodní antioxidant a může se vázat na enzymy a měnit jejich strukturní vlastnosti a biologickou aktivitu. Je také známá pro další biologicky pozitivní aktivity. Vykazuje antibakteriální a antikarcinogenní účinky [43], [44], [45], [46]. Bylo prokázáno, že redukuje hladinu cukru v krvi, a tím pádem i riziko diabetes. Také urychluje metabolismus, čímž je nápomocná při snižování váhy. Z tohoto důvodu se kyselina chlorogenová stala oblíbeným doplňkem stravy při hubnutí [45], [47], [48], [49].

#### 2.4.1.1 Struktura a vlastnosti

Kyselina chlorogenová, jinak také CGA-3, je karboxylová kyselina, která vzniká esterifikací kyseliny chinové a kávové [49]. Strukturu kyseliny chlorogenové lze vidět na obrázku níže (Obrázek 5). Při alkalickém pH přechází kyselina chlorogenová na odpovídající orto-chinon, který je schopen se kovalentně vázat s nukleofilními skupinami proteinů. Ve střevní mikroflóře je tato kyselina hydrolyzována bakteriemi na kyselinu kávovou [50], [51], [52]. Kyselina chlorogenová dále působí jako senzibilizátor inzulínu. Dokáže zesilovat účinek inzulínu podobně jako antidiabetický lék metmorfin [44].



Obrázek 5: Kyselina chlorogenová [53]



### 2.4.1.2 Význam a výskyt

Kyselina chlorogenová vykazuje hojné biologické aktivity. Je například známá pro své antimikrobiální účinky. Bylo prokázáno, že působí baktericidně proti *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* a *Klebsiella pneumoniae*. Působí protiplísňově proti *Candida albicans* pomocí působení na membránu. Ukázala se jako účinná proti Ebole pomocí metody Silico.

Díky svým antimikrobiálním schopnostem má využití jako konzervant a přísada do potravin [54], [55]. Kyselina chlorogenová má dále schopnost vychytávat reaktivní formy kyslíku a dusíku, takže je to významný antioxidant. Díky tomu působí preventivně proti vážným nemocem, jako jsou například rakovina, osteoporóza nebo ischemická porucha srdeční [53], [56]. Mimo jiné kyselina chlorogenová snižuje krevní tlak, čímž působí blahodárně při léčbě hypertenze. Byly také prokázány její protizánětlivé účinky. Dále bylo dokázáno, že má tato kyselina významný vliv na absorpci a spotřebu glukózy z přijímané potravy, tím pádem pravidelné a dlouhodobé přijímání potravin obsahující kyselinu chlorogenovou může způsobit snížení tělesné hmotnosti a rizika diabetes [45], [47].

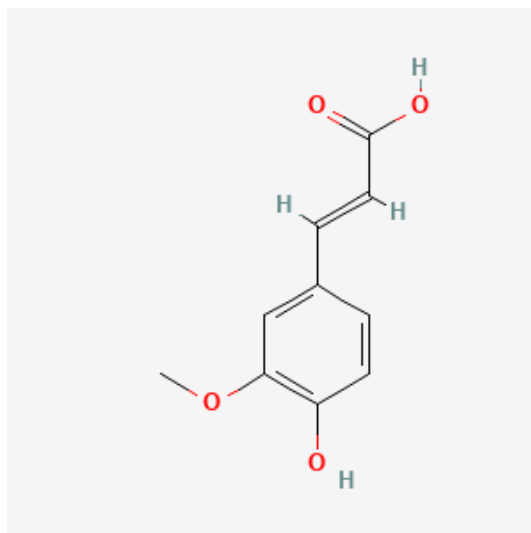
Kyselina chlorogenová se vyskytuje jako sekundární metabolit mnohých rostlin a tím pádem se jedná o velmi rozšířenou fenolickou kyselinu, se kterou se setkáváme denně v jídle. Nejvíce je obsažena v kávě a čaji, dále je přítomna v bambusu *Phyllostachys edulis*, bramborách, mrkvích, lilku, jablcích, hruškách a třešních [57].

### 2.4.2 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová je fenolická kyselina vyskytující se v celozrnných obilovinách. Jedná se o známý antioxidant s širokým využitím v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [58].

#### 2.4.2.1 Struktura a vlastnosti

Kyselinu ferulovou (kyselina 4-hydroxy3-methoxyskořicová) řadíme mezi deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Díky postrannímu řetězci s dvojnou vazbou je schopna *cis* a *trans* izomerace (Obrázek 5). V přírodě se s ní setkáváme kovalentně navázanou na polyaminy, lignin, polysacharidy a deriváty mastných kyselin. Hydroxylové skupiny na benzenovém jádře společně s dvojnou vazbou postranního řetězce jsou působiště reakcí s radikály. Kyselina ferulová tvoří estery s řadou molekul, například s alkoholy, steroly, glukosidem, flavonoidy nebo hydroxykarboxylovými kyselinami. S kyselinou dihydroferulovou je součástí lignocelulóz, čímž dodává buněčné stěně tvrdost [58], [59].



Obrázek 6: Kyselina ferulová [60]

#### 2.4.2.2 Význam a výskyt

Kyselina ferulová má četné využití v lékařství a kosmetickém průmyslu. Mezi její nejvýznamnější účinky patří antioxidační aktivita, za kterou je zodpovědný postranní řetězec a fenolové jádro. Tvoří fenoxy-radikál, který zachytává volné radikály. Dále má kyselina ferulová protizánětlivé účinky – snižuje hladiny zánětlivých mediátorů. Bylo prokázáno, že snižuje hladinu glukózy v krvi, má protirakovinové účinky a zpomaluje stárnutí pleti. Své využití nalézá také v potravinářském průmyslu, kde se používají amidy kyseliny ferulové jako konzervanty [58], [59], [62].

Poprvé byla kyselina ferulová identifikována v rostlině *Ferula foetida*, z které taky vychází její název. Je hojně přítomná ve slupkách ovoce a zeleniny, kořenech zeleniny, rýži, kukuřici, pšenici a ovsu [61], [62].

### 2.5 Využití v kosmetickém a potravinářském průmyslu

Kyselina chlorogenová, ferulová, thiamin, riboflavin a vitamíny A a E jsou přírodní látky hojně používané pro své blahodárné účinky v mnoha odvětvích. Obzvláště oblíbené jsou v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Často se s nimi setkáváme v různých doplňcích stravy, které zlepšují naše funkce nebo pomáhají zkrášlovat pleť a vlasy, dále se díky svým antioxidačním a antimikrobiálním vlastnostem přidávají do potravin a kosmetických výrobků [18], [28], [31], [58].

#### 2.5.1 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová má jak výrazné antioxidační, tak antimikrobiální schopnosti. Z tohoto důvodu má široké využití v kosmetických výrobcích určených proti vráskám a akné. Byla dokázána její inhibiční schopnost vůči *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, které jsou zodpovědné za tvorbu akné. Dále zamezuje růstu bakterií *Escherichia coli* a *Helicobacter pylori*. Díky svým antimikrobiálním účinkům se používá i v potravinářském průmyslu jako konzervant a aditivum [55], [63], [64].

### 2.5.2 B-komplex

Vitamíny skupiny B jsou významnými pomocníky pro udržení správného fungování sliznic a kůže. Mají pozitivní vliv na vlasy, pleť a nehty a díky tomu jsou označovány jako vitamíny krásy [18].

### 2.5.3 Vitamín E

Vitamín E je díky svým antioxidačním účinkům nepostradatelnou složkou mnoha kosmetických přípravků již více než 50 let. Dokáže zachytávat radikály a tím zamezuje poškození membrán a také předčasnému stárnutí, tím pádem je dokonalým adeptem na to být součástí kosmetiky proti vráskám. Podle studie společně s vitamínem A inhibuje růst bakterií *Propionibacterium acnes* zodpovědných za tvorbu akné. Mimo jiné vitamín E urychluje hojení ran a popálenin [31], [33], [65], [66].

### 2.5.4 Vitamín A

Vitamín A řídí buněčnou apoptózu, diferenciaci a proliferaci, a díky tomu se uplatňuje v kosmetickém odvětví zaměřujícím se na regeneraci kůže a její předčasné stárnutí. Má hojící účinky a bylo prokázáno, že zvyšuje ukládání dermálního kolagenu. Vitamín A je hojně využívaný jako součást kosmetických výrobků zlepšující projevy akné nebo psoriázy. Karotenoidy, prekurzory vitamínu A, jsou silnými antioxidanty, které mají také široké využití v kosmetice. Nejen, že chrání pleť před škodlivým UV zářením, ale zpomaluje proces stárnutí kůže. Krom toho se například beta karoten používá v přípravcích podporující opálení [67], [68], [69], [70], [71].

### 2.5.5 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová je další z řady silných antioxidantů. Za antioxidační účinky je zodpovědná její chemická struktura, díky které reaguje s radikálem a vytváří stabilní fenoxylový radikál. Krom toho, že zachytává samotné volné radikály, také potlačuje aktivitu enzymů katalyzující tvorbu radikálů. Předchází peroxidaci lipidů a váže přechodné kovy. Má tedy své využití v kosmetice proti vráskám. Významné jsou také její protizánětlivé účinky [58], [72].

## 2.7 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je vlastnost látek vychytávat volné radikály škodlivé pro organismus. Nejčastější radikály jsou kyslíkové a dusíkaté radikály, které narušují strukturu a tím i funkci pro organismus důležitých molekul jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a lipidy. Nebezpečí radikálů spočívá v tom, že reagují řetězově a tyto reakce ve výsledku poškozují tkáň a orgány. Spojují se s nimi různá nebezpečná onemocnění jako například rakovina, při které vznikají hydroxylové radikály způsobené radiačním zářením [73], [74], [75].

Za tvorbu radikálů jsou zodpovědné biochemické, fotochemické nebo radiační reakce endogenního a exogenního původu. Může se jednat například o přechodné prvky nebo léky. Nejčastěji vyskytujícími se radikály jsou radikál peroxylový, hydroxylový či oxid dusnatý. Mezi radikály můžeme také řadit látky neradikálové povahy jako ozon, peroxid vodíku nebo kyselinu chlornou. Látky, které jsou schopny eliminovat aktivitu volných radikálů, se nazývají antioxidanty. Dělíme je na antioxidační enzymy, antioxidační neenzymové proteiny, exogenní antioxidanty a nízkomolekulární endogenní antioxidanty. Mezi antioxidační enzymy řadíme

superoxiddismutasu, glutathionperoxidasy, katalasy a glutathiontransferasy. Antioxidační neenzymové proteiny mají schopnost vázat přechodné prvky, patří sem například ferritin nebo transferin. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty zachytávají volné radikály a vytváří stabilnější struktury. Řadíme sem například kyselinu askorbovou, bilirubin, vitamín A nebo kyselinu močovou [73], [74], [75].

Mezi exogenní antioxidanty patří fenolické látky jako flavonoidy a fenolické kyseliny. Mají schopnost chelatace přechodných prvků, inhibice prooxidačních enzymů, aktivace antioxidačních enzymů a zhasení radikálů. Krom využití aktivity antioxidantů se volné radikály odstraňují vylučováním z těla (močí, stolicí), zachycováním jinými molekulami (quenching) nebo zanikají při spojení dvou radikálů. Ke stanovení antioxidační aktivity se používá několik metod, z nichž mezi nejznámější patří například metoda TEAC nebo metoda DPPH [73], [74], [75].

## 2.8 Kůže

Kůže (*cutis*) je největší orgán lidského těla s rozlohou 1,5-2 m<sup>2</sup>. Pokrývá povrch našeho těla a tvoří tak bariéru mezi vnitřním organismem a vnějším prostředím. Mezi hlavní funkce patří ochrana před vnějšími mechanickými, biologickými a chemickými vlivy, vysušením a termoregulace. Kůže se skládá se tří základních vrstev – pokožky (*epidermis*), škáry (*dermis*) a podkožního vaziva (*tela subcutanea*) [76], [77].

### 2.8.1 Pokožka

Pokožka (*epidermis*) je nejtenčí a nejsvrchnější vrstevnatá část kůže. Je tvořena keratinocyty, melanocyty, Merkelovými buňkami a Langerhansovými buňkami. *Epidermis* se skládá z pěti vrstev na základě tvaru a fáze keratinocytů. Nejsvrchnější vrstva se nazývá rohová vrstva (*stratum corneum*) a buňky zde jsou zrohovatělé a nemají jádro. Tato vrstva má tendenci se odlupovat. Další vrstva se nazývá zrnitá (*stratum granulosum*) a je tvořena až třemi vrstvami zploštělých buněk. Od rohové vrstvy je oddělená přechodovou vrstvou *stratum lucidum*. Pod zrnitou vrstvou se nachází vrstva ostnitá (*stratum spinosum*), jejíž buňky mají ostnitý tvar. Poslední, nejhlubší vrstva *epidermis*, se nazývá bazální vrstva (*stratum basale*) a je typická tím, že keratinocyty zde mají velká jádra [77], [78], [79], [80].

*Epidermis* se obnovuje zhruba každých 28 dní, přičemž dochází k posunu buněk z nejhlubší vrstvy na povrch rohové vrstvy. V tomto procesu dochází k rozpadu buněčného jádra a zploštění buněk. Vzniklé buňky se nazývají korneocyty a vytváří rohovou vrstvu, která se odlupuje. Kvalita a vzhled kůže pak záleží na správné obměně korneocytů [79], [80].

### 2.8.2 Škára

Škára (*dermis*) je střední část s tloušťkou kolem 1 mm a její funkce je výživa kůže. Tvoří převážnou část kůže a je zodpovědná za její pevnost a pružnost. Tyto dvě vlastnosti se v průběhu let mění a z toho důvodu dochází ke stárnutí kůže. Je složena z fibroplastů, dále jsou přítomny například makrofágy a dendritické buňky. *Dermis* obsahuje potní žlázy, mazové žlázy, vlasové folikuly, smyslová a nervová zakončení, lymfatické cévy a krevní kapiláry [76], [81].

### 2.8.3 Podkožní vazivo

Podkožní vazivo (*tela subcutanea*) je nejhlubší vrstva kůže s ochrannou funkcí. Její tloušťka se liší na různých místech těla. Skládá se hlavně z podkožního tuku, nervů, krevních a lymfatických cév [79], [80].

### 2.8.4 Absorpční schopnost kůže

Kůže je semipermeabilní membrána, která je schopná propouštět jen některé látky. Schopnost absorpce je ovlivněna stavem kůže a chemickými vlastnostmi látky, mezi které patří například molekulová hmotnost, rozpustnost, aktivitu vodíkových vazeb nebo bod tání [79], [82].

Molekula může kůží pronikat buď transepidermální dráhou (přes vrstvy kůže) nebo appendageální dráhou (přes vlasové folikuly). Průnik chemických látek je dělen na adsorpci a absorpci. Při adsorpci se látka naváže v rohové vrstvě a při odlupování buněk je společně s buňkami odstraněna. Při absorpci se dostává až do šikarý, kde se pomocí interakcí s tkáňovým mokem a cévami dostává do krevního nebo lymfatického oběhu [79], [82].

Vzhledem k tomu, že kůže působí jako účinná bariéra pro chemické látky, je v kosmetickém průmyslu využívána enkapsulace látek do liposomů, nanoemulzí či nanokrystalů, která účinnost průniku aktivní látky přes kůži zvyšuje [83].

### 2.8.5 Stárnutí kůže

Mezi první známky stárnutí kůže patří vrásky, které ovšem nemusí znamenat biologické stárnutí. Předčasné stárnutí kůže může být vyvoláno například nesprávnou výživou, škodlivým životním prostředím nebo užíváním návykových látek. Vrásky se začínají tvořit při ztrátě elasticity kůže a turgoru, což může být způsobeno zvýšenou expozicí slunečným paprskům. Krom vrásek je stárnutí pleti spojeno s oslabením pokožky a poruchou pigmentace. Dochází k ztenčení všech vrstev kůže a zmenšení potních a mazových žláz, což způsobuje vysychání kůže [84].

## 2.9 Buněčné kultury

Buněčné kultury jsou jedny z hlavních technik využívaných v biologických oborech. Jedná se o obecný termín, který se používá pro odstranění buňky, tkáně nebo orgánu z rostliny nebo zvířete a jejich následné uložení do umělého prostředí, ve kterém jsou schopny přežít nebo se množit. K optimálnímu růstu přispívá řízená teplota, vhodné médium a substrát a inkubátor, který se podílí na udržení pH a osmolality. Pro kultivaci *in vitro* je důležitý výběr růstového média. Jako růstová média se většinou používají kapaliny nebo gely, které podporují růst buněk, mikroorganismů nebo rostlin. Média by měla obsahovat zdroj energie a sloučeniny schopné regulace buněčného cyklu. Jako zdroj růstových hormonů a faktorů běžně obsahují vitamíny, anorganické soli, aminokyseliny a glukózu [84].

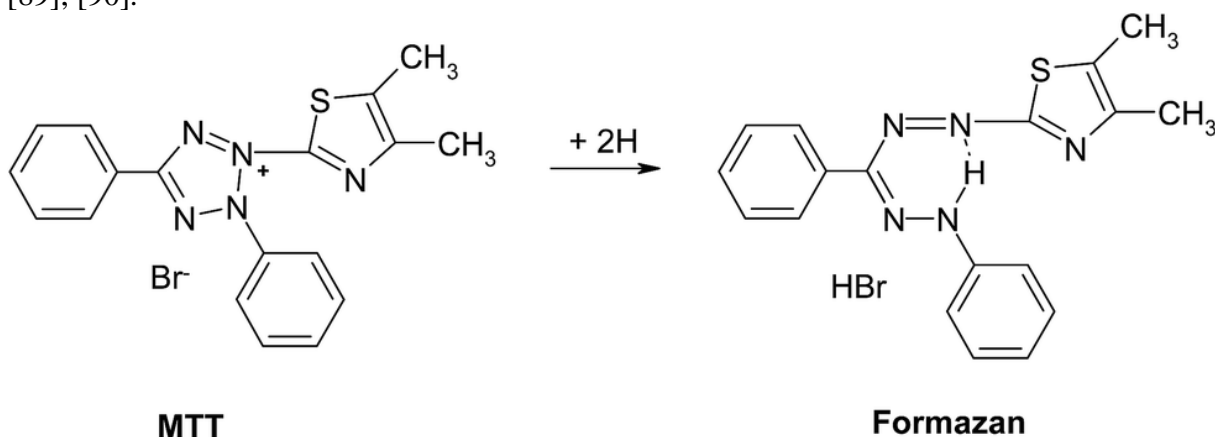
### 2.9.1 Keratinocyty

Keratinocyty jsou kožní buňky, které tvoří zhruba 95 % *epidermis*, což je nejsvrchnější část kůže. Jejich hlavní funkcí je ochrana pokožky před vnějšími vlivy. Díky produkci molekul s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou mukopolysacharidy a cytokeratiny, napomáhají biochemické a fyzikální integritě kůže. Keratinocyty se podílí na produkci cytokinů, což jsou

regulátory imunitního systému. Účastní se také mechanismu zahájení, udržování a dokončení hojení kožních ran [86], [87], [88].

### 2.9.2 MTT test cytotoxicity

MTT, jinak také 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, je žlutý roztok tetrazoliové soli. Jedná se o kolorimetrickou techniku, při které je MTT redukován v živých buňkách mitochondriálníma dehydrogenásama na fialovo-modré krystaly formazanu (Obrázek 7). Množství formazanu se stanovuje spektrofotometricky a dává nám informace o životaschopnosti buněk. Čím je hodnota absorbance vyšší, tím je větší množství živých buněk [89], [90].



Obrázek 7: Redukce MTT na formazan [89]

## 2.10 Enkapsulace

Enkapsulace je balící metoda, kdy dochází k zapouzdření aktivních látek do nosného materiálu. Vzniklé částice mají schopnost látky za určitých podmínek uvolňovat. Říká se tomu tzv. postupné uvolňování. Jedná se o techniku, kdy jsou aktivní látky přenášeny na specifické místo v požadované koncentraci za definovanou rychlost. Podmínky, při kterých dochází k postupnému uvolňování, jsou například změna pH, teploty, enzymatické aktivity či osmotického tlaku. Enkapsulace má uplatnění hlavně v potravinářském průmyslu, dále se s ní hojně setkáváme v kosmetickém průmyslu. Mezi její funkce krom postupného uvolňování patří také ochrana aktivních složek před škodlivými vlivy, zlepšení stability výrobků, maskování nepříjemných chutí, zabránění odpaření těkavých látek. V kosmetickém průmyslu se používá enkapsulace do liposomů z důvodu nerušeného přestupu účinné látky přes kůži a jejímu transportu na místo, kde ji potřebujeme. Enkapsulaci lze provést několika různými způsoby, například sprejovým sušením, kokrytalizací nebo emulgací. Jako nosné materiály se pak používá agaróza, alginát, celulóza nebo želatina [91], [92].

### 2.10.1 Sprejové sušení

Mezi nejběžněji používanou metodu enkapsulace patří sprejové sušení. Pomocí této techniky připravujeme pevné látky z látek kapalných. Nejprve je aktivní látka homogenizována v nosiči a poté následuje sprejování vzniklé směsi do horké komory. Jako nosný materiál se používá modifikovaný škrob, maltodextriny a arabská guma [93].

### **2.10.2 Kokrytalizace**

Tato enkapsulační technika využívá pro vznik vnější vrstvy sacharózu. Přesycený sacharózový sirup je udržován při teplotě, při které nekrytalizuje. Ke krytalizace a následné enkapsulaci dochází až po přidání účinné látky. Enkapsulovaný produkt se usuší a třídí podle velikosti [93].

### **2.10.3 Emulgace**

Emulgace je enkapsulační metoda, která se používá, když chceme enkapsulovat ve vodě rozpustné bioaktivní látky. Emulze je složena ze dvou a víc vzájemně nemísitelných látek, nejčastěji se jedná o vodu a olej. Vzniká dispergovaná fáze a dispergovaný podíl, který je v ní rozptýlený ve formě kapek. Při usušení emulze získáme částice ve formě prášku [93].

### **2.10.4 Enkapsulace do liposomů**

Liposomy jsou částice ve tvaru malých kulovitých vezikulů, do kterých můžeme zabalit řadu účinných látek. Jsou složeny ze dvou nebo i více dvojvrstev, které jsou tvořeny fosfolipidy. Vrstvy obsahují hydrofilní část směřující ven a hydrofobní část směřující dovnitř. Jako hlavní složka liposomů je považován lecitin. Do liposomů lze enkapsulovat hydrofobní i hydrofilní látky. Hydrofobní jsou zakorporované do lipidové dvojvrstvy a hydrofilní do vodního prostředí. Lipidická vrstva nepropouští makromolekuly ani ionty, tudíž zachycené látky jsou chráněny před případnými škodlivými vlivy [93].

Vzhledem k tomu, že jsou liposomy podobné buněčným membránám, tak jsou schopné do sebe inkorporovat různé druhy látek a tím pádem jsou vhodnými nosiči léků [93].

#### **2.10.4.1 Dělení liposomů**

Liposomy dělíme podle velikosti, náboje a jejich funkce. Podle velikost rozlišujeme unilamelární vezikuly mající průměr 15–50 nm, velké unilamelární liposomy mající průměr 100 nm. Unilamelární liposomy mají pouze jednu lipidovou dvojvrstvu. Multilamelární vezikuly mají v jedné vezikule více menších vezikul a jejich velikost je 100 nm až 20 μm [94], [95].

Podle náboje rozlišujeme liposomy anionické, kationické a neutrální. Anionické liposomy jsou rychle zachytávány cílovými buňkami a patří sem například fosfatidylglycerol. Kationické jsou používány nejvíce a reagují s ionty a zápornými polyelektrolyty. Patří sem například sfingosin. Mezi neutrální řadíme lecitin nebo sfingomeylin [94], [95].

Podle funkce dělíme liposomy do čtyř skupin. Stericky chráněné liposomy na povrchu obsahují hydrofilní polymery a jsou stabilní. Konvekční liposomy mají nespecifické interakce a jsou labilní. Polymorfní liposomy jsou velmi reakční, patří sem liposomy citlivé na teplo, světlo a ionty. Cílené liposomy reagují přes navázané ligandy [94], [95].

#### **2.10.4.2 Příprava liposomů**

Existuje několik technik přípravy liposomů. Mezi běžné metody patří hydratace fosfolipidového filmu. Nejdříve se odpaří roztok fosfolipidů v organickém rozpouštědle a vzniká tenká vrstva po stěnách nádoby. Vrstva je následně hydratovaná vodní fází a převedena třepáním na suspenzi vezikul obsahující vodu [94], [95].

Injekční metoda je technika, při které se injekční stříkačkou vstříkne alkoholický roztok fosfolipidů do vodné fáze. Tato metoda je ideální pro přípravu unilamelárních liposomů [94], [95].

Frenchpress, jinak nazývaná jako vysokotlaká homogenizace, se používá k extruzi liposomů větší velikosti přes membránu. Výsledným produktem jsou unilamelární nebo oligolamelární liposomy [94], [95].

Metoda propolisom-liposom je aplikovaná při výrobě multilamenárních liposomů vhodných pro enkapsulaci jak hydrofilních, tak lipofolních látek. Využívá se zde přeměny koncentrované propolisomální směsi obsahující částičky lipidů, etanol a vodu na liposomální disperzi pomocí přebytku vodné fáze [94], [95].

Další používanou metodou pro přípravu liposomů je sonikace. Při této technice je aplikována zvuková energie pro výrobu unilamelárních vezikul s velikostí 15-50 nm. Provádí se za pomoci sonikátorů typu sondy nebo lázně [96].

#### **2.10.4.3 Cholesterol**

Cholesterol je organická steroidní látka, která tvoří základní část biomembrán. Je složen z polární a nepolární části – polární část obsahuje hydroxylovou skupinu a nepolární se skládá ze steroidního jádra a uhlovodíkového řetězce. Cholesterol má lipidovou povahu a tvoří stavební složky buněk a tkání v lidském těle. Podílí se na tvorbě žlučových kyselin, krevních lipoproteinů, steroidních a pohlavních hormonů a vitamínu D. Zprostředkovává vnitrobuněčný transport, dále také přenáší nervové vzruchy a buněčné signály [97], [98].

Cholesterol se vyskytuje v lidském těle v mozku, kožním tuku, slezině a nadledvinách. Naše tělo si jej produkuje samo v játrech a trávicím traktu. V potravinách pak cholesterol přijímáme například ve vejcích, mléčných výrobcích, živočišných tucích či uzeninách. Dlouhodobá konzumace vysokých dávek cholesterolu může způsobit zvýšenou hladinu cholesterolu v krvi [97], [98].

#### **2.10.4.4 Lecitin**

Lecitin neboli 1,2-diacyl-glycero-3-fosfocholín, je hlavní složkou biomembrán. Jeho název je odvozen z řeckého jména „lekithos“, což v překladu znamená vaječný žloutek. Hraje významnou roli v buněčném metabolismu a má schopnost snižovat hladiny cholesterolu [99]. Součástí jeho struktury je aminalkoholcholin, který se podílí na přenosu nervových vzruchů. Lecitin je obsažen zejména ve vaječném žloutku, dále také v sójových a slunečnicových semínkách. Má své využití například v potravinářství jako stabilizátor majonéz a výživy pro kojence a v kosmetickém průmyslu je součástí krémů na tělo a ruce. Vzhledem k tomu, že se jedná o povrchově aktivní látku, tak se používá také jako emulgátor [100], [101]. Jednotlivé lecitiny se od sebe liší vlastnostmi. Například vaječný lecitin se od sójového liší obsahem mastných kyselin, což se může odrazit na rozdílných emulzifikačních vlastnostech. Bylo také dokázáno, že vaječný lecitin lépe snižuje hladinu cholesterolu v krvi než sójový [102], [103]. Vzhledem k tomu, že se lecitin ze slunečnice izoluje pomocí extrakce bez účasti chemikálií na rozdíl od sójového, je čistota slunečnicového lecitinu vyšší než sójového a tím pádem i bezpečnější pro zdraví. Krom toho obsahuje slunečnicový lecitin vyšší obsah cholinu, díky čemuž má pozitivní vliv na paměť [104], [105].



## **2.11 Metody analýzy**

### **2.11.1 Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla**

K měření dynamického rozptylu světla se používá přístroj Zetasizer. Metoda je založena na měření Brownova pohybu, který je uveden do vztahu s velikostí částic. Částice v koloidním roztoku podléhají Brownovu pohybu, což je náhodný pohyb mikročástic [114], [115].

Velikost částic se pak měří na základě změny intenzity světla, které je rozptýleno v roztoku. Laser osvítl částici a dojde k rozptylu světla, jehož intenzita je dána rychlostí difúze. Vychází se z faktu, že těžší částice se pohybují pomaleji než lehčí [114], [115].

### **2.11.2 Stanovení stability částic pomocí potenciálu zeta**

Částice jsou složeny z elektrické dvojvrstvy, které obsahují vnitřní část, tzn. Sternovu vrstvu, a vnější část. Sternova vrstva má pevně vázané ionty, kdežto na vnější jsou vázány ionty slaběji. Uvnitř vnější vrstvy se vyskytuje teoretická hranice, ve které je tvořena stabilní jednotka pomocí částic a iontů. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku nebo také rovina skluzu. Pokud se částice pohybuje, ionty uvnitř hranice se pohybují s ní. Ionty mimo hranici se nepohybují [116].

Na této hranici se nachází tzn. zeta potenciál, jehož velikost určuje stabilitu koloidního systému. Částice s potenciálem vyšším jak +30 mV a nižším jak 30 mV jsou považovány za stabilní. Nejdůležitější faktor ovlivňující potenciál zeta je pH roztoku. Při alkalickém pH je potenciál zeta záporný, při kyselém naopak kladný. Nulový potenciál zeta znamená izoelektrický bod, při kterém je systém nejméně stabilní [116].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité přístroje a chemikálie

##### 3.1.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Ohaus Pioneer PX (CZE)

Spektrofotometer UV-1600 PC (CZE)

Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (CZE)

Ultrazvukový homogenizátor / dispergátor – BandelinSonoplus HS3200, SonorexTechnik (DEU)

Centrifuga, Sartorius, Biotech (CZE)

Mikrocentrifuga – Mikro 200, HettichZentrifugen (UK)

Ultrazvuková lázeň PS02000 (CZE)

Automatické pipety – Discovery (DEU) a Biohit (DEU)

Spektrofotometrický detektor LCD 2084

ZetaSizer Nano ZS –Malvern (UK)

Vortex, TK3S, Kartellspa (USA)

Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (CZE)

##### 3.1.2 Použité chemikálie ke spektrometrickým stanovením

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU)

Etanol, Vitrum–LachNer (CZE)

2,2–azinobis (3–ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina) -(ABTS); Sigma-Aldrich (DEU)

Peroxodisírandraselný; Sigma-Aldrich (DEU)

Troxol–6-hydroxy2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich (DEU)

##### 3.1.3 Použité chemikálie pro přípravu zásobních roztoků a liposomů

(±)- $\alpha$ -tokoferol, Sigma Aldrich (DEU)

Retinyl acetate, Sigma Aldrich (DEU)

Thiamine hydrochloride, Sigma Aldrich (DEU)

(-)-Riboflavin, Sigma Aldrich (DEU)

Kyselina chlorogenová, Sigma-Aldrich (DEU)

Ferulic acid, Sigma Aldrich (DEU)

Cholesterol Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich (DEU)

Lecitin slunečnicový, Fichemas.r.o.

L- $\alpha$ -fosfatidylcholin, Sigma-Aldrich (DEU)

##### 3.1.4 Použité chemikálie pro HPLC

Acetonitril, HPLC gradient grade, Chem-Lab (BEL)

Chloroform stabilizovaný ~ 1% ethanolu p.a., Penta (CZE)

Ethylacetát, ROTISOLV® HPLC, Carl Roth (DE)

n-Hexan 99% p.a., Penta (ČR)

Metanol, HPLC grade, Chem-Lab (BEL)

Aloenin A, Sigma-Aldrich (DEU)  
Apigenin, Sigma-Aldrich (DEU)  
Epikatechin, Sigma-Aldrich (DEU)  
Floridzin, Sigma-Aldrich (DEU)  
Kvercetin-3-glukosid, Sigma-Aldrich (DEU)  
Kyselina chlorogénová, Sigma-Aldrich (DEU)  
Kyselina kávová, Sigma-Aldrich (DEU)  
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU)  
Kyselina kumarová, Sigma-Aldrich (DEU)  
Katechin, Sigma-Aldrich (DEU)  
Pelargonidín-3-glukosid, Sigma-Aldrich (DEU)  
Hesperidin, Sigma-Aldrich (DEU)

### **3.1.5 Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT testy**

DMEM medium, Sigma-Aldrich (UK)  
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)  
MTT, Duchefa Biochemie (NL)  
Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (CZE)  
FBS fetální bovinné sérum, HyClone (USA)  
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (DZE)  
Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (CZE)  
Antibiotic-Antomycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)

### **3.2 Použité humánní buňky**

Pro stanovení cytotoxicity vybraných aktivních látek byly použity buňky HaCaT Human keratinocytes cell line pocházející ze zdravého mužského dárce, ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service, Eppelheim (Německo).

### **3.3 Příprava vybraných látek**

Byly připraveny zásobní roztoky vybraných aktivních látek o koncentraci 1 mg/ml, přičemž pro vitamín B<sub>1</sub> bylo použito jako rozpouštědlo destilovaná voda a pro vitamín B<sub>2</sub>, vitamín A, vitamín E, kyselinu ferulovou a chlorogenovou byl použit 96% etanol.

### **3.4 Stanovení antioxidační aktivity**

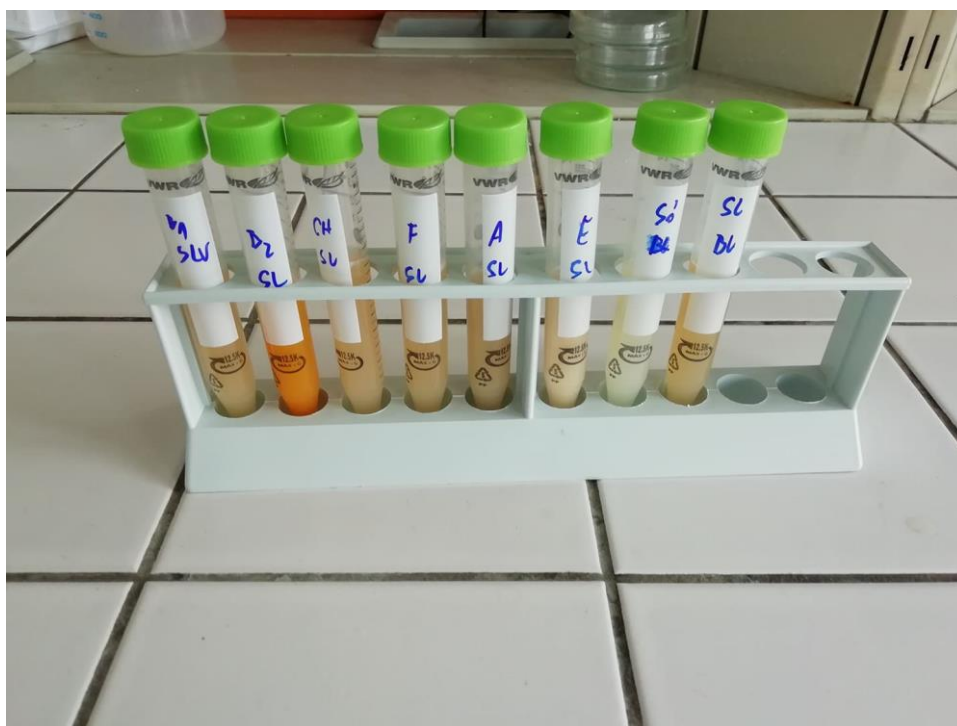
Ke stanovení antioxidační aktivity vybraných látek byla použita metoda TEAC-stanovení podle ABTS. Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada troloxu rozpuštěném v 60% etanolu v koncentrační řadě od 50–400 µl/ml. Radikál ABTS<sup>o+</sup> byl získán rozpuštěním ABTS a peroxodisíranu draselného ve vodě. Antioxidační aktivita se posuzuje jako antioxidační kapacita vzorku, která se rovná definovanému množství troloxu. Antioxidanty se zde chovají jako donory vodíku a zhasí radikál ABTS<sup>o+</sup>. Toto zhasení se sleduje spektrofotometricky při 734 nm oproti blanku [118].

Pro vlastní stanovení byly nejdříve připraveny zásobní roztoky podle postupu v kapitole 3.3. Smícháním 0,0960 g ABTS a 0,0166 g peroxodisíranu draselného v 25 ml destilované vodě byl získán radikálový aniont ABTS<sup>o+</sup>. Tento roztok byl následně ponechán stát minimálně 12 hodin

ve tmě. Před vlastním měřením bylo potřeba roztok ABTS zředit etanolem na hodnotu absorbance  $0,7 \pm 0,02$ . Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml ABTS<sup>o+</sup> a 10  $\mu$ l vzorku a měřil se pokles absorbance po 10 minutách při 734 nm proti etanolu.

### 3.5 Příprava liposomů

Pro přípravu liposomů byly použity dva druhy lecitinu, a to sójový a slunečnicový. Nejprve bylo do 50 ml kádinky naváženo 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu a 10 mg vzorku. Liposomy byly následně připraveny pomocí tyčového ultrazvuku při účinnosti 50 % po 15vteřinových intervalech po dobu 1 minuty za současného chlazení vodní lázní. Na obrázku níže (Obrázek 8) lze vidět připravené liposomy aktivních látek ze slunečnicového lecitinu a prázdné slunečnicové a sójové liposomy.



Obrázek 8: Slunečnicové liposomy (vitamín B<sub>1</sub>, vitamín B<sub>2</sub>, kyselina chlorogenová, kyselina ferulová, vitamín A, vitamín E, prázdné sójové liposomy, prázdné slunečnicové liposomy)

#### 3.5.1 Charakterizace připravených liposomů

Po přípravě liposomů byla stanovena jejich enkapsulační účinnost, velikost, stabilita a dlouhodobá stabilita.

##### 3.5.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti a dlouhodobé stability liposomů

Připravené liposomy byly centrifugovány 5 minut při 14 000 ot./min. Následně byly odlity supernatanty, které byly centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 60 minut. Opět byly odlity supernatanty a byla v nich stanovena antioxidační aktivita. Z antioxidační aktivity aktivních látek a antioxidační aktivity supernatantu byla stanovena enkapsulační účinnost. Dlouhodobá stabilita byla pak stanovena po 4 týdnech opětovným stanovením antioxidační aktivity.

### 3.5.1.2 Stanovení velikosti, distribuce a stability částic

Roztoky obsahující liposomy byly centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 5 minut. Následně byl odlit supernatant a znovu centrifugován při 14 000 ot./min po dobu 60 minut. Supernatant byl opět odlit a usazené liposomy byly rozsuspendovány v destilované vodě. Roztoky liposomů byly 100x naředěny a přelity do kyvet a byla zjištěna distribuce velikostí, průměrná velikost a polydisperzita částic. Velikost částic byla stanovena pomocí DLS přístroje Zetasizer (Obrázek 9).

Do kyvety bylo napipetováno 1 ml zředěného roztoku, byl vložen elektroodový nástavec a roztok byl následně proměřen. Z hodnot zeta potenciálu byla stanovena stabilita částic. Za stabilní jsou považovány částice, které dosahují hodnoty zeta potenciálu vyšší jak +30 mV a nižší jak -30 mV.



Obrázek 9: ZetaSizer

### 3.6 Kultivace keratinocytů

Na úvod práce byly potřebné roztoky přeneseny z lednice a ohřáty ve vodní lázni nastavené na 37 °C. Pro MMT test cytotoxicity byly vybrány keratinocyty, které byly uchovávány ve speciálních zkumavkách ve zmrazeném stavu. Jako médium pro kultivaci bylo použito komerční DMEM médium, do kterého bylo přidáno 1% antibiotikum a 10% FBS. Buňky s médiem byly napipetovány do kultivačních lahvíček, které byly uchovávány v termostatu s 5% obsahem CO<sub>2</sub> nastaveném na 37 °C. Práce s keratinocyty probíhala ve sterilním boxu

za sterilních podmínek. Buňky byly kontrolovány denně pod mikroskopem a podle pozorování byl následně zvolen další postup.

### **3.6.1 Výměna živného média**

Pokud došlo při kontrole buněk k barevné změně z červené na oranžovou, byla nutná výměna média. Staré médium bylo slito z kultivační lahvičky a nahrazeno médiem novým. Do malých kultivačních lahviček bylo nadávkováno 5 ml média a do velkých 15 ml média.

### **3.6.2 Pasážování**

Při kontrole buněk mikroskopem byla stanovována konfluence buněk, což je míra zaplnění povrchu dna nádoby. Pokud konfluence dosáhla hodnot nad 80 %, bylo nutné provést pasážování. Z lahvičky, která byla připravená na pasážování, bylo nejdříve slito médium a následně byla lahvička aspoň dvakrát propláchnuta PBS pufrem, čímž došlo k odstranění vápenatých iontů. Následně bylo do velkých lahviček nadávkováno 1 ml trypsinu a do malých lahviček 0,5 ml trypsinu, a lahvičky byly ponechány 10 minut v inkubačním boxu. Poté bylo zkontrolováno pod mikroskopem, zda došlo k uvolnění buněk ze dna lahviček. K uvolnění buněk bylo možné dopomoci úderů na stěny lahvičky. Zbytky přichycených buněk byly seškrábnuty škrabkou. Následně bylo nadávkováno 5 ml PBS pufru do kultivační lahvičky, které byla důkladně opláchnuta a celý její obsah byl přelit do centrifugační zkumavky. Roztok byl poté 5 minut centrifugován při otáčkách 320-360 rcf a teplotě 25 °C. Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky byly rozsuspendovány v 5 ml DMEM média. Následně bylo médium obsahující buňky rozděleno do nových kultivačních lahviček, které byly zkontrolovány mikroskopem a uloženy do inkubačního boxu.

### **3.7 MTT test cytotoxicity**

Pro stanovení cytotoxicity liposomů byl vybrán MTT test na 96-jamkových destičkách. Prvotní postup byl stejný jako při pasážování až po centrifugaci, slití supernatantu a rozsuspendování buněk v médiu. Následně byla určena koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Do destičky bylo napipetováno 100 µl optimálně naředěné buněčné kultury a byla ponechána růst 24 hodin v inkubačním boxu.

Druhý den bylo z jamek odpipetováno médium a místo něho bylo přidáno 100 µl naředěných liposomů. Před přidáním na destičky byly testované liposomy zcentrifugovány 5 min při 14 000 otáčkách. Supernatant byl slit do čisté epinky a centrifugován 60 min při 14 000 otáčkách. Částice byly poté rozsuspendovány ve vodě a dvakrát zředěny. Naředěné liposomy byly zfiltrány přes bakteriologické filtry a naředěny médiem v rozmezí koncentrací od 0,39 % do 25 %. Destičky byly uloženy na 24 hodin do inkubačního boxu.

Další den bylo z jamek odpipetováno médium a do všech jamek bylo přidáno 20 µl sterilního MTT rozpuštěného v PBS pufru. Následně byly destičky kultivovány po dobu 3 hodin, poté bylo odpipetováno MTT a do všech jamek bylo nadávkováno 100 µl SDS rozpuštěného v PBS pufru, což mělo za následek zvýšení rozpustnosti tmavě fialově zbarvených krystalů formazanu. Destičky byly uloženy do tmy na minimálně 24 hodin. Cytotoxicita byla stanovována spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm a pro kontrolu byla použita absorbance čisté buněčné kultury. Vzorek byl určen jako cytotoxický při poklesu absorbance pod 60 %.

### 3.8 Příprava kosmetických produktů a senzorická analýza

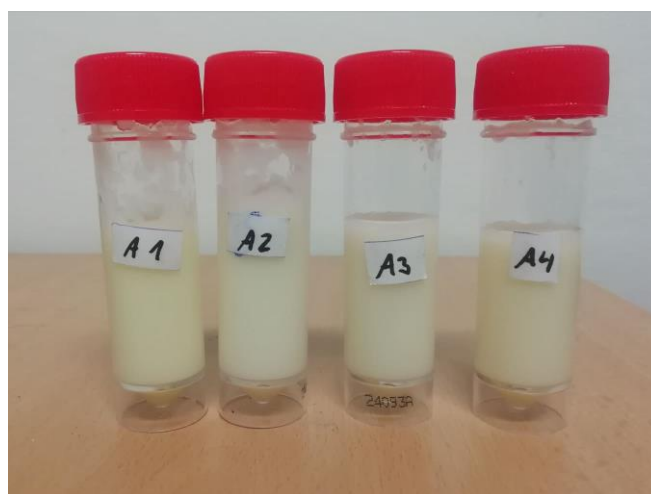
Pro přípravu kosmetických produktů s anti-aging účinky byly vybrány tři typy produktů – denní krém, noční krém a pleťové sérum. Každý typ produktu byl ještě rozdělen na čtyři druhy – výrobek neobsahující žádné aktivní látky, výrobek obsahující aktivní látky v neenkapsulované formě, výrobek obsahující aktivní látky v enkapsulované formě a výrobek obsahující prázdné liposomy. Jako aktivní látky bylo použito všech 6 testovaných látek a pro enkapsulovanou formu a prázdné částice byl použit sójový lecitin. Připravené produkty byly testovány na 15 dobrovolnicích po dobu 14 dní. Dobrovolnice při experimentu každý den aplikovaly připravené výrobky na 4 místa předloktí. Před testováním bylo změřeno několik parametrů pokožky na předloktí a po testování byly ty samé parametry změřeny na místech používání jednotlivých výrobků a tím byl pozorován vliv přípravků na pokožku. K analýze kůže byl použit software „Complete Skin Investigation“ a postupováno podle návodu výrobce.

#### 3.8.1 Postup přípravy kosmetických výrobků

Nejprve byly do dvou kádinek zvlášť připraveny fáze – olejová a vodná. Obsah olejové fáze se lišil podle druhu výrobku, a lze ho vidět v tabulce (Tabulka 1) níže. Vodná fáze obsahovala vždy 5 g glycerinu. Zbytek vodné fáze byl doplněn do 100 % podle toho, co měl daný produkt obsahovat. Výrobek neobsahující aktivní látky byl doplněn pouze vodou. Zbytek byl doplněn vodou a buď 6 % aktivních látek ve volné formě, 6 % aktivních látek v enkapsulované formě nebo 6 % prázdných sójových liposomů, přičemž u aktivních látek bylo dávkováno vždy po 1 % od každé aktivní látky. Následně byla vodná i olejová fáze zahřátá na 80 °C a 15 minut míchána na míchačkách. Po 15 minutách byly fáze schlazeny na 30 °C a bylo přidáno 0,5 % fenoxietanolu. Nakonec byly přidány aktivní látky a vzniklý konečný produkt byl nadávkován po 15-17 g do plastových tubiček (Obrázek 10).

Tabulka 1: Obsah olejové fáze pro jednotlivé druhy výrobků

	Denní krém (%)	Noční krém (%)	Sérum (%)
<b>Emulsan</b>	6	8	4
<b>Olej</b>	15	40	10
<b>Cetearylalkohol</b>	-	3	-



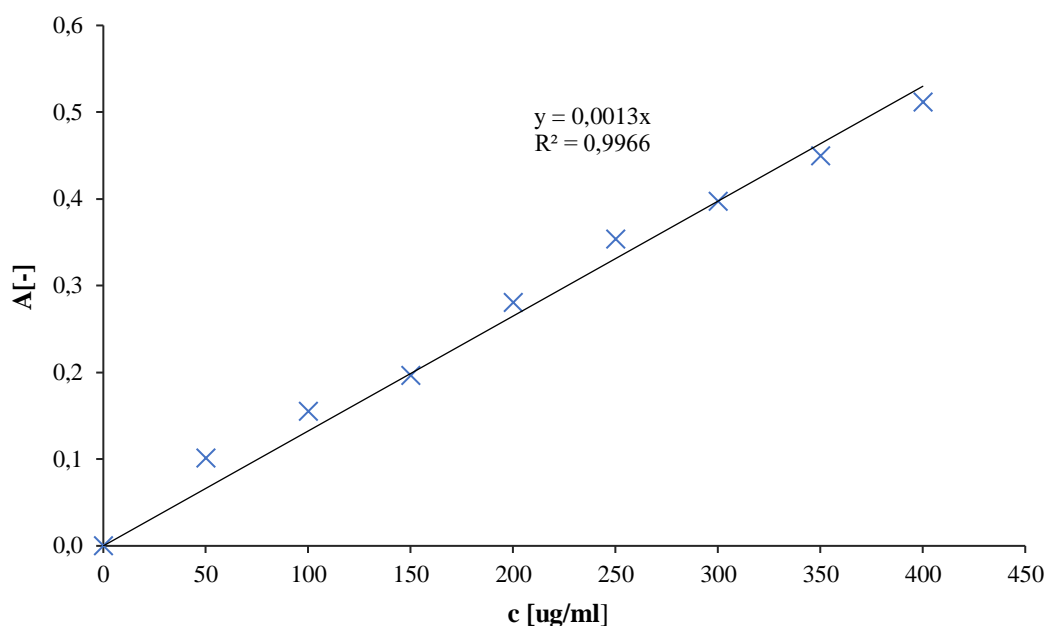
Obrázek 10: Ukázka 4 vzorků připravených kosmetických produktů

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na charakterizaci a enkapsulaci aktivní látek a následnou výrobu kosmetického přípravku s anti-aging vlastnostmi. K testování bylo vybráno 6 aktivních látek – kyselina ferulová, kyselina chlorogenová, vitamín A, vitamín E, vitamín B<sub>1</sub> a vitamín B<sub>2</sub>. Z těchto látek byly nejprve připraveny zásobní roztoky, u kterých byla zjišťována antioxidační aktivita. Následně byly aktivní látky enkapsulovány do dvou druhů lecitinů, a to do sójového a slunečnicového. U liposomů byla analyzována enkapsulační účinnost, dlouhodobá stabilita, stabilita částic a velikost částic. Dále byl na liposomech proveden MTT test cytotoxicity, abychom zjistili bezpečnost vybraných látek pro lidské kožní buňky. Z aktivních látek byly následně vyrobeny kosmetické přípravky, které byly podrobeny sensorické analýze, které se účastnily dobrovolnice. Na závěr práce byl také zpracován online dotazník o anti-aging kosmetice pro veřejnost.

### 4.1 Stanovení antioxidační aktivity

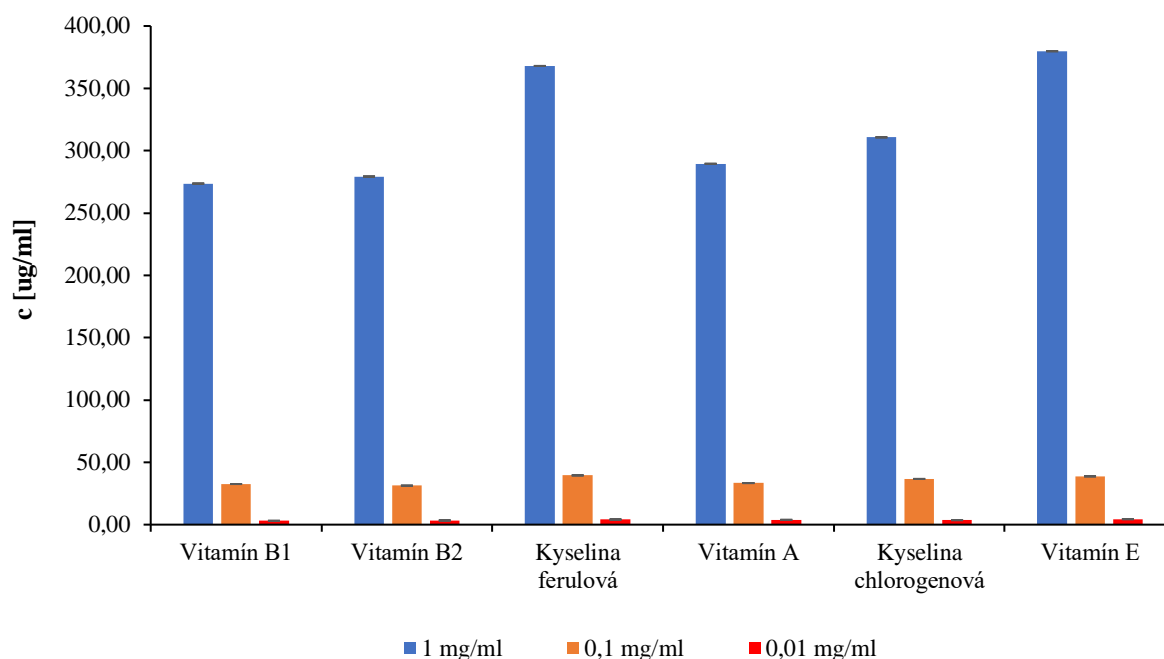
Pro stanovení antioxidační aktivity byla sestrojena kalibrační závislost kalibrační řády troloxu (Obrázek 11) podle postupu v kapitole 3.4.



Obrázek 11: Kalibrační závislost pro stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita vybraných aktivních látek byla analyzována v zásobních roztocích aktivních látek pro koncentraci 1 mg/ml, 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml. Každý vzorek byl měřen třikrát a byl vypočten průměr. Z lineární regrese kalibrační křivky byl poté vypočítán obsah antioxidantů. Výsledky měření jednotlivých vzorků jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 12).



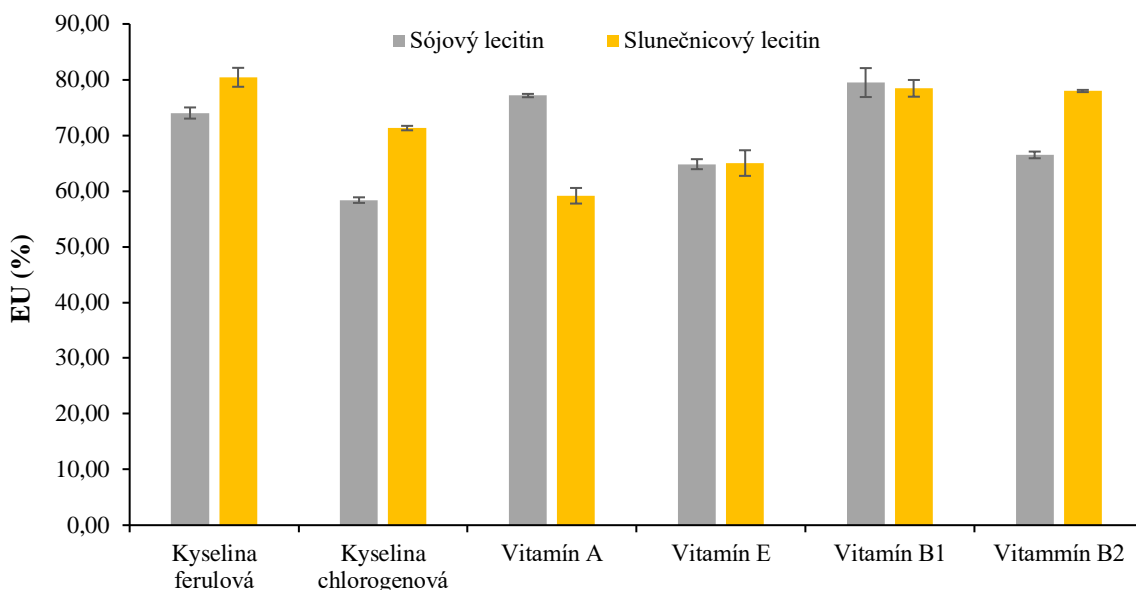


Obrázek 12: Výsledky stanovení antioxidační aktivity v zásobních roztocích

Z výsledků v grafu (Obrázek 12) je patrné, že z lipofilních vitamínů vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu neředěný roztok vitamínu E ( $379,74 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ), z fenolických kyselin neředěný roztok kyseliny ferulové ( $367,95 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ) a z vitamínů skupiny B neředěný roztok riboflavinu ( $279,23 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ). Celkově byla nejvyšší antioxidační aktivita zaznamenána u neředěného roztoku vitamínu E ( $379,74 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ) a nejmenší u neředěného roztoku vitamínu B<sub>1</sub> ( $273,59 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ). Obecně u vitamínů skupiny B byla nižší antioxidační aktivita v porovnání se zbytkem zkoumaných látek. V grafu lze dále vidět, že s ředěním klesla antioxidační aktivita dle očekávání o desetinu.

#### 4.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Byla analyzována enkapsulační účinnost liposomů s enkapsulovanými aktivními látkami. Liposomy byly připraveny podle postupu uvedeném v kapitole 3.5. Pro přípravu liposomů byl použit sójový a slunečnicový lecitin. Liposomy byly centrifugovány 5 minut při 14 000 ot./min. Po centrifugaci byly odlity supernatanty a centrifugovány 60 minut při 14 000 ot./min. Zcentrifugované liposomy byly opět odlity a v supernatantech byla stanovena antioxidační aktivita. Z rozdílu antioxidační aktivity před a po enkapsulaci byla stanovena enkapsulační účinnost v procentech.



Obrázek 13: Encapsulační účinnost z hlediska antioxidační aktivity

Ve výsledcích v grafu (Obrázek 13) lze vidět, že nejvyšší enkapsulační účinnosti z hlediska antioxidační aktivity dosahují slunečnicové liposomy s enkapsulovanou kyselinou ferulovou ( $80,42 \pm 1,0$  %) následované sójovými liposomy obsahujícími vitamin B<sub>1</sub> ( $79,48 \pm 2,6$  %) a slunečnicovými liposomy s vitaminem B<sub>1</sub> ( $78,44 \pm 1,5$  %). Nejnižších hodnot dosáhly slunečnicové liposomy s kyselinou ferulovou ( $58,37 \pm 0,5$  %) a slunečnicové liposomy s vitaminem A ( $59,15 \pm 1,4$  %). Obecně vyšších hodnot enkapsulační účinnosti dosahovaly slunečnicové liposomy.

### 4.3 Stanovení velikosti a distribuce částic

Liposomy připravené dle postupu uvedeného v kapitole 3.5 byly podrobeny analýze velikosti a distribuce částic, bylo postupováno podle postupu v kapitole 3.5.1.2. Všechny liposomy byly proměřeny třikrát a získané hodnoty se zprůměrovaly.

#### 4.3.1 Stanovení velikosti a distribuce částic

Tabulka 2: Velikost a distribuce částic

	Sójový lecitin		Slunečnicový lecitin	
	Velikost [nm]	PdI [-]	Velikost [nm]	PdI [-]
Kyselina ferulová	191,6±2,5	0,181±0,024	193,5±5,0	0,277±0,010
Kyselina chlorogenová	247,8±10,5	0,223±0,063	163,3±2,3	0,190±0,017
Vitamin A	173,7±1,9	0,135±0,008	286,0±3,9	0,415±0,012
Vitamin E	158,1±2,2	0,139±0,016	253,0±5,9	0,367±0,007
Vitamin B <sub>1</sub>	247,8±5,8	0,199±0,073	198,2±17,4	0,270±0,054
Vitamin B <sub>2</sub>	239,9±9,4	0,247±0,060	170,1±6,2	0,219±0,010
Prázdné částice	225,6±6,3	0,272±0,042	183,0±7,8	0,251±0,015

V tabulce (Tabulka 2) lze vidět, že prázdné liposomy sójového lecitinu ( $225,6\pm 6,3$  nm) dosáhly větší velikosti než prázdné liposomy slunečnicového lecitinu ( $183,0\pm 7,8$  nm). To samé platí pro distribuci, ta dosahovala u prázdných sójových liposomů ( $0,272\pm 0,042$ ) vyšších hodnot než u slunečnicových liposomů ( $0,251\pm 0,015$ ).

Hodnoty velikosti liposomů s aktivními látkami pohybují mezi 150 nm až 300 nm. Nejvyšší hodnoty velikosti dosáhly slunečnicové liposomy obsahující vitamín A ( $286,0\pm 3,9$  nm) následované slunečnicovými liposomy obsahující vitamín E ( $253,0\pm 5,9$  nm). Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u sójových liposomů obsahujících vitamín E ( $158,1\pm 2,2$  nm) a slunečnicových liposomů obsahujících kyselinu chlorogenovou ( $163,3\pm 2,3$  nm). Obecně se velikosti mezi sójovými liposomy a slunečnicovými liposomy stejné aktivní látky značně liší, až na liposomy kyseliny ferulové, u které slunečnicové liposomy ( $193,5\pm 5,0$  nm) a sójové liposomy ( $191,6\pm 2,5$  nm) dosahují podobné velikosti. Co se týče distribuce, tak nejvyšší hodnoty dosáhly slunečnicové liposomy s obsahem vitamínu A ( $0,415\pm 0,012$ ) a s obsahem vitamínu E ( $0,367\pm 0,007$ ), nejnižších hodnot pak sójové liposomy obsahující vitamín A ( $0,135\pm 0,008$ ) a vitamín E ( $0,139\pm 0,016$ ).

#### 4.4 Stanovení dlouhodobé stability

Při stanovování dlouhodobé stability bylo postupováno podle návodu v kapitole 3.5.1.2. Stabilita byla zkoumána po 4 týdnech od přípravy liposomů a měření jejich enkapsulační účinnosti z hlediska antioxidační aktivity. Z rozdílu koncentrace aktivních látek po 4 týdnech skladování bylo vypočteno množství zbylých enkapsulovaných látek. Výsledné hodnoty dlouhodobé stability jsou zaznamenány v tabulce níže.

Tabulka 3: Porovnání enkapsulační účinnosti a dlouhodobé stability po 4 týdnech

	Sójový lecitin		Slunečnicový lecitin	
	EU (%)	DS (%)	EU (%)	DS (%)
<b>Kyselina ferulová</b>	74,01±1,0	41,05±1,8	80,42±1,7	59,65±0,7
<b>Kyselina chlorogenová</b>	58,37±0,5	18,96±1,3	71,30±0,4	42,34±0,7
<b>Vitamín A</b>	77,14±0,3	41,57±1,3	59,15±1,4	32,16±1,6
<b>Vitamín E</b>	64,82±0,9	44,29±2,4	65,02±2,3	39,84±0,1
<b>Vitamín B<sub>1</sub></b>	79,48±2,6	71,04±0,6	78,44±1,5	43,49±0,6
<b>Vitamín B<sub>2</sub></b>	66,48±0,6	47,11±0,9	77,96±0,2	30,05±1,5

Ve výsledcích v tabulce (Tabulka 3) lze vidět porovnání hodnot enkapsulační aktivity a dlouhodobé stability pro sójové a slunečnicové liposomy po 4 týdnech skladování. V obou případech dlouhodobá stabilita výrazně klesla. Obecně lze říci, že liposomy obsahující sójový lecitin dosáhly mírně vyšších hodnot dlouhodobé stability než liposomy obsahující slunečnicový lecitin. Nejvyšší hodnoty dlouhodobé stability dosáhly obecně sójové liposomy obsahující vitamín B1 ( $71,04\pm 0,6$  %), u kterých byl také zaznamenán nejmenší pokles oproti enkapsulační stabilitě ( $79,48\pm 2,6$  %). Nejvyšší dlouhodobá stabilita u slunečnicového lecitinu byla pak analyzována u liposomů s obsahem kyseliny ferulové ( $59,65\pm 0,7$  %).

Nejnižší dlouhodobá stabilita byla zjištěna obecně u sójových liposomů s obsahem kyseliny chlorogenové ( $18,96 \pm 1,3$  %) a nejnižších hodnot dlouhodobé stability slunečnicových liposomů bylo dosaženo u liposomů s riboflavinem ( $30,05 \pm 1,5$  %), u kterého byl také zaznamenán největší pokles oproti enkapsulační aktivitě.

#### 4.5 Stanovení stability částic

Stanovení stability liposomových částic bylo provedeno podle návodu uvedeném v kapitole 3.5.1.2. Všechny liposomy byly měřeny třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány a znamenány do tabulek a grafů.

Tabulka 4: Stabilita částic

	Sójový lecitin	Slunečnicový lecitin
	ZP [mV]	ZP [mV]
Kyselina ferulová	$-37,4 \pm 1,9$	$-16,2 \pm 1,9$
Kyselina chlorogenová	$-43,0 \pm 1,9$	$-17,7 \pm 0,6$
Vitamín A	$-44,1 \pm 0,8$	$-26,2 \pm 1,2$
Vitamín E	$-42,6 \pm 1,5$	$-24,0 \pm 1,3$
Vitamín B <sub>1</sub>	$-41,5 \pm 0,4$	$-25,9 \pm 0,9$
Vitamín B <sub>2</sub>	$-35,9 \pm 3,0$	$-22,8 \pm 1,0$
Prázdné částice	$-34,3 \pm 1,6$	$-21,8 \pm 4,3$

Z dat v tabulce (Tabulka 4) lze vidět, že u prázdných částic sójového lecitinu byl naměřen zeta potenciál  $-34,3 \pm 1,6$  mV. Vzhledem k tomu, že je hodnota nižší jak  $-30$  mV, můžeme tyto liposomy považovat za stabilní. Na druhou stranu prázdné slunečnicové liposomy dosahovaly hodnoty  $-21,8 \pm 4,3$  mV, tedy potenciálu vyššího jak  $-30$  mV, tím pádem byly méně stabilní. Slunečnicové liposomy s obsahem aktivních látek byly ve všech případech méně stabilní. Liposomy ze sójového lecitinu všechny klesly pod hranici  $-30$  mV, a lze je tedy všechny považovat za stabilní. Nejvyšší stabilita byla naměřena u sójových liposomů obsahující vitamín A ( $-44,1 \pm 0,8$  mV) a u sójových liposomů s vitamínem E ( $-42,6 \pm 1,5$  mV). Nejnižší hodnoty pak byly naměřeny u slunečnicových liposomů obsahující kyselinu ferulovou ( $-16,2 \pm 1,9$  mV) a kyselinou chlorogenovou ( $-17,7 \pm 0,6$  mV).

##### 4.5.1 Stanovení stability částic po 4 týdnech

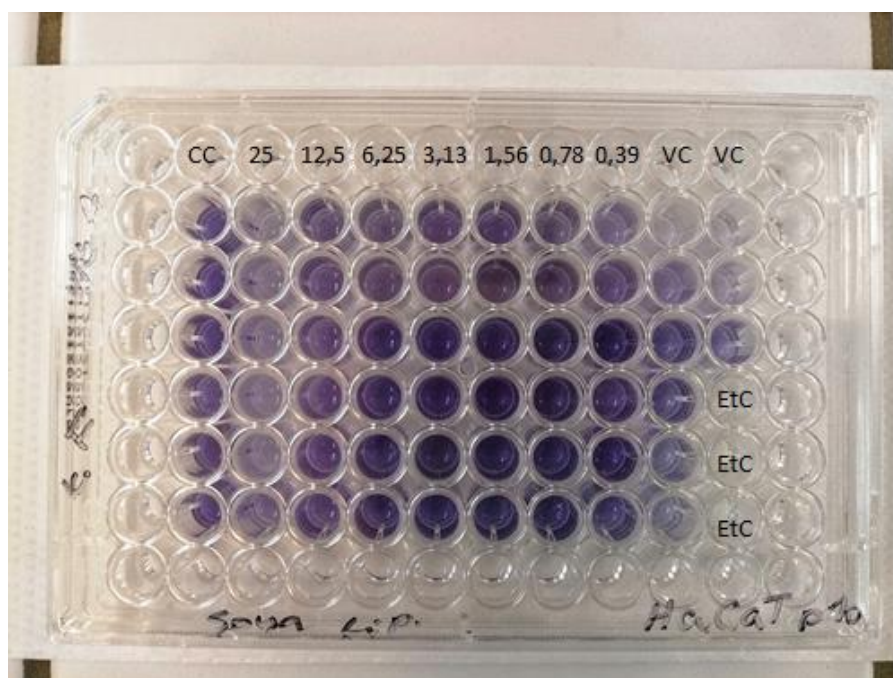
Tabulka 5: Stabilita liposomů po 4 týdnech

	Sójový lecitin	Slunečnicový lecitin
	ZP [mV]	ZP [mV]
Kyselina ferulová	$-41,4 \pm 0,7$	$-12,0 \pm 3,3$
Kyselina chlorogenová	$-32,4 \pm 0,8$	$-26,8 \pm 1,8$
Vitamín A	$-43,1 \pm 1,3$	$-25,1 \pm 2,4$
Vitamín E	$-39,9 \pm 3,2$	$-22,2 \pm 3,6$
Vitamín B <sub>1</sub>	$-38,6 \pm 2,0$	$-23,2 \pm 2,8$
Vitamín B <sub>2</sub>	$-46,4 \pm 1,2$	$-29,1 \pm 1,2$
Prázdné částice	$-19,8 \pm 2,1$	$-29,4 \pm 2,1$

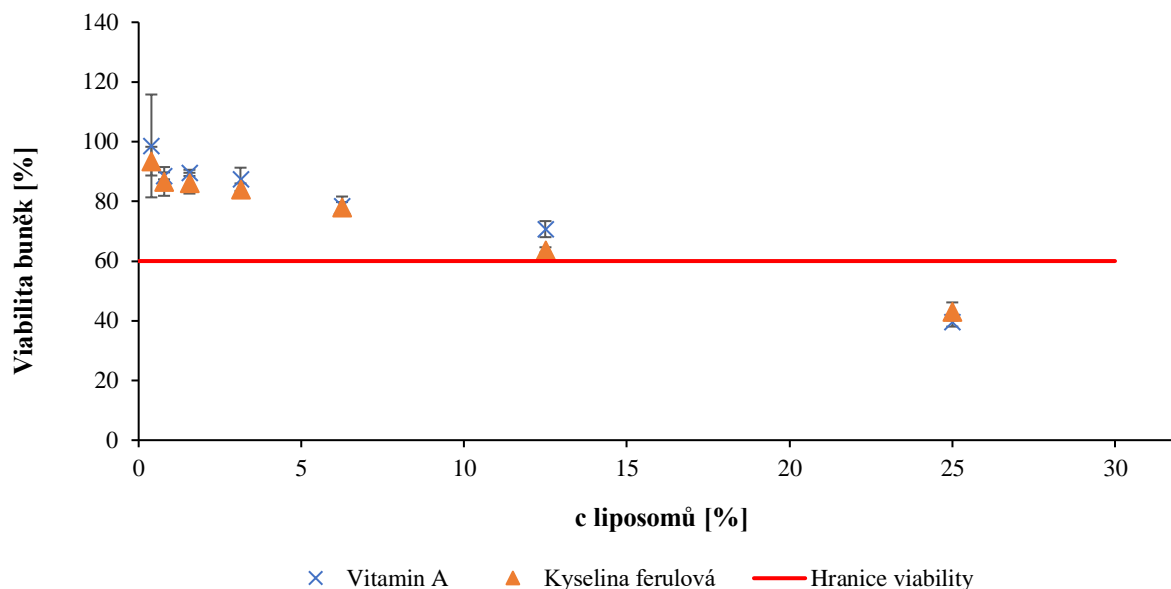
Z výsledků v tabulce (Tabulka 5) je patrné, že liposomy se sójovým lecitinem obecně dosahovaly vysoké stability i po 4 týdnech skladování. Nejvyšší stability dosáhly sójové liposomy s obsahem vitamínu B<sub>2</sub> (-46,4±1,2 mV) a nejnižší stabilita u sójových liposomů byla naměřena u prázdných částic (-19,8±2,1 mV). Stabilita slunečnicových liposomů byla opět nižší než stabilita sójových liposomů, Nejnižší hodnota stability byla zjištěna u slunečnicových liposomů s kyselinou ferulovou (-12,0±3,3 mV). Slunečnicové liposomy s obsahem kyseliny chlorogenové (-26,8±1,8 mV), vitamínu A (-25,1±2,4 mV), vitamínu B<sub>2</sub> (-29,1±1,2 mV) a prázdné částice (-29,4±2,1 mV) se blíží hodnotě -30 mV, tudíž lze je považovat za stabilní.

#### 4.6 MTT test

Testy cytotoxicity byly provedeny na 96-jamkové destičce na 10. pasáži buněčné linie HaCaT a bylo postupováno dle návodu v kapitole 3.7. Testovány byly sójové liposomy s obsahem vitamínu A a s obsahem kyseliny ferulové a slunečnicové liposomy s obsahem kyseliny ferulové a s obsahem kyseliny chlorogenové. Tyto liposomy byly vybrány na základě jejich vysoké antioxidační aktivity, enkapsulační účinnosti a stability. Výsledky jsou zaznamenány na obrázcích a v grafech níže.

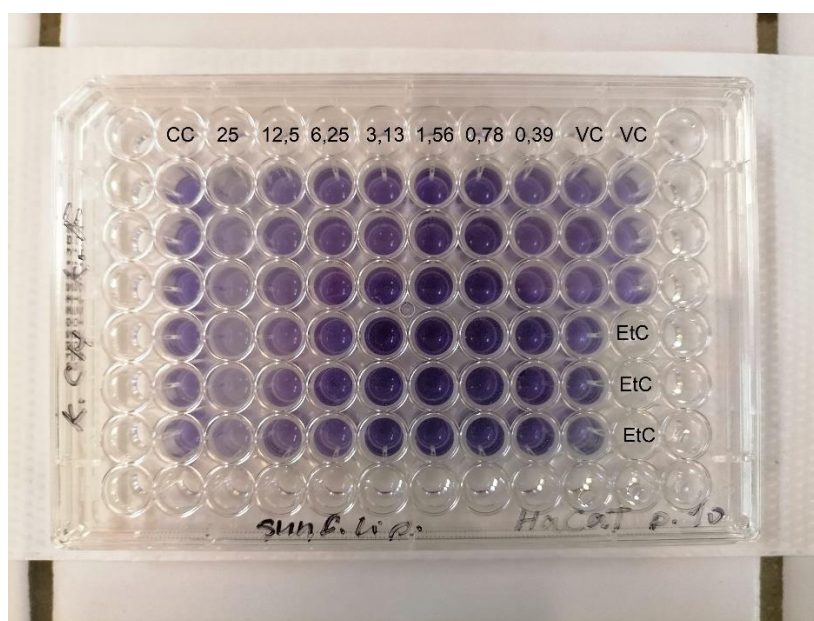


Obrázek 14: Destička se sójovými liposomy kyseliny ferulové a vitamínem A po ukončení MTT testu

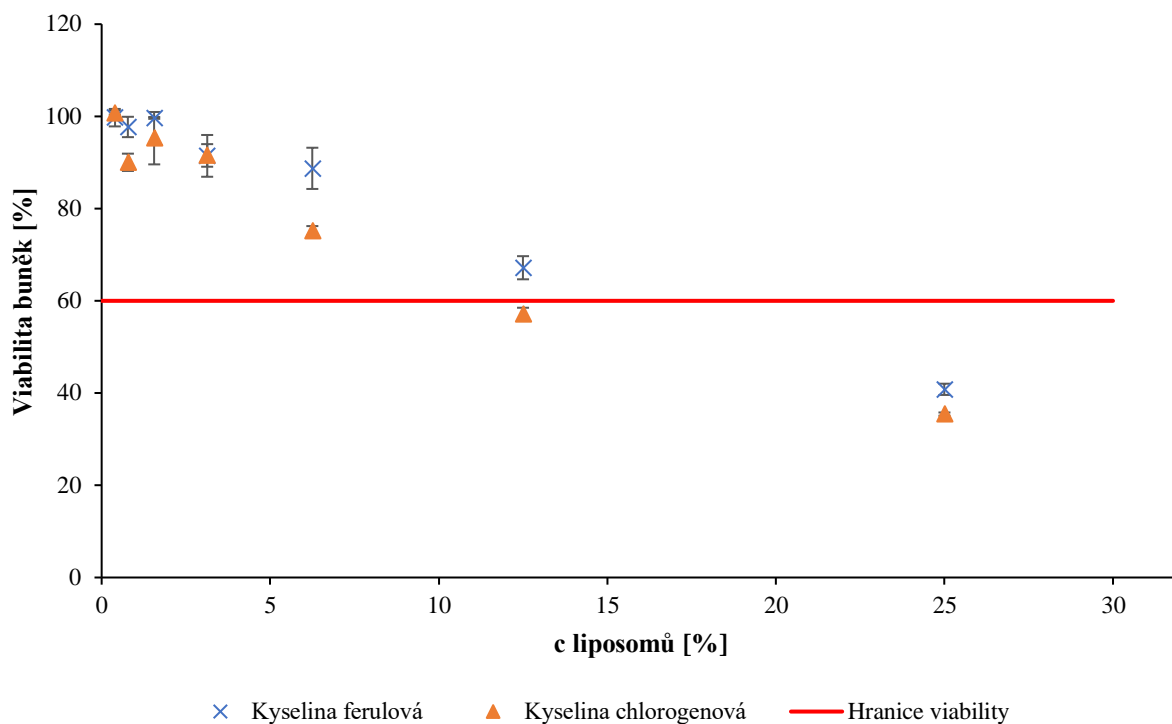


Obrázek 15: Výsledky MTT testu pro kyseliny ferulovou a vitamín A

Na obrázku (Obrázek 14) lze vidět mikrotitrační destičku po ukončení MTT testu pro škálu koncentrací od 25 % do 0,39 %. V prvním fialovém sloupci je kontrola buněk, poslední dva sloupce jsou kontrola prostředí a průhledné jamky v pravo dole jsou etanolová kontrola. Na obrázku si povšimnout zvyšující se intenzity barvy s klesající koncentrací vzorku. Z grafu (Obrázek 15) je pak patrné, že při koncentraci 25 % klesla viabilita buněk pro kyselinu ferulovou a vitamín A pod 60 %, tím pádem jsou považovány za toxické pro keratinocyty. Ostatní analyzované vzorky byly necytotoxické, tím pádem jsou vhodné na použití do kosmetických přípravků.



Obrázek 16: Destička se slunečnicovými liposomy kyseliny ferulové a kyseliny chlorogenové po ukončení MTT testu



Obrázek 17: Výsledky MTT testu pro kyseliny ferulovou a kyselinu chlorogenovou

V obrázku (Obrázek 16) zobrazeném výše lze vidět, že intenzita fialového zbarvení opět rostla se snižující se koncentrací. Podle výsledků z grafu (Obrázek 17) můžeme vyčíst, že při koncentraci 25 % klesla viabilita buněk pro kyselinu ferulovou i kyselinu chlorogenovou opět pod 60 % a kyselina chlorogenová při koncentraci 12,5 % také vykazovala cytotoxicitu vůči kožním buňkám. Vzorky při těchto koncentracích lze tedy považovat za nebezpečné pro keratinocyty. U zbylých koncentrací byla zjištěna jejich bezpečnost pro lidské kožní buňky, proto je lze využít jako účinnou složku kosmetických výrobků.

#### 4.7 Analýza parametrů kůže po používání připravených kosmetických produktů

U 15 dobrovolnic byly měřeny parametry kůže před a po 14 dnech používání testovaných kosmetických výrobků. Byly analyzovány následující parametry – deskvamace, množství mazu, skvrny, póry a vrásky. Dobrovolnice testovaly čtyři vzorky na čtyřech bodech předloktí podle kapitoly 3.8 a k analýze byl použit software „Complete Skin Investigation“. Výsledky před a po používání lze vidět v tabulkách níže.

Tabulka 6: Výsledky měření kůže před testováním

Dobrovolník	Fototyp	Maz – předloktí [-]	Maz – tváře [-]	Deskvamace [-]	Póry (%)	Skvrny (%)	Vrásky (%)
1	III	0,0	0,0	63,34	1,7	0,0	14,7
2	IV	0,0	4,7	75,61	2,3	0,0	16,8
3	III	0,0	5,5	16,56	2,4	0,0	19,2
4	III	0,0	0,7	43,80	1,4	0,0	17,3
5	III	0,0	0,5	71,05	1,5	0,0	19,9
6	III	0,0	1,3	52,96	2,2	0,8	14,9
7	III	0,0	0,1	91,52	2,5	0,0	20,5
8	V	0,0	0,3	54,45	2,8	0,0	26,5
9	III	0,0	0,0	57,04	3,1	0,0	21,5
10	III	0,0	0,0	46,00	1,5	0,0	16,9
11	III	0,1	0,1	40,79	2,4	0,0	22,7
12	III	0,0	4,9	30,28	0,8	1,3	23,2
13	III	0,0	0,0	49,05	1,7	0,0	19,3
14	III	0,1	1,0	64,76	1,6	0,0	20,6
15	IV	0,0	0,4	78,78	1,8	0,0	19,8

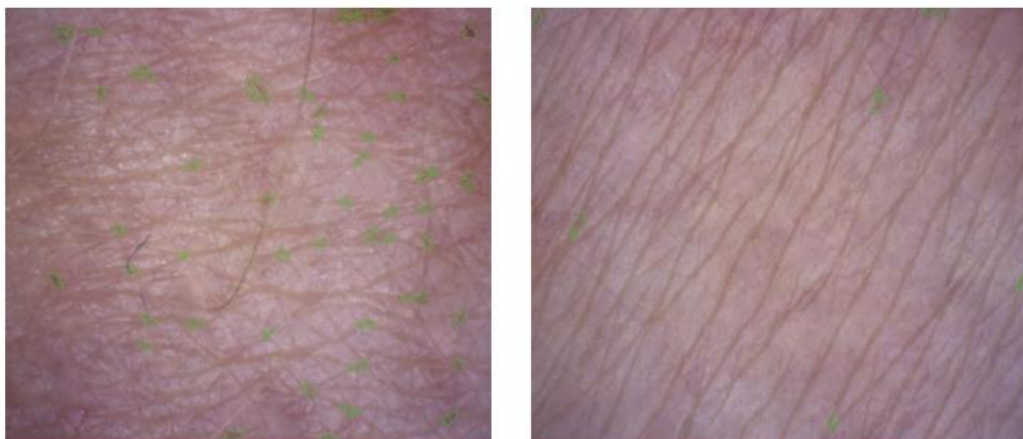
V tabulce (Tabulka 6) lze vidět výsledky měřených parametrů před testováním kosmetických výrobků. Fototyp vyjadřuje intenzitu pigmentace a odolnost kůže proti UV záření, která s rostoucím číslem stoupá. U většiny dobrovolnic byl na základě dotazu a pohledu na jejich kůži, vlasy a barvu očí určen fototyp III, což znamená, že mají středně světlé zbarvení kůže, pleti a očí, dobře se opalují a občas se spálí. Dále byl analyzován maz na předloktí a na tvářích, přičemž na předloktí vycházel ve většině případů nulový, což se k charakteru pokožky na předloktí dalo očekávat. Co se týče mazu na tvářích, až na pár výjimek byly u většiny dobrovolnic zaznamenány nenulové hodnoty v rozmezí od 0,1 do 5,5. Deskvamace je přirozený proces, při kterém se kůže zbavuje korneocytů, které jsou pak nahrazovány novými ze spodních vrstev epidermis [119]. Z výsledků v tabulce její hodnoty u dobrovolnic vycházely různě a nezávisle na ostatních parametrech. Dále byly měřeny póry, skvrny a vrásky. Co se týče skvrn, až na dvě výjimky u dobrovolnice 7 a dobrovolnice 8 byly naměřeny nulové hodnoty. Hodnoty vrásek vycházely opět různě a nezávisle na ostatních parametrech, a to i na věku. Například dobrovolnice 1 byla ve věku 46-65 a naměřené hodnoty vrásek (14,7 %) vycházely nižší než u dobrovolnice 12, která byla ve věku 20-24 (23,2 %).



Tabulka 7: Výsledky měření před a po testování výrobků dobrovolnic ve věku 45-65

<b>Dobrovolnice 1</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	63,34	1,7	14,7
<b>NK – volné látky</b>	53,91	2,7	24,7
<b>NK – bez ničeho</b>	56,99	1,7	22,8
<b>NK – prázdné liposomy</b>	62,74	1,5	13,2
<b>NK – enkapsulované látky</b>	57,39	2,2	20,3
<b>Dobrovolnice 6</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	52,96	2,2	14,9
<b>Sérum – volné látky</b>	45,23	2,1	26,8
<b>Sérum – bez ničeho</b>	60,11	1,4	18,4
<b>Sérum – prázdné liposomy</b>	55,17	2,2	24,6
<b>Sérum – enkapsulované látky</b>	45,00	1,7	19,1
<b>Dobrovolnice 7</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	91,52	2,5	20,5
<b>DK – volné látky</b>	53,59	1,9	23,1
<b>DK – bez ničeho</b>	76,19	3,1	18,9
<b>DK – prázdné liposomy</b>	51,39	0,4	23,6
<b>DK – enkapsulované látky</b>	63,89	1,4	23,0

Tabulka znázorňuje (Tabulka 7) výsledky měření parametrů kůže po 14 dnech testování výrobků u dobrovolnic ve věku mezi 45-65 lety. Dobrovolnice testovaly kosmetické výrobky podle postupu v kapitole 3.8. Parametry skvrn a mazu v tabulce nejsou zaznamenány, protože vycházely pro většinu případů nulové, a z toho důvodu byly při vyhodnocování zanedbány. Hodnoty deskvamace vyšly pro většinu případů nižší. Největší rozdíl lze vidět u dobrovolnice 7, kdy před testováním byla hodnota deskvamace 91,52 a po testování produktu s prázdnými částicemi klesla hodnota deskvamace až na 51,39. Lze obecně říci, že u dobrovolnic došlo po 14 dnů testování kosmetických produktů ke snížení deskvamace. Pro výrobky obsahující aktivní látky (1) ve volné formě lze vidět, že došlo ve všech případech ke snížení deskvamace. Pro výrobky neobsahující žádné aktivní látky až na dobrovolnici 6 došlo opět k mírnému snížení deskvamace. Pro produkty s prázdnými částicemi (3) si lze všimnout u dobrovolnice 1 nepatrné eliminace a u dobrovolnice 6 naopak zvýšení hodnoty. Co se týče pórů, u dobrovolnice 1 a 7 nelze vidět výrazné zlepšení. U dobrovolnice 7 můžeme vidět zlepšení u všech vzorků, až na vzorek 2, který neobsahoval žádné aktivní látky. Nejlepšího výsledku pak bylo dosaženo u výrobku 3, který obsahoval prázdné částice a u výrobku 4 obsahující enkapsulované aktivní látky. Výsledky před a po užití výrobků 3 lze vidět na obrázku níže (Obrázek 18). U parametru vrásek obecně nedošlo k výraznému zlepšení. U naměřených hodnot je pak důležité brát zřetel, že se porovnávala různá místa kůže, což také do velké míry mohlo ovlivnit výsledné parametry.



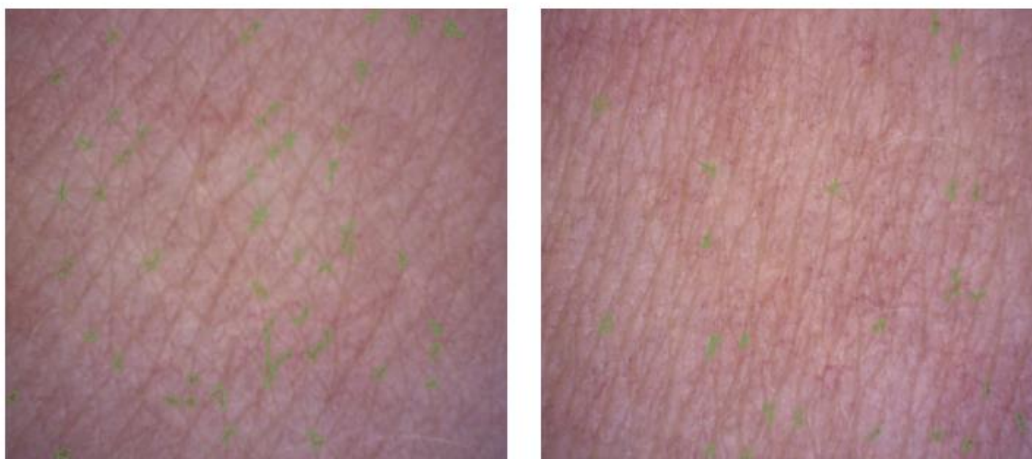
Obrázek 18: Póry před (2,5 %) a po (0,9 %) testování denního krému s prázdnými částicemi u dobrovolnice 7

Tabulka 8: Výsledky měření před a po testování výrobků dobrovolnic ve věku 20-24

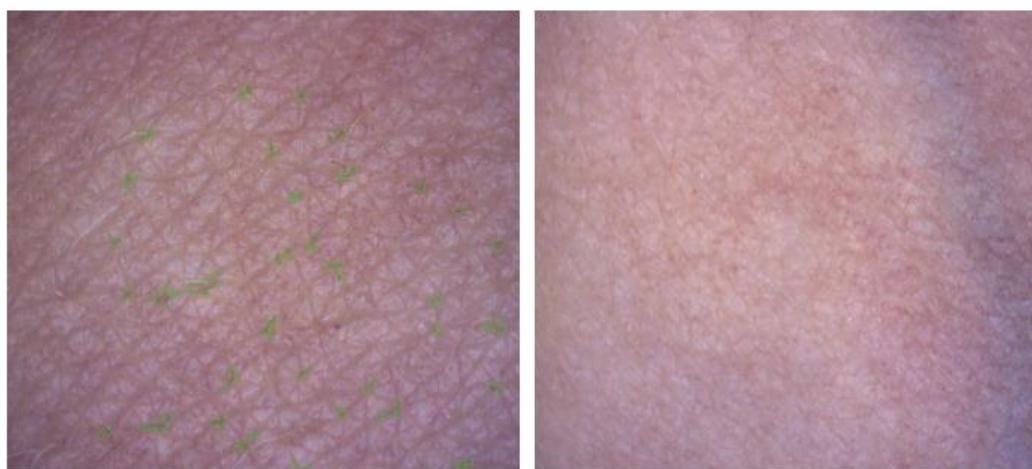
<b>Dobrovolnice 3</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	16,56	2,4	19,2
<b>DK – volné látky</b>	71,88	2,0	21,4
<b>DK – bez ničeho</b>	0,51	4,3	20,5
<b>DK – prázdné liposomy</b>	65,58	1,1	21,1
<b>DK – enkapsulované látky</b>	61,70	2,7	24,8
<b>Dobrovolnice 4</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	43,80	1,9	17,3
<b>DK – volné látky</b>	78,41	0,5	18,9
<b>DK – bez ničeho</b>	45,15	3,6	17,0
<b>DK – prázdné liposomy</b>	61,18	2,0	21,8
<b>DK – enkapsulované látky</b>	40,08	3,3	14,2
<b>Dobrovolnice 5</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	71,05	1,5	19,9
<b>NK – volné látky</b>	26,39	1,3	22,3
<b>NK – bez ničeho</b>	77,28	2,4	24,6
<b>NK – prázdné liposomy</b>	77,15	1,1	22,6
<b>NK – enkapsulované látky</b>	66,00	2,4	27,6
<b>Dobrovolnice 12</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	30,28	0,8	23,2
<b>Sérum – volné látky</b>	23,49	3,4	19,2
<b>Sérum – bez ničeho</b>	79,39	3,5	19,7
<b>Sérum – prázdné liposomy</b>	46,56	1,1	22,6
<b>Sérum – enkapsulované látky</b>	10,21	2,2	17,4

V tabulce (Tabulka 8) jsou zpracovány výsledky měření dobrovolnic ve věkovém rozmezí 20-24 let. Hodnoty deskvamace vycházely obecně nižší u výrobků obsahující aktivní látky v enkapsulované formě. U dobrovolnice 4 pro výrobek s enkapsulovanými aktivními látkami klesla hodnota deskvamace z 43,80 na 40,08, u dobrovolnice 5 klesla z hodnoty 71,05 na 66,00 a u dobrovolnice 12 z hodnoty 30,27 na 10,21. Lze tedy říci, že naše enkapsulované aktivní

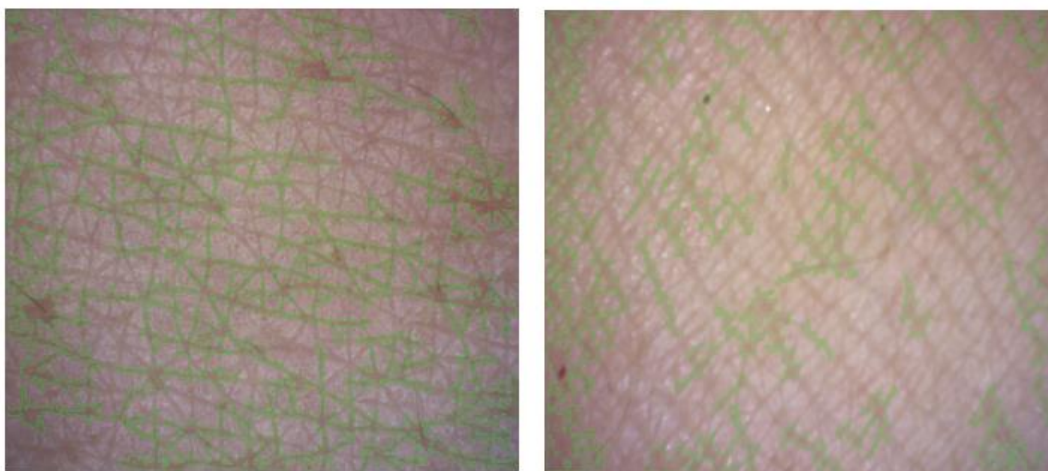
látky opět měly spíš pozitivní vliv na deskvamaci. U výrobků obsahující aktivní látky ve volné formě došlo ve dvou případech také ke snížení deskvamace, a to u dobrovolnice 5 z hodnoty 71,05 na 26,39 a u dobrovolnice 12 z hodnoty 30,28 na 23,49. Co se týče pórů, tak si obecně nelze povšimnout zlepšení, až na póry dobrovolnice 3, kdy došlo k výraznějšímu snížení hodnoty z 2,4 % na 1,1 % u prázdných liposomů (Obrázek 19) a dobrovolnice 4, kdy hodnota klesla z hodnoty 1,9 % na 0,5 % u výrobku obsahující volné aktivní látky (Obrázek 20). U vrásek opět obecně nedošlo k eliminaci, až na dobrovolnici 12, u které byly vrásky eliminovány u všech vzorků. U této dobrovolnice byl pak největší rozdíl hodnot zaznamenan po používání séra s enkapsulovanými aktivními látkami (Obrázek 21), přičemž hodnota klesla z 23,2 % na 17,4 %. Další eliminace vrásek byla naměřena u dobrovolnice 4 po používání denního krému obsahující enkapsulované aktivní látky, přičemž hodnota vrásek klesla z 17,3 % na 14,2 % (Obrázek 22). Opět je nutné u naměřených hodnot brát zřetel na analýzu různých míst kůže, a tím pádem i ovlivnění výsledných parametrů.



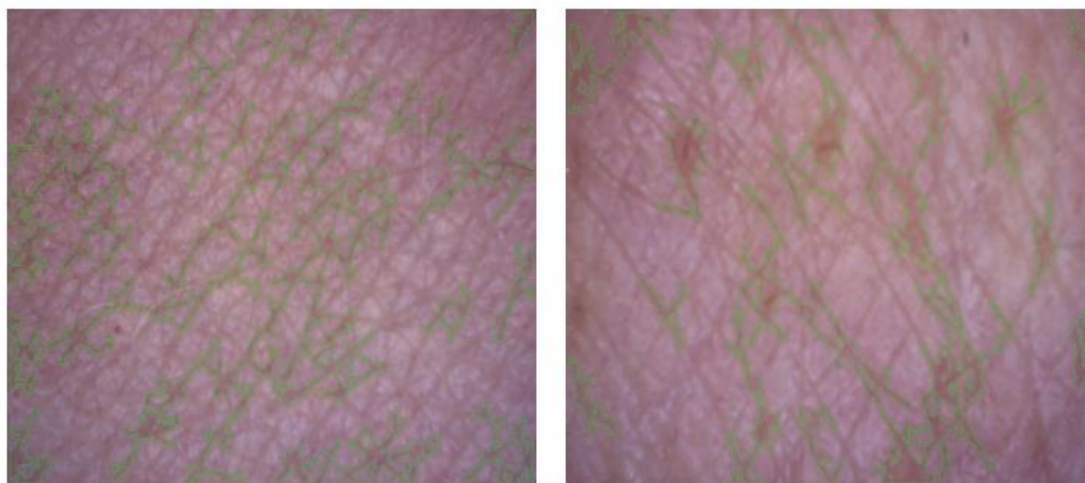
*Obrázek 19: Póry před (2,4 %) a po (1,1 %) testování denního krému s prázdnými liposomy u dobrovolnice 3*



*Obrázek 20: Póry před (1,9 %) a po (0,5 %) testování denního krému s volnými aktivními látkami u dobrovolnice 4*



*Obrázek 21: Vrásky před (23,2 %) a po (17,4 %) testování séra s liposomy obsahující aktivní látky u dobrovolnice 12*



*Obrázek 22: Vrásky před (17,3 %) a po (14,2 %) testování denního krému s obsahem enkapsulovaných aktivních látek u dobrovolnice 4*

Tabulka 9: Výsledky měření před a po testování výrobků dobrovolnic ve věku 25-35

<b>Dobrovolnice 2</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>	<b>Dobrovolnice 11</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	75,61	2,3	16,8	<b>Před testováním</b>	40,79	2,4	22,7
<b>NK – volné látky</b>	75,54	0,9	21,7	<b>NK – volné látky</b>	38,89	1,9	23,8
<b>NK – bez ničeho</b>	62,08	0,8	21,1	<b>NK – bez ničeho</b>	41,56	2,5	21,8
<b>NK – pr. liposomy</b>	58,44	1,2	18,6	<b>NK – pr. liposomy</b>	31,98	2,4	19,1
<b>NK – enk. látky</b>	65,97	0,8	21,1	<b>NK – enk.látky</b>	48,97	1,8	20,8
<b>Dobrovolnice 8</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>	<b>Dobrovolnice 13</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	54,45	2,8	26,5	<b>Před testováním</b>	49,05	1,7	19,3
<b>DK – volné látky</b>	22,27	3,7	17,7	<b>DK – volné látky</b>	25,68	1,0	14,6
<b>DK – bez ničeho</b>	49,21	3,3	18,0	<b>DK – bez ničeho</b>	20,23	2,3	18,8
<b>DK – pr. liposomy</b>	37,62	1,1	22,6	<b>DK – pr. liposomy</b>	13,24	1,4	19,1
<b>DK – enk. látky</b>	28,11	1,9	19,4	<b>DK – enk. látky</b>	27,71	2,3	19,2
<b>Dobrovolnice 9</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>	<b>Dobrovolnice 14</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	57,04	3,1	21,5	<b>Před testováním</b>	64,76	1,6	20,6
<b>Sérum – volné látky</b>	53,44	2,2	23,4	<b>Sérum – volné látky</b>	33,17	1,5	21,6
<b>Sérum – bez ničeho</b>	62,71	3,6	20,6	<b>Sérum – bez ničeho</b>	49,85	1,1	23,1
<b>Sérum – pr. liposomy</b>	59,17	1,7	6,7	<b>Sérum – pr. liposomy</b>	55,27	0,9	23,3
<b>Sérum – enk. látky</b>	41,10	2,6	16,3	<b>Sérum – enk. látky</b>	41,93	2,0	25,2
<b>Dobrovolnice 10</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>	<b>Dobrovolnice 15</b>	<b>Deskvamace [-]</b>	<b>Póry (%)</b>	<b>Vrásky (%)</b>
<b>Před testováním</b>	46,00	1,5	16,9	<b>Před testováním</b>	78,78	1,8	19,8
<b>NK – volné látky</b>	79,23	3,2	24,5	<b>Sérum – volné látky</b>	23,49	2,0	23,4
<b>NK – bez ničeho</b>	79,39	2,9	21,6	<b>Sérum – bez ničeho</b>	64,61	2,0	22,3
<b>NK – pr. liposomy</b>	70,28	2,6	22,8	<b>Sérum – pr. liposomy</b>	73,56	1,2	26,7
<b>NK – enk. látky</b>	3,77	1,5	22,6	<b>Sérum – enk. látky</b>	38,96	1,5	20,3

V tabulce výše (Tabulka 9) lze vidět výsledky měření parametrů kůže dobrovolnic ve věku 25-35 let. Hodnoty deskvamace kůže vycházely opět ve většině případů nižší než před testováním vzorků. U dobrovolnice 2 vycházely nejlepší výsledky deskvamace u prázdných částic (58,44) a u vzorku neobsahující žádné účinné látky (62,08). U dobrovolnice 8 byly nejlepší hodnoty naměřené u volných aktivních látek (22,27) a enkapsulovaných aktivních látek (28,11). Dobrovolnice 9 dosáhla nejlepších výsledků deskvamace po používání vzorku A4 s obsahem aktivních enkapsulovaných látek, kdy došlo k poklesu z hodnoty 57,04 na 41,10. Dobrovolnice 10 dosáhla nejlepších výsledků deskvamace u vzorků obsahující enkapsulované aktivní látky (3,77) a dobrovolnice 15 u vzorků s volnými aktivními látkami (23,49) a enkapsulovanými aktivními látkami (38,96). Co se týče vyhodnocení pórů, tak nejvýraznější eliminace byla zjištěna u dobrovolnice 2 po používání výrobku obsahující enkapsulované aktivní látky, kdy hodnota klesla z 2,3 % na 0,8 % (Obrázek 23) a po používání vzorku neobsahující žádné aktivní látky, kdy hodnota opět klesla na 0,8 % (Obrázek 24). U dobrovolnice 8 byly póry eliminovány nejvíce po používání prázdných liposomů (Obrázek 25), kdy hodnota klesla z 2,8 % na 1,1 % a po používání enkapsulovaných aktivních látek, kdy hodnota klesla na 1,9 (Obrázek 26).

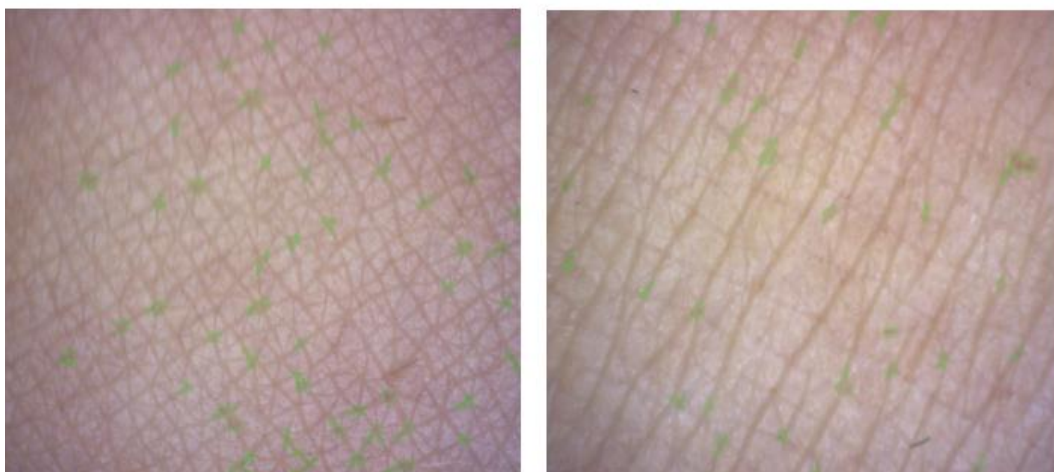
U dobrovolnice 9 vyšla nejlepší hodnota po používání séra obsahující prázdné liposomy (Obrázek 27), u dobrovolnice 13 po používání denního krému s volnými aktivními látkami (Obrázek 28) a u dobrovolnice 14 opět u séra s prázdnými liposomy (Obrázek 29). U dobrovolnice 15 opět k nejvyšší redukcí pórů došlo při používání prázdných liposomů (Obrázek 30), kdy se hodnota snížila z 1,8 % na 1,2 %. Co se týče vrásek, opět nebylo zaznamenáno výrazné zlepšení. Největší rozdíl byl naměřen u dobrovolnice 8 po používání vzorků s volnými aktivními látkami (Obrázek 31), kdy hodnota klesla z 26,5 % na 17,7 % a u vzorků neobsahující žádné aktivní látky (Obrázek 32), kdy byla zjištěna hodnota 18,0 %. Dále k výraznému zlepšení došlo u dobrovolnice 9 po používání vzorku séra s obsahem prázdných liposomů (Obrázek 33). Opět je u naměřených hodnot důležité brát ohled na to, že se měřila různá místa kůže, čímž mohly být výsledky do jisté míry ovlivněny.



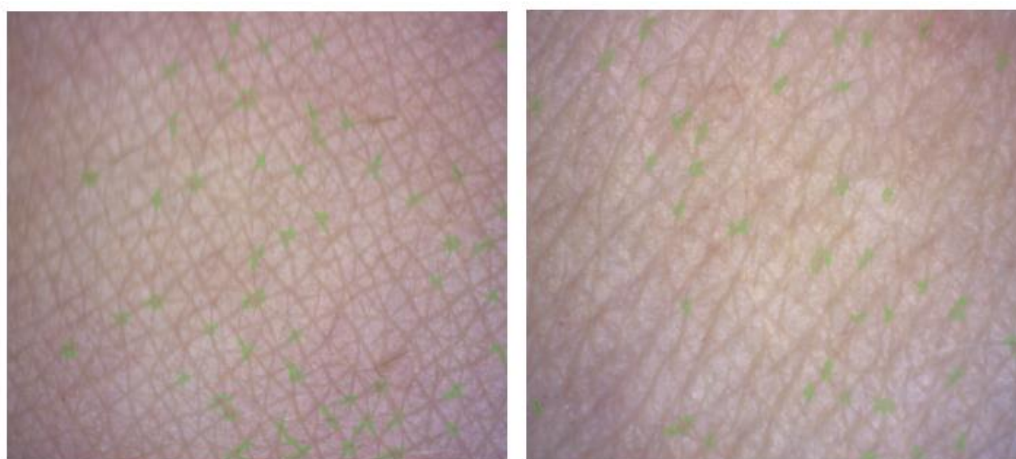
*Obrázek 23: Póry před (2,3 %) a po (0,8 %) testování nočního krému s enkapsulovanými aktivními látkami u dobrovolnice 2*



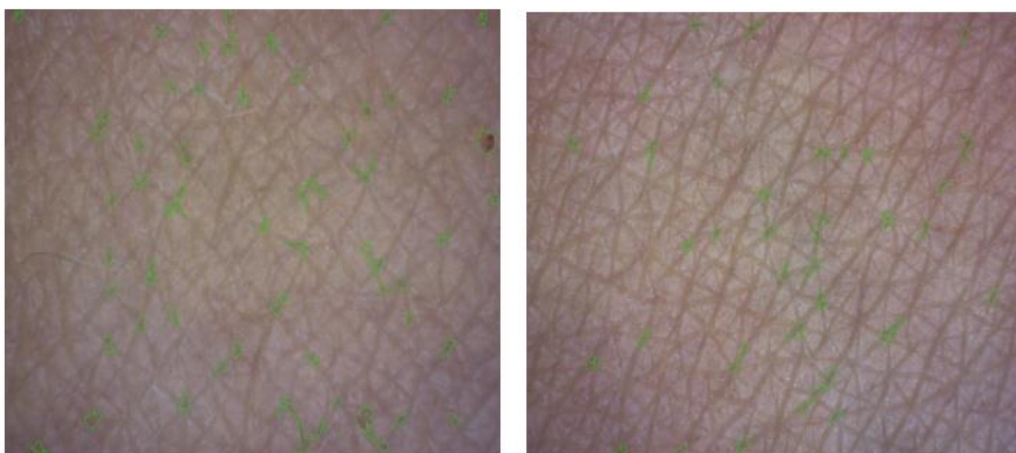
*Obrázek 24: Póry před (2,3 %) a po (0,8 %) testování nočního krému bez obsahu žádných aktivních látek u dobrovolnice 2*



*Obrázek 25: Póry před (2,8 %) a po (1,1 %) testování denního krému s obsahem prázdných liposomů u dobrovolnice 8*



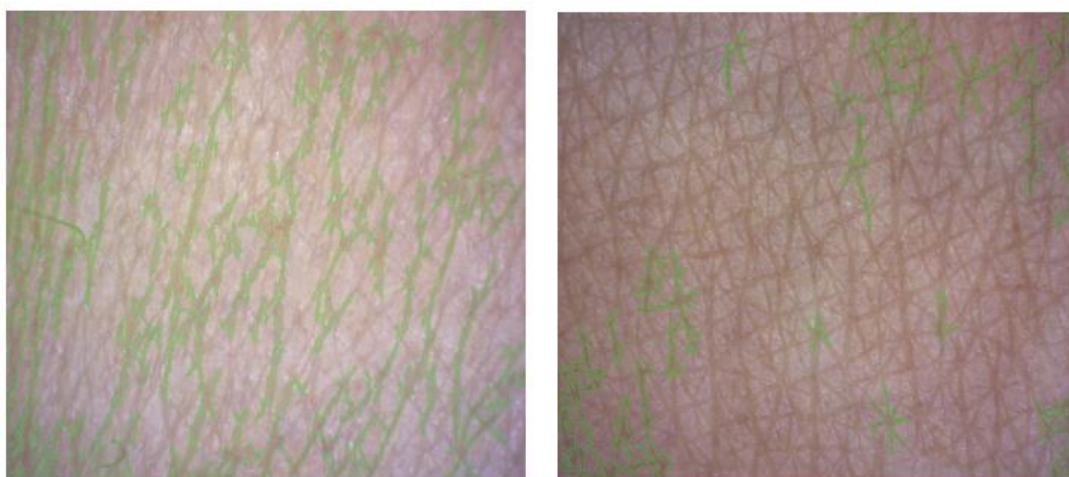
*Obrázek 26: Póry před (2,8 %) a po (1,9 %) testování denního krému s liposomy s aktivními látkami u dobrovolnice 8*



*Obrázek 27: Póry před (3,1 %) a po (1,7 %) testování séra s prázdnými liposomy u dobrovolnice 9*



*Obrázek 28: Póry před (1,7 %) a po (1,0 %) testování výrobku denního krému s volnými aktivními látkami u dobrovolnice 13*



*Obrázek 29: Póry před (1,6 %) a po (0,9 %) testování séra s prázdnými liposomy u dobrovolnice 14*

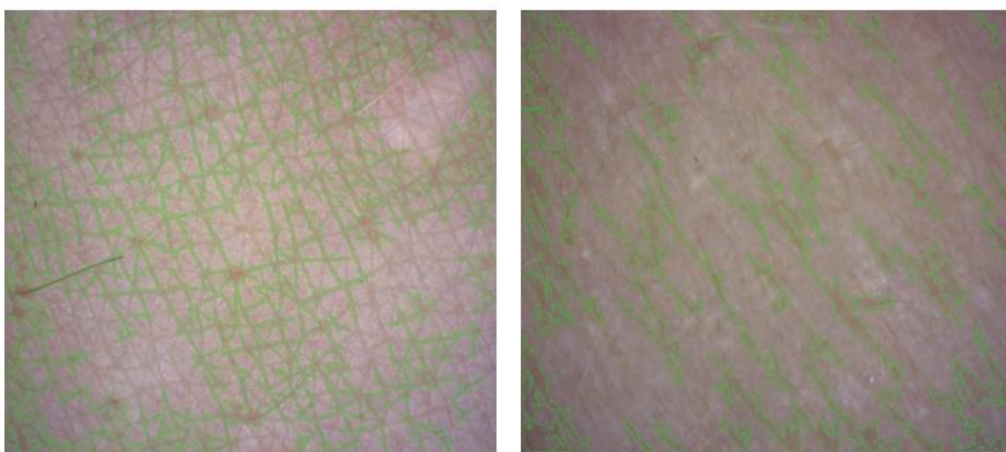


*Obrázek 30: Póry před (1,8 %) a po (1,2 %) testování výrobku séra s prázdnými liposomy u dobrovolnice 15*

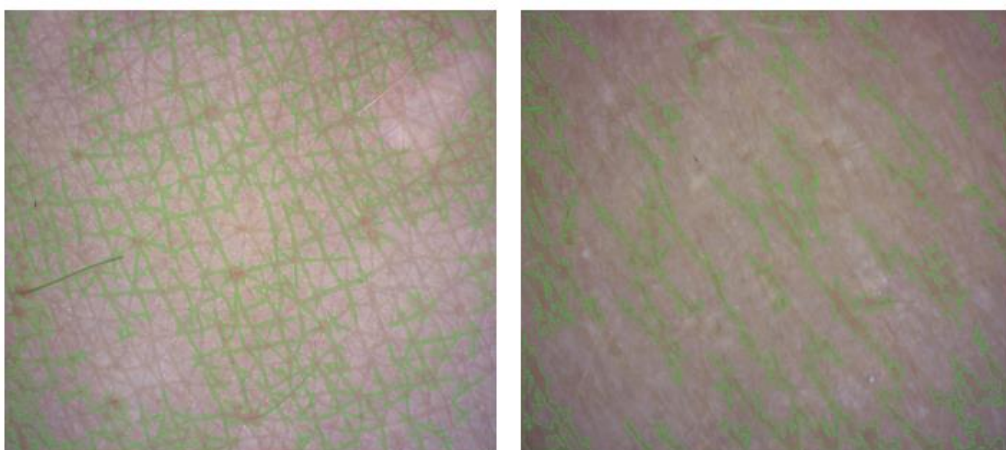




*Obrázek 31: Vrásky před (26,5 %) a po (17,7 %) testování výrobku denního krému s obsahem volných látek u dobrovolnice 8*



*Obrázek 32: Vrásky před (26,5 %) a po (18,0 %) testování denního krému bez obsahu aktivních látek u dobrovolnice 8*



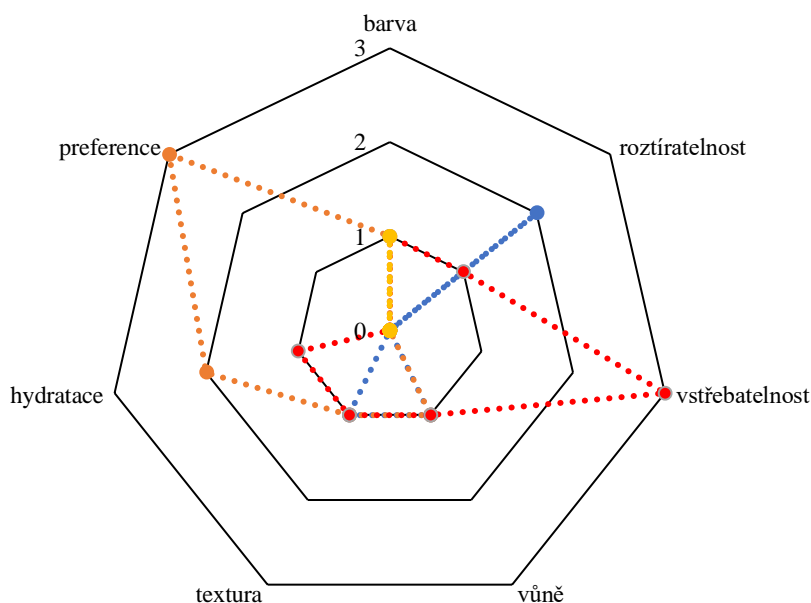
*Obrázek 33: Vrásky před (21,5 %) a po (6,7 %) testování séra s prázdnými liposomy u dobrovolnice 9*

Závěrem tohoto experimentu lze obecně říci, že naše připravené výrobky měly pozitivní vliv na pokožku. Nejlepší vliv měly výrobky na deskvamaci, tedy olupování pokožky, která ve většině případů klesala. Pozitivní vliv měly výrobky i na póry, ale u vrásek byly zaznamenány minimální rozdíly. Co se týče našich enkapsulovaných aktivních látek, které byly hlavním bodem našeho zkoumání, tak dle zlepšení deskvamace ve většině případů a zlepšení pórů v několika případech můžeme konstatovat, že splnily naše očekávání a lze takto připravené částice použít v přípravcích s anti-aging účinky.

#### 4.8 Senzorické vyhodnocení pořadových testů

Při těchto zkouškách 15 dotázaných hodnotitelek seřazovalo čtveřici vzorků podle 6 parametrů. Byla porovnávána intenzita barvy vzorků od nejsvětějšího (1) po nejtmaší (4), roztíratelnost vzorků od nejméně roztíratelného (1) po nejvíce roztíratelný (4), vstřebatelnost od nejhůře vstřebatelného (1) po nejlépe vstřebatelný (4), vůně od nejméně příjemné (1) po nejvíce příjemnou (4), textura od nejméně příjemné (1) po nejvíce příjemnou (4) a hydratační účinky od nejméně hydratujícího vzorku (1) po nejvíce hydratující vzorek (4). Nakonec hodnotitelky seřazovaly vzorky podle jejich preference od nejméně oblíbeného (1) po nejvíce oblíbený (4). Výsledky hodnocení byly zpracované do grafů podle věkových skupin pro jednotlivé druhy výrobku.

••••• volné akt. látky    ••••• bez obsahu akt. látek    ••••• prázdné liposomy    ••••• liposomy s obsahem akt. látek

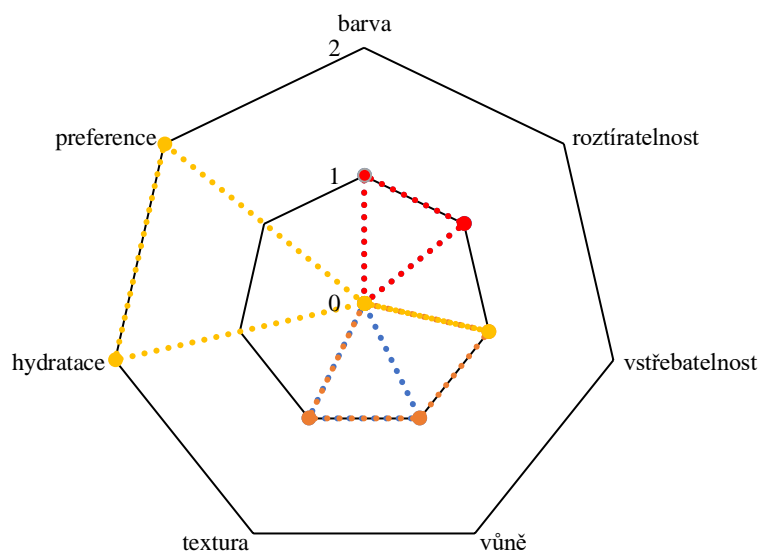


Obrázek 34: Graf vyhodnocení jednotlivých parametrů pro pleťové sérum ve věkové skupině 25-35 let

Graf (Obrázek 34) výše zobrazuje výsledky hodnocení intenzity jednotlivých znaků pro pleťové sérum pro věkovou kategorii 25-35 let. Na nejsvětějším vzorku se hodnotitelky neshodly ani jedenkrát, všechny hodnotitelky vybraly jako nejsvětější vzorek jiný produkt. Nejlepší roztíratelnost byla zaznamenána u vzorku s obsahem volných aktivních látek, na čemž se

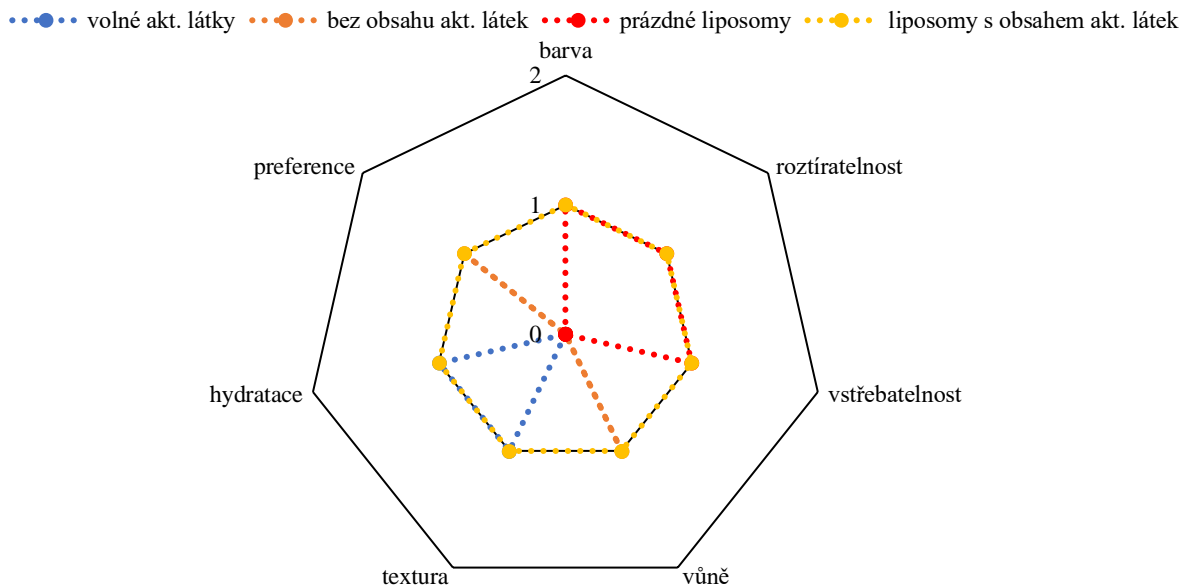
shodly dvě ze tří hodnotitelek. Co se týče vstřebatelnosti, ta byla nejlépe hodnocena u vzorku s prázdnými liposomy, na čemž se shodly všechny hodnotitelky této věkové kategorie. Na nejpříjemnější vůni ani textuře se hodnotitelky neshodly, avšak hydratační účinek označily dvě hodnotitelky jako nejlepší u výrobku bez obsahu aktivních látek a jako nejoblíbenější výrobek byl vybrán všemi hodnotitelkami vzorek bez obsahu aktivních látek. Co se týče konkrétních rozdílů a postřehů hodnotitelek mezi vzorky, jedna z dobrovolnic označila sérum bez obsahu aktivních látek jako nejtuzší. Dále byla u vzorku s obsahem volných aktivních látek a u vzorku bez obsahu aktivních látek povšimnuta vyšší stabilita při skladování v porovnání se vzorky obsahující liposomy.

••••• volné akt. látky    ••••• bez obsahu akt. látek    ••••• prázdné liposomy    ••••• liposomy s obsahem akt. látek



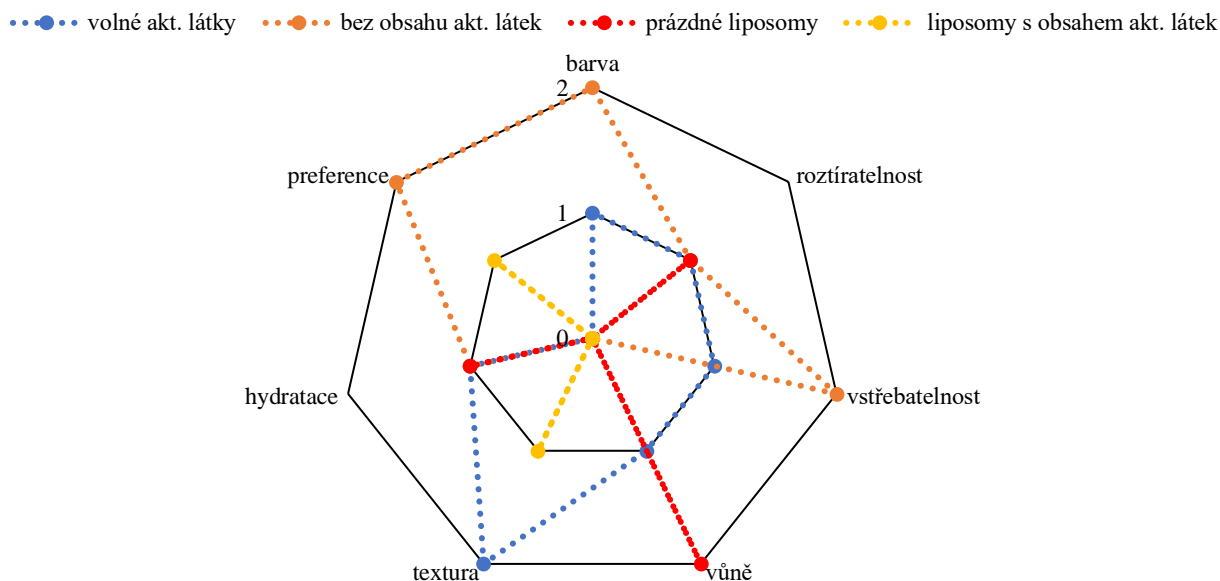
Obrázek 35: Graf vyhodnocení jednotlivých parametrů pro denní krém ve věkové skupině 20-24 let

Z výsledků zpracovaných v grafu (Obrázek 35) lze vidět vyhodnocení jednotlivých znaků pro denní krém ve věkové kategorii 20-24 let. Ve většině parametrů se hodnotitelky neshodly, až na hydratační účinky, kdy obě vybraly jako nejvíce hydratující vzorek s obsahem enkapsulovaných účinných látek a v preferenčním testu jim opět vyhovoval vzorek s obsahem liposomů s účinnými látkami.



Obrázek 36: Graf vyhodnocení jednotlivých parametrů pro denní krém ve věkové skupině 25-35 let

Výše zobrazený graf (Obrázek 36) ukazuje výsledky sensorické analýzy denního krému pro hodnotitelky mezi 25-35 lety. V této kategorii nedošlo k žádné shodě mezi hodnotitelkami. Lze si ale všimnout, že jedna hodnotitelka označila denní krém s liposomy s obsahem aktivních látek za nejlepší ve všech kategoriích. Z hodnotitelek pak jedna označila krémy celkově jako hůře vstřebatelné, přičemž tento aspekt po nějaké době pominul a pokožka byla příjemná na dotek. Po krému s obsahem volných aktivních látek zaznamenala na pokožce malou vyrážku a krémy s prázdnými liposomy a liposomy s aktivními látkami měly horší vstřebatelnost. Hodnotitelka také poznamenala, že krémy celkově neměly příjemnou vůni a preferovala by vůni „po čistotě“. Další hodnotitelka zaznamenala mezi vzorky rozdílnou viskozitu a opět byla vytčena nepříliš příjemná vůně vzorků a také nestabilita vzorku s liposomy s aktivními látkami.



Obrázek 37: Graf vyhodnocení jednotlivých parametrů pro noční krém ve věkové skupině 25-35 let

V grafu (Obrázek 37) ukazujícím výsledky parametrů pro noční krém ve věkové kategorii 25-35 si lze povšimnout více shod mezi hodnotitelkami než v předchozích případech. Přípravek bez obsahu aktivních látek byl vybrán dvěma ze tří hodnotitelek jako nejtmavší, nejlépe vstřebatelný a také nejvíce preferovaný. Vzorek s prázdňými liposomy měl nejpříjemnější vůni a vzorek s volnými aktivními látkami nejlepší texturu. Jedna z hodnotitelek poznamenala, že nezaznamenala žádný rozdíl v hydrataci. Další hodnotitelce nejvíce vyhovoval produkt s obsahem enkapsulovaných aktivních látek, a to hlavně z hlediska vůně. Dvě hodnotitelky si povšimly po používání výrobků na dotek jemnější pokožky. Vzorek s volnými aktivními látkami se podle další z hodnotitelek hůře roztíral, tvořil hrudky a měl výraznější vůni než ostatní a vzorky s prázdňými liposomy a enkapsulovanými aktivními látkami zanechaly po vstřebání mírně lepkavý film, který se dal z kůže setřít přejetím prstu. Podle této hodnotitelky by vzorky potřebovaly ovonět, protože v současném stavu měly slaný zápach.

#### 4.9 Dotazník o anti-aging kosmetice

Na závěr této práce byl také zařazen online dotazník o anti-aging kosmetice pro veřejnost. Jeho cílem bylo zjistit, do jaké míry je anti-aging kosmetika v povědomí lidí. Převaha dotazovaných byla ve věku 14-24 let, druhou početnou skupinu tvořili lidé ve věku 25-35 let a v kategorii 36-49 let byl pouze jeden člověk. Většina tázaných odpověděla, že jim anti-aging kosmetika něco říká (Příloha 1), ale nepoužívají ji. 16 z 36 tázaných odpovědělo, že se již nyní zajímají o prevenci stárnutí pokožky (Příloha 2) a 7 z 36 dokonce anti-aging kosmetiku již používá (Příloha 3). Všichni dotázaní se setkali s pojmem antioxidanty (Příloha 4) a většina věděla o jejich účincích zpomalení stárnutí (Příloha 5). Majorita tázaných očekávají od anti-aging kosmetiky hlavně celkové zlepšení stavu pleti, prevenci a mírnou eliminaci vrásek (Příloha 6). Na otázku, zda by preferovali spíše chemické nebo přírodní výrobky, většina odpověděla, že tento aspekt neřeší, další většina dává přednost přírodní kosmetice (Příloha 7). Lze tedy říci, že kosmetika proti stárnutí pleti je aktuálně populárním druhem kosmetiky.

## 5. ZÁVĚR

Záměrem této diplomové práce byla enkapsulace vybraných aktivních látek a možnost jejich aplikace v kosmetice s anti-aging účinky. Pro analýzu bylo vybráno 6 účinných látek s odlišnou povahou, a to vitamín E a vitamín A, vitamín B<sub>1</sub> a vitamín B<sub>2</sub>, a kyselina ferulová a kyselina chlorogenová. Tyto látky byly vybrány z důvodu jejich vysoké antioxidační aktivity a blahodárného vlivu na pleť. Účinné látky byly nejprve charakterizovány z hlediska jejich antioxidační aktivity, přičemž nejvyšší antioxidační aktivita byla zaznamenána u vitamínu E ( $379,74 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ) a kyseliny ferulové ( $367,95 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ). Vitamíny B obecně vykazovaly nižší antioxidační aktivitu.

Následně byly všechny aktivní látky enkapsulovány do liposomů sójového a slunečnicového lecitinu. U takto připravených částic byla analyzována jejich velikost, enkapsulační účinnost, stabilita a dlouhodobá stabilita po 4 týdnech skladování. Průměrná velikost částic se pohybovala mezi 150 nm až 300 nm. Z hlediska zeta potenciálu byly částice stabilní. Vyšší hodnoty stability vykazovaly sójové liposomy, u nichž ve všech případech vycházel zeta potenciál nižší jak -30 mV, u slunečnicových byl ve většině případech potenciál o něco vyšší jak -30 mV, avšak částice lze stále považovat za stabilní. Nejvyšší stabilita byla naměřena u sójových liposomů obsahující vitamín A ( $-44,1 \pm 0,8 \text{ mV}$ ) a u sójových liposomů s vitamínem E ( $-42,6 \pm 1,5 \text{ mV}$ ). Enkapsulační účinnost byla naopak mírně vyšší u liposomů se slunečnicovým lecitinem. Nejvyšší enkapsulační účinnosti z hlediska antioxidační aktivity dosáhly slunečnicové liposomy s enkapsulovanou kyselinou ferulovou ( $80,42 \pm 1,0 \%$ ) následované sójovými liposomy obsahujícími vitamín B<sub>1</sub> ( $79,48 \pm 2,6 \%$ ) a slunečnicovými liposomy s vitamínem B<sub>1</sub> ( $78,44 \pm 1,5 \%$ ). Dále se ukázalo, že po 4 týdnech skladování došlo k uvolnění aktivních látek do prostředí. Nejvyšší dlouhodobé stability dosáhly sójové liposomy obsahující vitamín B<sub>1</sub> ( $71,04 \pm 0,6 \%$ ), u kterých byl také zaznamenán nejmenší pokles oproti enkapsulační stabilitě ( $79,48 \pm 2,6 \%$ ). Co se týče dlouhodobé stability z pohledu zeta potenciálu, sójové liposomy dosahovaly vysoké stability i po 4 týdnech skladování. Nejvyšší stabilita byla naměřena u sójových liposomů obsahující vitamínu B<sub>2</sub> ( $-46,4 \pm 1,2 \text{ mV}$ ). Stabilita slunečnicových liposomů byla opět zjištěna nižší než u sójových liposomů. Nejvyšší hodnota stability slunečnicových liposomů byla pak naměřena u vitamínu B<sub>2</sub> ( $-29,1 \pm 1,2 \text{ mV}$ ).

Vzhledem k tomu, že náplní této práce bylo také připravit kosmetické produkty s obsahem vybraných látek, bylo nutné u těchto látek ověřit jejich bezpečnost pro lidské kožní buňky. Byla vybrána čtveřice liposomů, které byly podrobeny MTT testům cytotoxicity. Pro analýzu byly zvoleny sójové liposomy s obsahem kyseliny ferulové, sójové liposomy s obsahem vitamínu A, slunečnicové liposomy s obsahem kyseliny ferulové a slunečnicové liposomy s obsahem kyseliny chlorogenové. Tyto liposomy byly vybrány na základě vysoké stability, enkapsulační účinnosti a antioxidační aktivity. Test byl proveden na lidských keratinocytech HaCaT. Jako cytotoxické byly zjištěny sójové liposomy s obsahem vitamínu A a s obsahem kyseliny ferulové při koncentracích 25 % a slunečnicové liposomy s obsahem kyseliny ferulové a chlorogenové při koncentracích 25 % a s obsahem kyseliny chlorogenové při koncentraci 12,5 %. Zbylé vzorky byly vyhodnoceny jako necytotoxické, tedy bezpečné pro lidské kožní buňky a lze je využít jako aktivní složku kosmetických produktů.

Na základě výsledků byl nejoptimálnějším materiálem pro přípravu liposomů k enkapsulaci vybraných účinných látek stanoven sójový lecitin. Liposomy obsahující sójový lecitin byly

použity pro přípravu kosmetických přípravků. Byly připraveny 3 druhy kosmetických výrobků, a to denní krém, noční krém a pleťové sérum. Každý druh kosmetického výrobku byl dále rozdělen na 4 typy – výrobek neobsahující žádné aktivní látky, výrobek obsahující aktivní látky v neenkapsulované formě, výrobek obsahující aktivní látky v enkapsulované formě a výrobek obsahující prázdné liposomy. Jako účinné látky bylo použito všech 6 vybraných látek. Finální produkty byly testovány po dobu dvou týdnů na 15 dobrovolnicích. Dobrovolnice tvořily tři skupiny podle věku. V první skupině byly dobrovolnice mezi 20-24 lety, v druhé mezi 25-35 lety, a ve třetí od 50 let a výš. Před použitím a po použití výrobků byly změřeny parametry pokožky na předloktí a na základě toho byl zjištěn efekt přípravků na případné omlazení pokožky. Mezi testované parametry patřily póry, skvrny, vrásky, maz a deskvamace. Hodnoty skvrn a mazu vycházely u většiny dobrovolnic nulové, a z toho důvodu byly tyto parametry při vyhodnocování zanedbány. Ukázalo se, že naše výrobky obecně měly vliv na zlepšení stavu pokožky z hlediska deskvamace a pórů. Deskvamace byla zjištěna nižší v 41 případech z 60, póry pak v 30 z 60 případů. U parametru vrásek pak nebyly zaznamenány ve většině případů rozdíly. U vzorků obsahující aktivní látky v enkapsulované formě bylo zaznamenáno ze všech vzorků zlepšení parametrů nejčastěji. Deskvamace u těchto vzorků vyšla lepší v 13 z 15 případů, póry v 7 z 15 případů a vrásky v 6 z 15 případů. Dále dobrovolnice hodnotily senzorkou analýzu kosmetických produktů, přičemž hůře hodnocené byly vzorky obsahující liposomy s aktivními látkami. Několik hodnotitelek poznamenalo, že by preferovalo, když by výrobky byly aromatizované. Nejlepší odezva hodnotitelek byla na noční krémy, u kterých si hodnotitelky povšimly na dotek jemnější pokožky.

Součástí diplomové práce bylo také zpracování online dotazníku ohledně anti-aging kosmetiky pro veřejnost. Na základě dotazníku bylo zjištěno, že naprostá většina věděla, co je to anti-aging kosmetika. 25 lidí z 36 lidí se s tímto pojmem setkala a 7 tázaných dokonce anti-aging kosmetiku již používá. 16 z 36 lidí se už nyní zajímá o prevenci stárnutí pleti, 12 lidí se nyní zajímá, ale začne to řešit při prvních projevech stárnutí. Všichni tázaní se setkali s pojmem antioxidanty a věděli, že jsou spojeny s omlazujícími účinky v kosmetice. Většina dotazovaných očekávají od anti-aging nejen redukci projevů stárnutí, ale také celkové zlepšení stavu pleti. Na základě výsledků dotazníku můžeme říci, že kosmetika proti stárnutí je v populaci rozšířená a vzhledem k tomu, že většina tázaných byla ve věku 14-24 let, tak lze také říci, že spousta lidí má zájem o prevenci již v mladém věku.

Dle dosažených výsledků můžeme konstatovat, že naše vybrané aktivní látky měly pozitivní vliv na pleť a je možné je využít v přípravcích na hydrataci pokožky, popřípadě i v produktech pro prevenci stárnutí pleti. Vybrané látky vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu, což je potřeba při zpomalení procesu stárnutí a podle výsledků testování na dobrovolnicích byl po používání vyrobených produktů zaznamenán kladný vliv na pokožku. Ideálním výrobkem by na základě analýz byl noční krém s obsahem kyseliny ferulové a chlorogenové enkapsulovaných do sójového lecitinu.

## 6. ZDROJE

- [1] FRIEDRICH, Wilhelm. *Vitamins*. Walter de Gruyter, 2013.
- [2] YAMAN, Mustafa, et al. The bioaccessibility of water-soluble vitamins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109: 552-563.
- [3] RAVISANKAR, Panchumarthy, et al. The comprehensive review on fat soluble vitamins. *IOSR journal of Pharmacy*, 2015, 5.11: 12-28.
- [4] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*, SNTL Praha, 1981, 360 s.
- [5] LYNCH, P., L., M., YOUNG, I., S. Determination of thiamine by highperformance liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, Vol. 881 2000, p. 267 – 28
- [6] KUNOVÁ, Václava. *Zdravá výživa*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. 136 s. ISBN 80-247-0736-5
- [7] DINICOLANTONIO, James J.; LIU, Jing; O'KEEFE, James H. Thiamine and cardiovascular disease: a literature review. *Progress in cardiovascular diseases*, 2018, 61.1: 27-32.
- [8] GEBAUER, Karel. Dr. *Zdravíčko Vám radí*. 1. vydání. Zlín: Karel Gebauer, 1999. 195 s. ISBN 80-238-3306-5
- [9] FATTAL-VALEVSKI, Aviva. Thiamine (vitamin B1). *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2011, 16.1: 12-20.
- [10] GIBSON, R. S. *Principles of nutritional assessment*. New York: Oxford University Press, 1990. ISBN 01-950-5838-0.
- [11] LAMNI-KEEFE, C. J., S. C. COUCH a E. H. PHILIPSON. *Handbook of nutrition and pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press, c2008. ISBN 978-1-58829-834-8.
- [12] Thiamine. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiamine>
- [13] HŮNA, Vladimír. *Lékařství a léčitelství*. 1. vydání. Praha: Petrklíč, 2000. 261 s. ISBN 80-7229-049-5
- [14] ATTENBOROUGH, Anthony. et.al. *Rodinná encyklopedie alternativní medicíny*. 1. vydání. Praha: Reader's Digest výběr, 1997. 400 s. ISBN 80-902069-3-X
- [15] Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
- [16] BARENNE, Hubert, et al. Beriberi (thiamine deficiency) and high infant mortality in northern Laos. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9.3: e0003581.
- [17] ŽAMBOCH, Jan. *Vitamíny*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 1996. 77 s. ISBN 80-7169-322-7
- [18] ASHOORI, Marziyeh; SAEDISOMEOLIA, Ahmad. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. *British journal of nutrition*, 2014, 111.11: 1985-1991.
- [19] SAEDISOMEOLIA, Ahmad; ASHOORI, Marziyeh. Riboflavin in human health: a review of current evidences. *Advances in food and nutrition research*, 2018, 83: 57-81.
- [20] FURIA, T. E. *CRC handbook of food additives*. 2d ed. Cleveland: CRC Press, 1972. ISBN 08-493-0543-8



- [21] Riboflavin. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin#section=2D-Structure>
- [22] LUQUE-GARCIA, J. L.; DE CASTRO, MD Luque. Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, 2001, 935.1-2: 3-11.
- [23] Hlúbik Doc. MUDr., CSc., P., Opltová Ing., L.: Vitaminy. 1. vyd. Praha: 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4
- [24] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin 1. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [25] ORTEMBERG, Adriana; MIKULÁŠTIKOVÁ, Jana. *Mládne s antioxidanty*. Ivo Železný, 2003.
- [26] FORTIFICATION, Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations Technology and Quality Control. *Food and Nutrition Paper*.
- [27] BATES, C. J. Vitamin A. *The lancet*, 1995, 345.8941: 31-35.
- [28] Retinol. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Retinol#section=2D-Structure>
- [29] OLSON, JAMES ALLEN, et al. Vitamin A. *Handbook of vitamins*, 1990, 3: 1-50.
- [30] FINNO, Carrie J.; VALBERG, S. J. A comparative review of vitamin E and associated equine disorders. *Journal of veterinary internal medicine*, 2012, 26.6: 1251-1266.
- [31] HOBSON, Rachel. Vitamin E and wound healing: an evidence-based review. *International wound journal*, 2016, 13.3: 331-335.
- [32] NIKI, Etsuo; ABE, Kouichi. Vitamin E: Structure, properties and functions. 2019.
- [33] TRABER, Maret G.; ATKINSON, Jeffrey. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine*, 2007, 43.1: 4-15.
- [34] ERIN, Alexander N., et al. Formation of  $\alpha$ -tocopherol complexes with fatty acids. A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1984, 774.1: 96-102.
- [35] PIRODDI, Marta, et al. Vitamin E as a functional and biocompatibility modifier of synthetic hemodialyzer membranes: an overview of the literature on vitamin E-modified hemodialyzer membranes. *American journal of nephrology*, 2012, 35.6: 559-572.
- [36] Vitamin E. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-12-30]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-E#section=2D-Structure>
- [37] A MORSY, TOSSON; D ALANAZI, ABDULLAH. A mini-overview of vitamin E. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2020, 50.2: 247-257.
- [38] HLÚBIK, Pavel. Vitaminy–důležitý faktor ovlivňující zdraví–1. část–metabolismus liposolubních vitaminů. *Interní med*, 2001, 11: 503-505.
- [39] CHACKALAMANNIL, Samuel; ROTELLA, David; WARD, Simon. *Comprehensive medicinal chemistry III*. Elsevier, 2017.
- [40] HARBORNE, Jeffrey B. Phenolic compounds. In: *Phytochemical methods*. Springer, Dordrecht, 1973. p. 33-88.
- [41] D ARCHIVIO, Massimo, et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 2007, 43.4: 348.
- [42] LATTANZIO, Vincenzo. Phenolic Compounds: Introduction 50. *Nat. Prod*, 2013, 1543-1580.
- [43] NAVEED, Muhammad, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 97: 67-74.
- [44] MENG, Shengxi, et al. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013.

- [45] THOM, Erling. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *Journal of International Medical Research*, 2007, 35.6: 900-908.
- [46] KANG, Juan, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 2004, 1674.2: 205-214.
- [47] ONG, Khang Wei; HSU, Annie; TAN, Benny Kwong Huat. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical pharmacology*, 2013, 85.9: 1341-1351.
- [48] MCCARTY, Mark F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical hypotheses*, 2005, 64.4: 848-853.
- [49] PATOČKA, Jiří. Kyselina chlorogenová v přípravcích na hubnutí.
- [50] SATO, Yuki, et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceuticals*, 2011, 403.1-2: 136-138.
- [51] RAWEL, Harshadrai M., et al. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chemistry*, 2002, 78.4: 443-455.
- [52] RAIMONDI, Stefano, et al. Role of bifidobacteria in the hydrolysis of chlorogenic acid. *MicrobiologyOpen*, 2015, 4.1: 41-52.
- [53] Chlorogenic acid. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-acid>
- [54] SUNG, Woo Sang; LEE, Dong Gun. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and applied chemistry*, 2010, 82.1: 219-226.
- [55] PLEŠKO, Sebastian, et al. In Silico Study of Plant Polyphenols' Interactions with VP24–Ebola Virus Matrix Protein. *Acta Chimica Slovenica*, 2015, 62.3: 555-564.
- [56] KONO, Yasuhisa, et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1997, 1335.3: 335-342.
- [57] UPADHYAY, Rohit; MOHAN RAO, L. Jagan. An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2013, 53.9: 968-984.
- [58] KUMAR, Naresh; PRUTHI, Vikas. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 2014, 4: 86-93.
- [59] ZHAO, Zhaohui; MOGHADASI, Mohammed H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 2008, 109.4: 691-702.
- [60] Ferulic acid. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-12-09]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>
- [61] ŽILIĆ, Slađana, et al. Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54.3: 417-424.
- [62] ERUKAINURE, Ochuko L.; SANNI, Olakunle; ISLAM, Md Shahidul. Clerodendrum volubile: phenolics and applications to health. In: *Polyphenols: Mechanisms of action in human health and disease*. Academic Press, 2018. p. 53-68.
- [63] LUO, Jiao, et al. Anti-acne vulgaris effects of chlorogenic acid by anti-inflammatory activity and lipogenesis inhibition. *Experimental Dermatology*.

- [64] LI, Guanghui, et al. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *European food research and technology*, 2014, 238.4: 589-596.
- [65] AYRES JR, S.; MIHAN, R. Acne vulgaris: therapy directed at pathophysiologic defects. *Cutis*, 1981, 28.1: 41-42.
- [66] KEEN, Mohammad Abid; HASSAN, Iffat. Vitamin E in dermatology. *Indian dermatology online journal*, 2016, 7.4: 311.
- [67] ZINDER, Roman, et al. Vitamin A and wound healing. *Nutrition in Clinical Practice*, 2019, 34.6: 839-849.
- [68] ZASADA, Malwina; BUDZISZ, Elżbieta. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2019, 36.4: 392.7
- [69] YOUNG, Andrew J.; LOWE, Gordon L. Carotenoids—antioxidant properties. 2018.
- [70] LADEMANN, Juergen, et al. Carotenoids in human skin. *Experimental dermatology*, 2011, 20.5: 377-382.
- [71] BIN-JUMAH, May, et al. Application of Carotenoids in Cosmetics. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*, 2021, 747.
- [72] ZDUŃSKA, Kamila, et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin pharmacology and physiology*, 2018, 31.6: 332-336.
- [73] KOLEČKÁŘ, V., et al. Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození. *Česká a slovenská farmacie*, 2007, 56: 73-76
- [74] PLÁTENÍK, Jan. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11.1: 30-33.7
- [75] HOLEČEK, Václav. Volné radikály, antioxidanty a jak dále. *Klin. Biochem. Metab*, 2006, 14.35: 140-145.
- [76] KOLARSICK, Paul AJ; KOLARSICK, Maria Ann; GOODWIN, Carolyn. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 2011, 3.4: 203-213.
- [77] DRAELOS, Zoe Diana (ed.). *Cosmetic dermatology: products and procedures*. John Wiley & Sons, 2015.
- [78] ZAIDI, Zohra; LANIGAN, Sean W. Skin: structure and function. In: *Dermatology in Clinical Practice*. Springer, London, 2010. p. 1-15.
- [79] NG, Keng Wooi; LAU, Wing Man. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In: *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 3-11.
- [80] CHALUPOVÁ, Zuzana, et al. Hydratace kůže a kosmetické prostředky. *Praktické lékařství*, 2006, 4: 192-194.
- [81] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a praxi*. Maxdorf, 2004.
- [82] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie: Organické látky ve vodách*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 1998. ISBN 80-214-1167-8.
- [83] KŘÍŽEK, Tomáš, et al. Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*, 2009, 103: 130-135.
- [84] PUIZINA-IVIC, N. Skin aging. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica Et Adriatica*, 2008, 17.2: 47.

- [85] ARORA, Meenakshi. Cell culture media: a review. *Mater methods*, 2013, 3.175: 24.
- [86] PASTAR, Irena; STOJADINOVIC, Olivera; TOMIC-CANIC, Marjana. Role of keratinocytes in healing of chronic wounds. *Surgical technology international*, 2008, 17: 105-112.
- [87] GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2002, 88.1-2: 1-12.
- [88] BARKER, Jonathan NWN, et al. Keratinocytes as initiators of inflammation. *The Lancet*, 1991, 337.8735: 211-214.
- [89] AULA, Sangeetha, et al. Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *Rsc Advances*, 2015, 5.59: 47830-47859.
- [90] CIAPETTI, G., et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, 1993, 14.5: 359-364.
- [91] COSTA, Raquel; SANTOS, Lúcia. Delivery systems for cosmetics-From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder technology*, 2017, 322: 402-416.
- [92] BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 2015, 10: 975.
- [93] FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhes. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21.10: 510-523.
- [94] GURÁŇ, Roman. Studium vlastností liposomů jako přenašečů léčiv pomocí různých analytických metod. 2014.
- [95] BASU, S. C. and M. BASU. Liposome methods and protocols. Springer Science & Business Media, 2002. ISBN 08-960-3845-9
- [96] IMMORDINO, Maria Laura; DOSIO, Franco; CATTEL, Luigi. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, 2006, 1.3: 297.
- [97] *Zvýšený cholesterol, vznik a léčba. Vše pro zdraví* [online]. 2014 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <http://www.vseprozdravi.cz/nemoci/zvyseny-cholesterol.htm>
- [98] MYANT, Nicolas Bruce. *The biology of cholesterol and related steroids*. Butterworth-Heinemann, 2014.
- [99] *Zvýšený cholesterol, vznik a léčba. Vše pro zdraví* [online]. 2014 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <http://www.vseprozdravi.cz/nemoci/zvyseny-cholesterol.htm>
- [100] FERNANDES, Gabriel D., et al. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food chemistry*, 2012, 135.3: 1855-1860.
- [101] KUMAR, Rajiv; KATARE, Om Prakash. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *Aaps Pharmscitech*, 2005, 6.2: E298-E310.
- [102] PALACIOS, Luz E.; WANG, Tong. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, 82.8: 571-578.
- [103] WANG, Guang. *Functionality of egg yolk lecithin and protein and functionality enhancement of protein by controlled enzymatic hydrolysis*. Iowa State University, 2007.
- [104] POLY, Coreyann, et al. The relation of dietary choline to cognitive performance and white-matter hyperintensity in the Framingham Offspring Cohort. *The American journal of clinical nutrition*, 2011, 94.6: 1584-1591.

- [105] ZEISEL, Steven H.; DA COSTA, Kerry-Ann. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition reviews*, 2009, 67.11: 615-623.
- [106] LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2012, 37.1: 106-126.
- [107] STEPHEN, Alistair M.; PHILLIPS, Glyn O. *Food polysaccharides and their applications*. CRC press, 2016.
- [108] BROWNLEE, Iain A., et al. Applications of alginates in food. In: *Alginates: Biology and applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 211-228.
- [109] Alginate. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alginate#section=2D-Structure>
- [110] SINHA, V. R., et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 2004, 274.1-2: 1-33.
- [111] DOBRYNIN, Andrey V.; RUBINSTEIN, Michael. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 2005, 30.11: 1049-1118.
- [112] DUTTA, Pradip Kumar; DUTTA, Joydeep; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. 2004.
- [113] Chitosan. *Pubchem* [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan#section=2D-Structure>
- [114] DALGLEISH, D. G.; HALLETT, F. R. Dynamic light scattering: applications to food systems. *Food Research International*, 1995, 28.3: 181-193.
- [115] BRAR, Satinder K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30.1: 4-17.
- [116] RIDDICK, Thomas M. Control of colloid stability through zeta potential. *Blood*, 1968, 10.1: 52-68.
- [117] HPLC. *Wikipedia* [online]. [cit. 2021-12-30]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative\\_HPLC.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg)
- [118] RE, Roberta, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999, 26.9-10: 1231-1237.
- [119] PIERARD, GERALD E., et al. Corneocyte desquamation. *International journal of molecular medicine*, 2000, 6.2: 217-238.

## **7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity

DPPH – Diphenylpicrylhydraz

DMEM – alfa modifikované Eaglovo médium

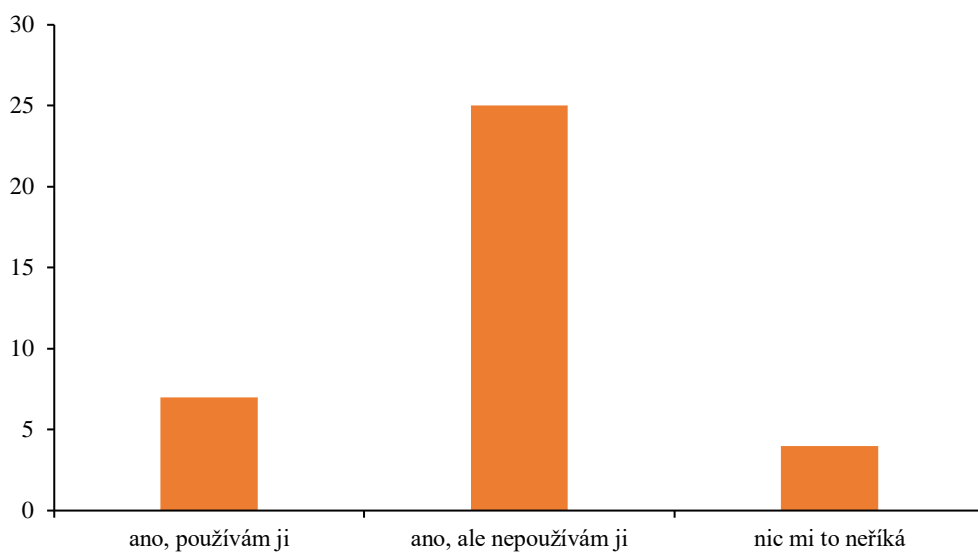
FBS – fetální bovinní sérum

PBS – fosfátový pufr

MTT – 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid

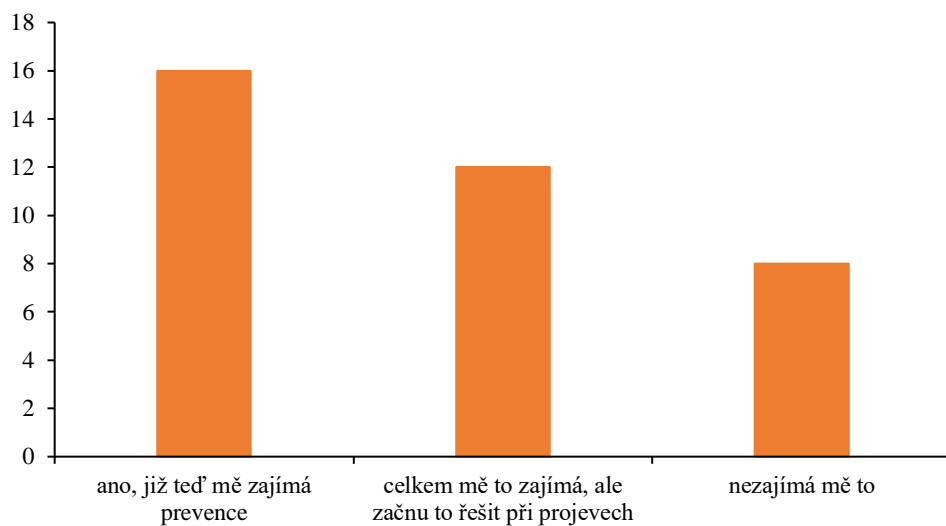
## 8. PŘÍLOHY

Říká Vám něco anti-aging kosmetika?



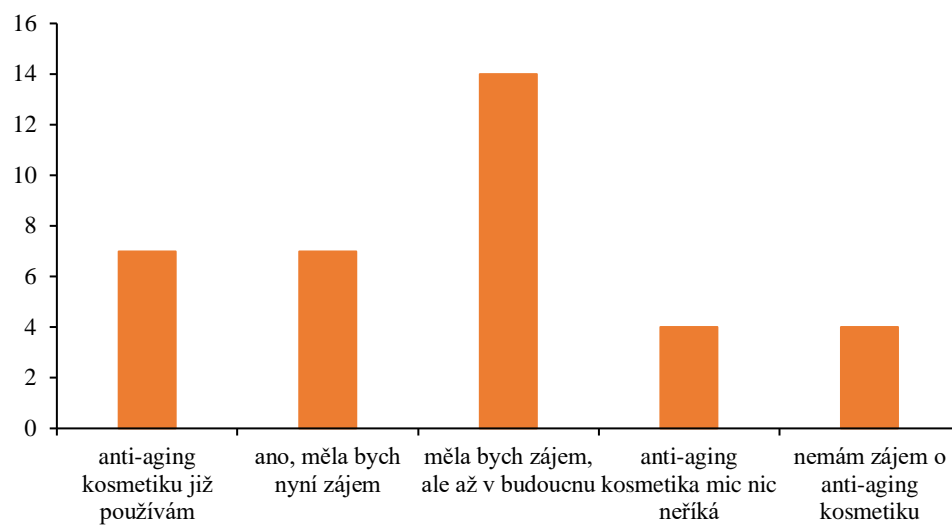
*Příloha 1: Graf anti-aging kosmetika 1*

Zajímáte se o prevenci stárnutí pleti?



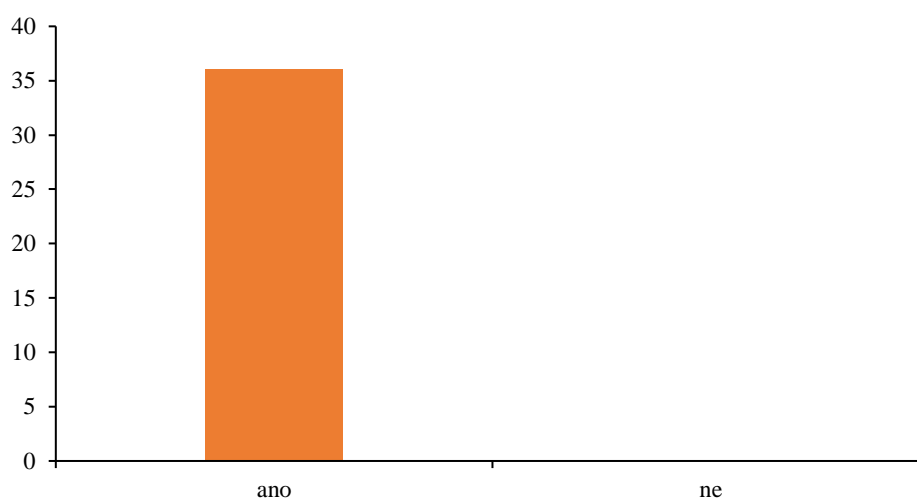
*Příloha 2: Graf anti-aging kosmetika 2*

### Měli byste zájem o anti-aging kosmetiku?



*Příloha 3: Graf anti-aging kosmetika 3*

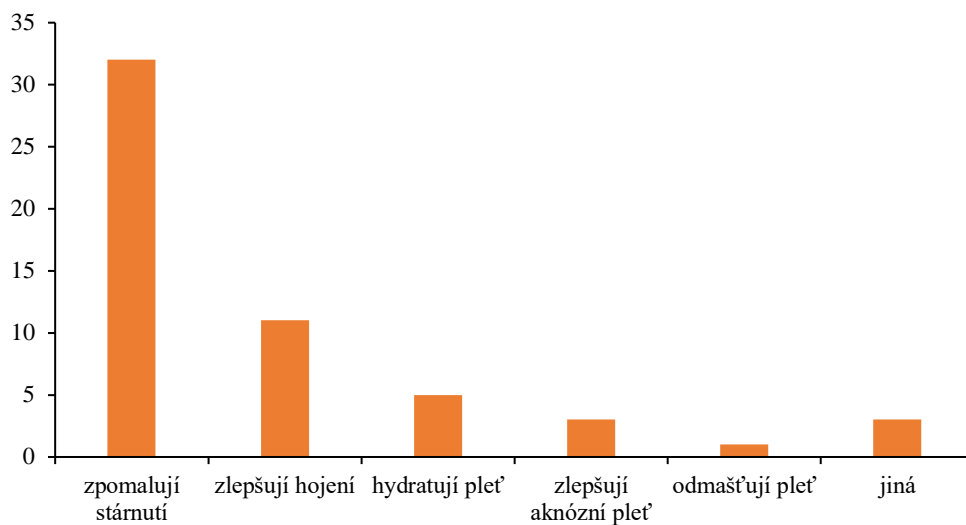
### Setkali jste se někdy s pojmem antioxidanty?



*Příloha 4: Graf anti-aging kosmetika 4*

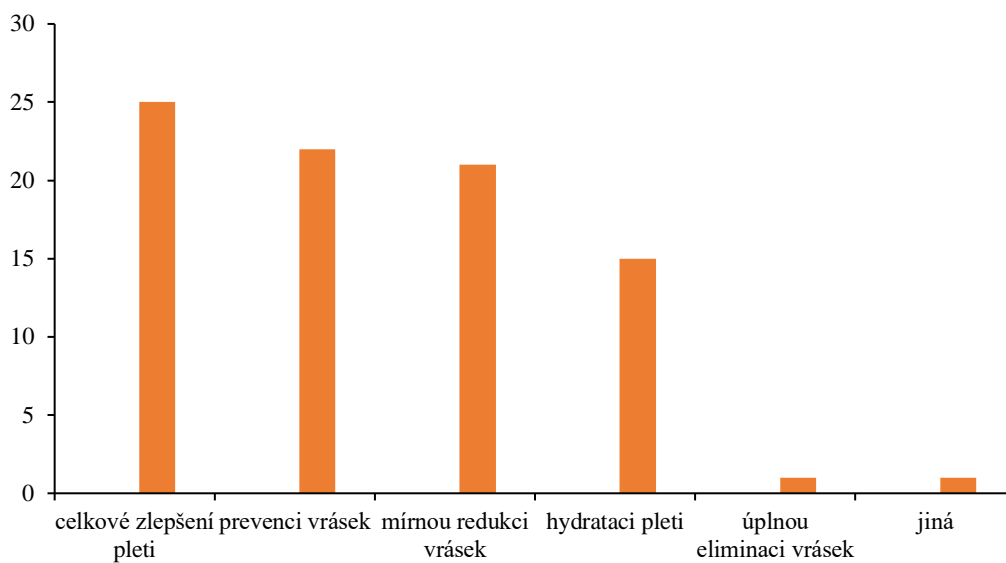


### Jakou roli myslíte, že hrají antioxidanty v kosmetice?



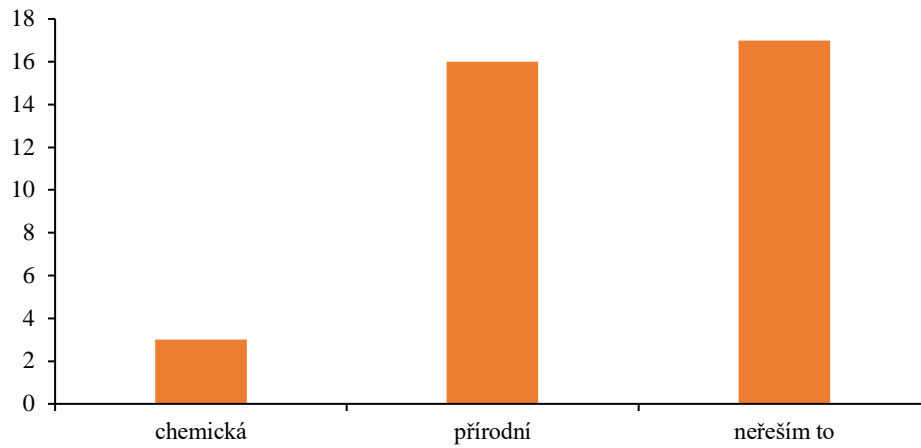
*Příloha 5: Graf anti-aging kosmetika 5*

### Co očekáváte od anti-aging kosmetiky?



*Příloha 6: Graf anti-aging kosmetika 6*

### Dali byste přednost chemické nebo přírodní kosmetice?



*Příloha 7: Graf anti-aging kosmetika 7*

## Dotazník – senzorická analýza anti-aging krémů

Datum:

Hodnotitel:

Pohlaví:                      žena                                      muž

Věk:                      20-24                      25-35                      36-45                      46-55                      56-65                      65+

Typ pokožky:

                    mastná                                      smíšená                                      aknézní                                      suchá

Používáte pečující kosmetické přípravky, pokud ano, jak často?

                    ne                      2x denně                      1x za den                      několikrát za týden                      1x za týden                      nepravidelně

Věříte v účinnost anti-aging kosmetiky?

                    ano                                      spíše ano                                      spíše ne                                      ne

Hodnocení jednotlivých vzorků

### 1. Barva

Seřadte následující 4 vzorky podle intenzity barvy od nejsvětlejšího (1) po nejtmaší (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

### 2. Roztíratelnost

Seřadte následující 4 vzorky podle intenzity roztíratelnosti od nejméně roztíratelného (1) po nejvíce roztíratelný (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

### 3. Vstřebatelnost

Seřadte následující 4 vzorky podle intenzity vstřebatelnosti od nejobtížněji vstřebatelného (1) po nejlépe vstřebatelný (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

#### 4. Vůně

Seřaďte následující 4 vzorky podle příjemnosti od nejméně příjemné vůně (1) po nejvíce příjemnou vůni (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

#### 5. Textura

Seřaďte následující 4 vzorky podle příjemnosti při aplikaci od nejméně příjemného (1) po nejvíce příjemný (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

#### 6. Hydratační účinky

Seřaďte následující 4 vzorky podle hydratačních účinků od nejméně hydratačního (1) po nejvíce hydratační (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

#### 7. Pořadový preferenční test

Seřaďte následující 4 vzorky podle Vašich preferencí od nejhoršího (1) po nejlepší (4), přičemž dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

kód vzorku	A	B	C	D
pořadí				

8. **Zaznamenali jste na pokožce nějaký rozdíl před a po používání testovaných produktů? Pokud ano, jaký a kdy se začal projevovat?**

9. **Zaznamenali jste mezi jednotlivými produkty A, B, C a D nějaký rozdíl? Pokud ano, tak jaký?**

Případné poznámky či připomínky: