

# **Antioxidanty v kosmetických formulacích**

Bc. Klára Malíková



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Klára Malíková  
Osobní číslo: T23244  
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Antioxidanty v kosmetických formulacích

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část:

Zpracujte literární rešerši na zadané téma.

Definujte, klasifikujte a charakterizujte vybrané antioxidanty používané v kosmetologii.

Diskutujte funkce antioxidantů v kosmetických přípravcích, jejich výhody a nevýhody.

Popište jejich benefity pro lidské zdraví, stěžejně se zaměřte na jejich biologické účinky na pokožku.

### II. Praktická část:

Navrhněte a připravte kosmetické formulace s inkorporovaným vybraným antioxidantem.

Charakterizujte vlastnosti připravených formulací a ověřte jejich účinnost *in vivo* pomocí bioinženýrských diagnostických metod.

Získané výsledky vhodně zpracujte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] DAYAN, Nava (ed.). *Handbook of Formulating Dermal Applications*. Online. Wiley, 2016. ISBN 9781119363620. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119364221>.
- [2] YANG, S.; LIU, L.; TANG, Y. Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: an updated review of delivery systems and characterization techniques. *International Journal of Cosmetic Science* 2020, 42:16–29. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12592>.
- [3] HOANG, HienThi; MOON, Ju-Young; LEE, Young-Chul. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics* 2021, 8: 106. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>.
- [4] DE LIMA CHERUBIM, Débora Jackeline; Buzanello Martins, Cleide Viviane; Oliveira de Fariña, Luciana; da Silva de Lucca, Rosemaire Aparecida. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol* 2020;19:33–37. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>.
- [5] García-Villegas, Abigail; Rojas-García, Alejandro; Villegas-Aguilar, Maria del Carmen; Fernández-Moreno, Patricia; Fernández-Ochoa, Álvaro; Cádiz-Gurrea, María de la Luz; Arráez-Román, David; Segura-Carretero, Antonio. Cosmeceutical Potential of Major Tropical and Subtropical Fruit By-Products for a Sustainable Revalorization. *Antioxidants* 2022, 11:203. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11020203>.
- [6] Dini, Irene; Laneri, Sonia. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules* 2021, 26: 3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Pavlačková, Ph.D.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**  
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

# PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

## Beru na vědomí, že

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

## Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně, dne .....

.....  
podpis autora

## ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na využití antioxidantů v dermokosmetických aplikacích. V teoretické části byla věnována pozornost jejich roli v ochraně kožních buněk před oxidačním stresem a schopnosti zpomalovat procesy stárnutí. Dále byla popsána problematika enkapsulace aktivních látek, včetně současných trendů v oblasti cíleného transportu a řízeného uvolňování účinných látek v kosmetických formulacích.

V praktické části práce byl enkapsulován vybraný antioxidant – kvercetin, který byl s dalšími aktivními látkami inkorporován do krémových matric. U připravených anti-aging formulací byly hodnoceny mikrobiologické, stabilitní, organoleptické či antioxidační vlastnosti, a také *in vivo* účinnost na pokožku, včetně analýzy změn kožního reliéfu. Výsledky potvrdily antioxidační účinnost formulací a jejich pozitivní vliv na anti-aging vlastnosti pokožky.

Klíčová slova: antioxidanty, pokožka, stárnutí, enkapsulace, krémové formulace, bioinženýrské metody, stabilita formulací

## ABSTRACT

The thesis focused on the use of antioxidants in dermocosmetic applications. The theoretical part focused on their role in the protection of skin cells against oxidative stress and their ability to slow down the aging process. Furthermore, the issue of encapsulation of active substances was described, including current trends in the field of targeted transport and controlled release of active substances in cosmetic formulations.

In the practical part of the work, a selected antioxidant – quercetin was encapsulated and incorporated with other active ingredients into cream matrices. The prepared anti-aging formulations were evaluated for microbiological, stability, organoleptic or antioxidant properties and *in vivo* efficacy on skin, including analysis of skin relief changes. The results confirmed the antioxidant efficacy of the formulations and their positive effect on the anti-aging properties of the skin.

Keywords: antioxidants, skin, aging, encapsulation, cream formulations, bioengineering methods, stability of formulations

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucí mé diplomové práce paní Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, za cenné rady, odborné vedení, trpělivost a vstřícnost. Také bych chtěla poděkovat paní doc. Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za přínosné rady, ochotu a pomoc v rámci mikrobiologické části. Velké poděkování patří také paním laborantkám Ing. Markétě Kudláčkové, Ph.D., Evě Bartoníkové, DiS. a také Ing. Lucii Matoškové za veškerou pomoc při práci v laboratoři, velkou ochotu a vstřícnost. V neposlední řadě poděkování patří také všem dobrovolnicím, jež se účastnily testování a umožnily mi tak zrealizovat praktickou část diplomové práce.

Velké poděkování bych chtěla věnovat také své rodině a nejbližším za jejich neustálou podporu během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahrána do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÚVOD.....</b>                                                        | <b>10</b> |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>                                          | <b>11</b> |
| <b>1 ANTIOXIDANTY .....</b>                                             | <b>12</b> |
| 1.1 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ .....                                      | 12        |
| 1.1.1 Přírodní antioxidanty.....                                        | 13        |
| 1.1.2 Syntetické antioxidanty .....                                     | 13        |
| 1.2 ZDROJE A ZÍSKÁVÁNÍ ANTIOXIDANTŮ .....                               | 14        |
| 1.3 VLASTNOSTI ANTIOXIDANTŮ.....                                        | 16        |
| 1.3.1 Volné radikály, ROS, oxidační stres .....                         | 16        |
| 1.3.2 Lidská onemocnění spojována s oxidačním stresem .....             | 17        |
| 1.3.3 Vlastnosti jednotlivých skupin antioxidantů .....                 | 19        |
| 1.4 APLIKACE ANTIOXIDANTŮ.....                                          | 22        |
| 1.4.1 Aplikace přírodních antioxidantů.....                             | 22        |
| 1.4.2 Aplikace syntetických antioxidantů .....                          | 24        |
| <b>2 ANTIOXIDANTY V KOSMETOLOGII.....</b>                               | <b>25</b> |
| 2.1 OXIDAČNÍ A ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉMY KŮŽE.....                           | 25        |
| 2.1.1 Faktory podílející se na stárnutí kůže.....                       | 29        |
| 2.2 SYSTÉMY S ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITOU .....                              | 31        |
| 2.3 VYBRANÉ ANTIOXIDANTY PRO KOSMETOLOGICKÉ APLIKACE.....               | 33        |
| 2.3.1 Kvercetin .....                                                   | 33        |
| 2.3.2 Betakaroten .....                                                 | 35        |
| 2.3.3 Koenzym Q10 .....                                                 | 36        |
| 2.3.4 Vitamin E .....                                                   | 37        |
| 2.3.5 Vitamin C .....                                                   | 38        |
| 2.3.6 Vitamin A.....                                                    | 39        |
| <b>3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>                        | <b>41</b> |
| <b>4 CÍLE PRÁCE .....</b>                                               | <b>44</b> |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>                                          | <b>45</b> |
| <b>5 METODIKA PRÁCE.....</b>                                            | <b>46</b> |
| 5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....                       | 46        |
| 5.2 ENKAPSULACE KVERCETINU DO NOSIČE .....                              | 49        |
| 5.2.1 Charakterizace nosiče s enkapsulovaným kvercetinem .....          | 51        |
| 5.3 PŘÍPRAVA FORMULACÍ .....                                            | 51        |
| 5.4 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY.....                                          | 53        |
| 5.4.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní ..... | 54        |
| 5.4.2 Stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                     | 54        |
| 5.4.3 Test přežívání <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                | 55        |

|          |                                                                                |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.5      | STABILITNÍ TESTY.....                                                          | 55        |
| 5.5.1    | Posuzování organoleptických vlastností .....                                   | 55        |
| 5.5.2    | Měření pH.....                                                                 | 56        |
| 5.5.3    | Měření viskozity .....                                                         | 56        |
| 5.5.4    | Instrumentální měření texturních vlastností .....                              | 56        |
| 5.6      | SENZORICKÉ POSUZOVÁNÍ ORGANOLEPTICKÝCH VLASTNOSTÍ KRÉMOVÝCH<br>FORMULACÍ ..... | 57        |
| 5.6.1    | Pořadové zkoušky.....                                                          | 57        |
| 5.6.2    | Párové porovnávací zkoušky .....                                               | 58        |
| 5.7      | OVĚŘOVÁNÍ ÚČINNOSTI FORMULACÍ <i>IN VIVO</i> DIAGNOSTICKÝMI METODAMI.....      | 58        |
| 5.7.1    | Soubor dobrovolnic .....                                                       | 58        |
| 5.7.2    | Organizace měření.....                                                         | 58        |
| 5.7.3    | Korneometrie.....                                                              | 59        |
| 5.7.4    | Tewametrie .....                                                               | 60        |
| 5.7.5    | pH-metrie.....                                                                 | 60        |
| 5.7.6    | Reviskometrie.....                                                             | 60        |
| 5.7.7    | Visioskopie .....                                                              | 60        |
| 5.7.8    | Visiometrie .....                                                              | 61        |
| 5.8      | ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA FORMULACÍ .....                                          | 61        |
| 5.9      | TEST UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY Z FORMULACÍ .....                                | 62        |
| 5.10     | STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT .....                                     | 62        |
| <b>6</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>                                                 | <b>64</b> |
| 6.1      | ZHODNOCENÍ PŘÍPRAVY ENKAPSULOVANÉHO KVERCETINU .....                           | 64        |
| 6.1.1    | Charakterizace nosiče s enkapsulovaným kvercetinem .....                       | 65        |
| 6.2      | ZHODNOCENÍ SLOŽENÍ A PŘÍPRAVY FORMULACÍ.....                                   | 66        |
| 6.3      | MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ FORMULACÍ .....                                      | 68        |
| 6.3.1    | Stanovení celkového počtu mikroorganismů .....                                 | 69        |
| 6.3.2    | Stanovení bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                         | 71        |
| 6.3.3    | Test přežívání <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve formulacích .....              | 71        |
| 6.4      | STABILITNÍ TESTY.....                                                          | 72        |
| 6.4.1    | Posuzování organoleptických vlastností .....                                   | 73        |
| 6.4.2    | Měření pH.....                                                                 | 76        |
| 6.4.3    | Měření viskozity .....                                                         | 77        |
| 6.4.4    | Měření texturních vlastností formulací .....                                   | 78        |
| 6.5      | SENZORICKÉ TESTY .....                                                         | 82        |
| 6.6      | <i>IN VIVO</i> TESTOVÁNÍ FORMULACÍ.....                                        | 83        |
| 6.6.1    | Vyhodnocení korneometrie a tewametrie.....                                     | 84        |
| 6.6.2    | Vyhodnocení pH-metrie .....                                                    | 86        |
| 6.6.3    | Vyhodnocení reviskometrie .....                                                | 87        |
| 6.6.4    | Vyhodnocení visioskopie .....                                                  | 88        |
| 6.6.5    | Vyhodnocení visiometrie .....                                                  | 93        |
| 6.7      | ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA FORMULACÍ .....                                          | 96        |

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| 6.8 TEST UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY Z FORMULACÍ..... | 97         |
| <b>ZÁVĚR .....</b>                                 | <b>101</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>             | <b>103</b> |
| <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>                        | <b>126</b> |
| <b>SEZNAM TABULEK.....</b>                         | <b>129</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>    | <b>130</b> |
| <b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>                          | <b>133</b> |

## ÚVOD

Antioxidanty představují skupinu látek s rozmanitou chemickou strukturou, přírodního či syntetického původu. Jejich hlavní funkcí je schopnost v nízkých koncentracích omezovat či zcela inhibovat oxidační procesy, čímž chrání buňky a další biologické struktury před poškozením volnými radikály. Oxidační stres, způsobený nerovnováhou mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a schopností organismu tyto reaktivní sloučeniny neutralizovat, je jedním z hlavních faktorů přispívajících k poškození kožních buněk, zánětlivým reakcím i urychlenému stárnutí pokožky.

V kosmetickém průmyslu jsou antioxidanty vyhledávány především pro své ochranné a regenerační účinky. Napomáhají k zachování integrity kožní bariéry, přispívají ke zklidnění podráždění, zvyšují odolnost pokožky vůči negativním vnějším vlivům a oddalují projevy stárnutí. Především antioxidanty přírodního původu jsou spotřebiteli vnímány jako bezpečnější a biologicky přijatelnější. Jejich využití je však často omezeno z důvodu nízké stability, rozpustnosti či omezené schopnosti prostupovat do hlubších vrstev pokožky.

Jedním z takových přírodních antioxidantů je kvercetin, flavonoid přirozeně se vyskytující v ovoci, zelenině či některých rostlinných extraktech. Kvercetin vykazuje silný antioxidační, protizánětlivý a fotoprotektivní účinek, což z něj činí perspektivní účinnou látku pro anti-aging kosmetické formulace. Pro efektivní využití jeho vlastností je však vhodné využít pokročilé technologie, jako je například enkapsulace, která umožňuje účinné látky chránit před degradací, zlepšit jejich transportní vlastnosti a zajistit cílené a řízené uvolňování v místech určení.

V posledních letech se enkapsulace stává nedílnou součástí moderního přístupu k vývoji kosmetických přípravků. Aplikace nosičových systémů, jako jsou lipozomy, nanoemulze či lipidové nanočástice, umožňuje zvýšit účinnost přípravků, zlepšit senzorické vlastnosti finálních formulací a zároveň zvýšit i bezpečnost pro uživatele. Právě kombinace přírodních antioxidantů s moderní enkapsulační technologií představuje atraktivní řešení při vývoji inovativních kosmetických přípravků s anti-aging účinkem.

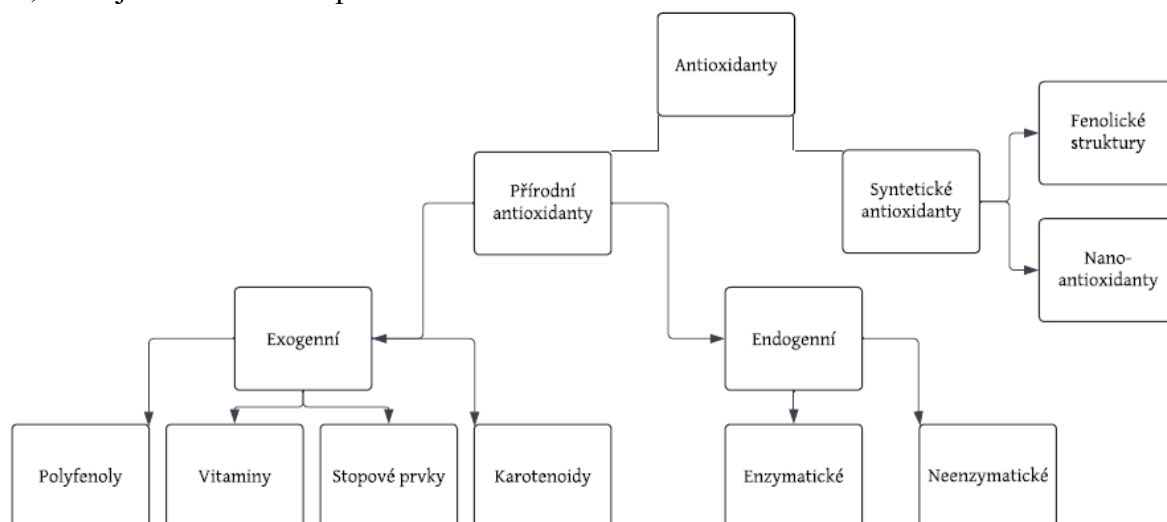
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 ANTIOXIDANTY

Pojem antioxidant je z chemického hlediska téměř nemožné definovat, kromě definice činidla, které zabraňuje oxidaci. Antioxidanty byly Halliwellem definovány již v roce 1990 jako jakákoli látka, která může významně zpomalit či zabránit oxidaci oxidovatelného substrátu, pokud je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s koncentracemi substrátu [1], [2]. Antioxidanty tedy mohou být definovány jako molekuly mnoha různých chemických struktur, přírodního či syntetického původu, schopny v nízkých koncentracích snižovat či zabraňovat oxidaci jiných molekul. Během oxidační reakce dochází k přenosu elektronů z látky na oxidační činidlo, přičemž vznikají volné radikály, které spouštějí řetězové reakce. Antioxidanty reagují s těmito volnými radikály prostřednictvím přenosu svých elektronů či inhibicí další oxidační reakce svou vlastní oxidací, čímž dochází k ukončení řetězové reakce a vzniku stabilních produktů. Antioxidanty jsou díky svým vlastnostem využívány převážně v potravinářském, farmaceutickém či kosmetickém průmyslu [3], [4], [5].

## 1.1 Klasifikace antioxidantů

Jak již bylo zmíněno, tak antioxidanty jsou molekuly mnoha různých chemických struktur, což zapříčiňuje jejich složitější klasifikaci, dle různých kritérií. Primárním třídícím prekurzorem antioxidantů je zdroj původu, dle kterého jsou dále kategorizovány do specifických skupin [4], [6], jak je přehledně prezentováno na Obrázku 1 a popsáno v subkapitolách 1.1.1–1.1.2. Dle mechanismu působení oxidačního stresu na lidský organismus jsou antioxidanty kategorizovány na primární a sekundární, viz subkapitola 1.3.2, která je věnovaná této problematice.



Obrázek 1 Základní klasifikace antioxidantů  
(zdroj: upraveno dle [6])

### 1.1.1 Přírodní antioxidanty

Přírodní antioxidanty lze klasifikovat do dvou hlavních skupin, a to na antioxidanty exogenní a endogenní. Ty jsou dále děleny do několika podskupin v závislosti na jejich vlastnostech, chemické struktuře či mechanismu antioxidačního účinku [7]. Většina přírodních antioxidantů bývá označována také jako bioantioxidanty. Bioantioxidanty jsou sloučeniny, jež mimo antioxidační vlastnosti vykazují také vlastnosti biologické. Přírodní antioxidanty bez biologické aktivity mohou vykazovat spíše toxickou aktivitu [8]. Díky svým vlastnostem jsou přírodní antioxidanty široce využívány především v kosmetickém a potravinářském průmyslu, ale také v oblasti farmacie či medicíny [6], [9].

#### Exogenní antioxidanty

Mezi exogenní antioxidanty patří molekuly běžně se vyskytující v přírodě. Jejich název vystihuje dostupnost pro organismy zvenčí. Nejsou tedy přirozenou součástí organismů, ale organismy je získávají z potravy či v případě lidského organismu také z doplňků stravy. Mezi exogenní antioxidanty jsou řazeny polyfenoly, vitaminy, stopové prvky, flavonoidy a karotenoidy [6], [9], [10].

#### Endogenní antioxidanty

Do skupiny endogenních antioxidantů jsou řazeny molekuly organismům vlastní neboli molekuly produkovány tělem organismů. Endogenní antioxidanty jsou dále děleny, dle svých vlastností, do podskupin enzymatických a neenzymatických endogenních antioxidantů [6]. Mezi enzymatické endogenní antioxidanty patří kataláza (CAT), superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx), peroxiredoxin či thioredoxin. Mezi neenzymatické endogenní antioxidanty jsou zahrnovány glutathion, kyselina močová, bilirubin, fenolické látky, sérový albumin či transferin [10].

### 1.1.2 Syntetické antioxidanty

Syntetické antioxidanty jsou děleny na antioxidanty s fenolovými skupinami či na nanoantioxidanty [7]. Dále zde mohou být zahrnuty také syntetické ekvivalenty přírodních antioxidantů, například syntetizovaná kyselina L-askorbová k vitaminu C [9].

Mezi antioxidanty s fenolovými skupinami jsou řazeny butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) a terciální butylhydrochinon (TBHQ), které jsou využívány především v potravinářství, méně poté v kosmetice či farmacii [6], [9].

V posledních letech expandují nanotechnologie napříč všemi vědními obory, kdy výjimkou nezůstávají ani antioxidanty. Sharpe a kol. [11] formuloval definici nanoantioxidantu (umělého antioxidantu), který může být navržen na úrovni nanoměrtek v závislosti na chemickém složení, povrchovém náboji, poměru povrchu k objemu a povrchové vrstvě nanočástic. Nejvýznamnějšími zástupci nanoantioxidantů jsou nanoantioxidanty na bázi oxidů kovů, ceru, oxidu křemičitého, nanokompozitů, polydiacetylenů, polysacharidů či proteinů. Nanoantioxidanty mohou být potenciálně využívány ve farmacii a biomedicínských procesech [12].

## 1.2 Zdroje a získávání antioxidantů

Zdrojem přírodních antioxidantů jsou především rostliny, jedlé ovoce či zelenina, koření a bylinky, které obsahují vitaminy, fenolické sloučeniny, karotenoidy či stopové prvky. Vysokou antioxidační aktivitu vykazují například ostružiny, jahody, borůvky, černý rybíz, vlašské ořechy, rajčata, hroznové víno, citrusové plody, jablka či olivy. Esenciální oleje z koření a bylin jako např. z oregana, tymiánu, majoránky, levandule či rozmarýnu prokazatelně obsahují bohaté zdroje přírodních antioxidačních molekul, avšak s omezenějším rozsahem využití zapříčiněným silnou senzoricou aktivitou [13], [14]. Zdrojem přírodních antioxidantů a dalších bioaktivních látek mohou být také mikroorganismy, včetně bakterií, sinic, hub či lišejníků. Ve srovnání s rostlinnými zdroji mají tyto organismy rychlejší růst, díky čemuž jsou vyhledávány pro průmyslové využití především v potravinářství, kosmetice, léčivech či v zemědělských aplikacích [7].

Co se týče ovoce, zeleniny a konkrétně i luštěnin, zpracovatelský průmysl se neustále potýká s problémy minimalizování vzniku vedlejších produktů s ohledem na související ekologické problémy a socioekonomické ztráty. Například výroba džusů, dřeně, konzervovaného ovoce, džemů a dalších, vede ke vzniku velkého množství vedlejších produktů ve formě slupek, jader, semen, listů či stonků, které se poté stávají biologickým odpadem, jehož značná část však může být dále zpracovávána díky obsahu velkého množství cenných biologicky aktivních látek [15]. Ve vědecké studii [16] bylo zjištěno, že například výlisky z jablek, konkrétně slupky, jsou dobrým zdrojem polyfenolů. Dalším příkladem ovoce extrémně bohatého na antioxidanty je granátové jablko, mango, ananas, avokádo, papája, mučenka či liči [15], [17]. Dle výzkumu [18] na každou tunu vyrobené šťávy z granátového jablka vzniká až devět tun vedlejších produktů, které mohou být potenciálně dále využívány. Ukázalo se, že dokonce zhodnocováním nejedlých částí ovoce či zeleniny, coby vedlejších produktů, jsou získávány extrakty s bohatším bioaktivním obsahem než

u částí jedlých. Gorinstein a Martin-Belloso [19] zjistili, že slupky některých citrusových plodů, například citronů, pomerančů či grapefruitů, obsahují o 15 % více fenolických sloučenin nežli loupané ovoce. Freitas a Moldão-Martins [20] uvedli také vysoký obsah karotenoidů a vitamínu C ve vedlejších produktech z ananasu. Tento trend potvrdili ve své studii také George a Kaur [21], kteří hodnotili obsah různých antioxidantů v rajčatech a bylo zjištěno, že slupky rajčat obsahují výrazně větší množství antioxidantů nežli jejich dužina.

Je však důležité zdůraznit, že v rostlinné výrobě je klíčové udržovat konstantní několik faktorů, zejména klimatické a půdní podmínky, období sklizně, podmínky pro sklizeň a procesy extrakce, které mají vliv na standardizaci přírodních extraktů [15], [17].

Mnoho přírodních antioxidantů je obsaženo v rostlinných maticích a pro jejich další využití je nutná jejich separace za pomoci extrakce. Antioxidanty lze separovat z různých částí rostlin (listů, kořenů, stonků, plodů, semen či slupek). Kvalita přírodních extraktů, a především jejich antioxidační síla poté závisí především na kvalitě původního zdroje, což zahrnuje geografický původ, nutriční aspekty či skladování, ale také na technologiích použitých při jejich extrakci. Neexistuje jeden standardní extrakční postup pro provádění extrakce všech přírodních antioxidantů, z důvodu rozdílných chemických či fyzikálních vlastností, a také z důvodu přítomnosti antioxidantů ve zcela odlišných pevných maticích. Nejběžnějším technologickým postupem extrakce je použití organických rozpouštědel, následováno extrakcí superkritickými tekutinami, vysokým hydraulickým tlakem, mikrovlnami nebo ultrazvukem. Po extrakci je nutno antioxidanty stabilizovat z důvodu jejich náchylnosti k degradaci během skladování či při jejich začlenění do produktů z důvodu vysoké citlivosti na teplotu, pH, světlo, kyslík či vlhkost prostředí. Stejně jako u extrakce neexistuje univerzální metoda pro stabilizaci antioxidantů. Nejběžnější techniky prvotní stabilizace lze rozdělit na chemické procesy, jako je koacervace a molekulární inkluze, či mechanické procesy, mezi které patří sušení rozprašováním, fluidními procesy, chlazení rozprašováním, emulgování a sušení vymrazováním. Nejčastěji používanou technikou je však sušení rozprašováním, vzhledem k nízkým nákladům a snadné použitelnosti antioxidantů pro další stabilizační postupy, jelikož po tomto procesu antioxidanty mají formu prášku s částicemi o velikosti několika mikrometrů. Stabilizace antioxidantů po prvotním kroku se obvykle dosahuje výrobou kapslí, jejichž jádro je tvořeno antioxidantem a ochranný obal kapsle je většinou vyroben z polysacharidů, proteinů nebo lipidů. Zapouzdření antioxidantů poskytuje ochranu bioaktivních látek před degradací způsobenou vnějšími faktory, usnadňuje manipulaci s antioxidanty, zabraňuje odpařování

těkavých sloučenin, jako jsou esenciální oleje, a maskuje negativní organoleptické vlastnosti přírodních antioxidantů. Dále umožňuje také řízené uvolňování zapouzdřených antioxidantů [15], [17].

Syntetické antioxidanty na bázi fenolových skupin BHA a BHT jsou získávány z vedlejších produktů vznikajících při zpracování ropy. Molekula BHA je složena ze směsi dvou izomerních organických sloučenin 2-terc-butyl-4-hydroxyanisolu a 3-terc-butyl-4-hydroxyanisolu, chemicky syntetizována z 4-methoxy fenolu a izobutylenu. Molekula BHT je chemicky syntetizována z 4-methylfenolu s izobutylenem katalyzována pomocí kyseliny sírové [22], [23]. V případě TBHQ se jedná o derivát hydrochinonu substituovaný terc-butylovou skupinou [24].

Syntetické nanoantioxidanty je možno připravit hned několika chemickými postupy, jako například srážením, koprecipitací, sonifikačními postupy, sol-gely, mikrovlnně či hydrotermálně. Avšak za účelem snížení expozice organismů a životního prostředí toxickým chemikáliím, se stále více uplatňuje příprava nanoantioxidantů cestou „Green Chemistry“. Princip spočívá v získání biologického materiálu pro přípravu nanoantioxidantů z mikroorganismů, řas, rostlin či zemědělského bioodpadu, následovano extrakcí těchto materiálů. Poté jsou do biologického extraktu za optimalizovaných podmínek přidávány kovové prekurzory, což vede k vzniku nanoantioxidantů [12].

### 1.3 Vlastnosti antioxidantů

Pro správné a úplné pochopení vlastností či působení antioxidantů budou objasněny níže termíny jako volné radikály, reaktivní formy kyslíku (ROS) či oxidační stres [7].

#### 1.3.1 Volné radikály, ROS, oxidační stres

Volný radikál bývá definován jako jakákoli molekula schopná samostatné existence, jenž obsahuje nepárový elektron v atomovém orbitalu. Přítomnost nepárového elektronu poté činí volné radikály nestabilní, a především vysoce aktivní. Volné radikály mají schopnost být buď donorem elektronu nebo akceptorem elektronu z jiných molekul, což jim umožňuje chovat se jako oxidanty či redukční činidla. V biologických systémech bývají volné radikály často odvozeny z molekul kyslíku, dusíku či síry. Tyto volné radikály jsou zahrnuty do skupin nazývaných reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) či reaktivní formy síry (RSS). Skupina reaktivních forem kyslíku zahrnuje superoxidový aniont ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\bullet$ ), hydroperoxylový radikál ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), peroxid vodíku

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singletový kyslík (<sup>1</sup>[O<sub>2</sub>]) a kyselinu chlornou (HClO). Reaktivní formy dusíku jsou odvozeny od oxidu dusnatého reakcí s kyslíkem za vzniku peroxynitridu a RSS jsou tvořeny z thiolů reakcí s ROS. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkovány během buněčného cyklu a funkčních aktivit, přičemž hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci, apoptóze, genové expresi či transportu iontů. Nadměrné množství ROS však může mít negativní účinky na organismy, protože se jedná o vysoce reaktivní molekuly schopné poškozovat biologické struktury v jádře nebo na membránách buněk. Volné radikály a ROS mohou vznikat nejen při základních metabolických procesech v lidském těle, ale také z vnějších zdrojů. Termín oxidační stres označuje stav oxidačního poškození, jenž nastává při narušení rovnováhy mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační obranou organismu. Tento stav je spojen s poškozením široké škály makromolekulárních struktur, včetně lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Krátkodobý oxidační stres může být výsledkem odpovědi tkání na poranění způsobené traumatem, infekcí, tepelným poraněním, toxiny nebo nadměrným zatěžováním organismu. Naopak dlouhodobý oxidační stres významně přispívá k rozvoji zánětlivých onemocnění, ischemických poruch, neurologických onemocnění a dalších zdravotních problémů [7], [25], [26].

### 1.3.2 Lidská onemocnění spojována s oxidačním stresem

Reakce volných radikálů vedou k progresivním nežádoucím změnám, které jsou s přibývajícím věkem běžné, avšak jejich míra může být ovlivněna genetickými faktory nebo environmentálními vlivy, jež následně modulují rozsah poškození způsobeného volnými radikály [25], [27]. Rostoucí počet nemocí či poruch, stejně jako samostatný proces stárnutí prokazuje souvislost s teorií stárnutí oxidačním stresem, který je založen na strukturním poškození makromolekul, konkrétně lipidů, nukleových kyselin či proteinů, což zapříčiňuje stárnutí pokožky, orgánů či onemocnění organismů [28].

Rakovina a kardiovaskulární onemocnění jsou hlavními chorobami vznikajícími z volných radikálů [25]. Iniclace, podpora a progres rakoviny, stejně jako vedlejší účinky ozařování či chemoterapie, jsou spojovány s nerovnováhou mezi ROS a antioxidačním obranným systémem. Iniclace rakoviny je spojována s chromozomálními defekty a aktivací onkogenu, jelikož endogenní reakce volných radikálů, převážně ty iniciované ionizujícím zářením, mohou vést ke vzniku nádoru [29]. Oxidační stres přispívá také k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Polynenasycené mastné kyseliny jsou hlavní součástí lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) v krvi, kdy oxidace těchto lipidových složek hraje zásadní roli například při ateroskleróze. Vysoká hladina oxidovaného LDL vede

k poškození krevních cév a může vést k tvorbě aterosklerotických plátů. Kromě této skutečnosti je také oxidovaný LDL cytotoxický a může přímo poškozovat buňky obsažené v cévním systému [25]. Oxidační stres také představuje klíčový modulační faktor v patogenezi řady neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba či roztroušená skleróza, stejně tak jako u některých metabolických poruch, například *diabetes mellitus* [25], [30].

Výzkum [31] naznačuje skutečnost, že poškození volnými radikály, lze kontrolovat adekvátní antioxidační obranou, a že optimální příjem antioxidačních živin může přispět ke zvýšení kvality života či pozitivně ovlivnit délku života.

Antioxidanty jsou molekuly, které redukují volné radikály či snižují rychlost jejich produkce, díky schopnosti zachycovat volné radikály, která však může být rozdílná. Antioxidační aktivita či kapacita může významně korelovat s počtem aktivních skupin antioxidantu, především hydroxylových a aminových, a také s pozicemi těchto funkčních skupin v pořadí meta <para <ortho, od nejnižší aktivity po nejvyšší. Antioxidanty mohou působit prostřednictvím několika mechanismů, nejen vychytáváním radikálů, ale také chelatací iontů přechodných kovů, rozkladem peroxidu vodíku nebo hydroperoxidů, zhášením aktivních prooxidantů, posilováním endogenní antioxidační obrany, či například opravou výsledného poškození buněk volnými radikály. Na základě těchto skutečností je možné klasifikaci uvedenou v kapitole 1.1. doplnit o rozdělení antioxidantů na primární antioxidanty neboli antioxidanty přerušující řetězce či na antioxidanty sekundární, preventivní antioxidanty. Primární antioxidanty aktivně inhibují oxidační reakce vychytáváním ROS či RNS, prostřednictvím darování vodíku a vytváření stabilnějších produktů, zatímco sekundární antioxidanty působí nepřímo prostřednictvím chelatace kovových iontů a dalšími specifickými účinky [7], [12], [13]. Antioxidanty by po přidání do systému, jenž je potřeba stabilizovat, měly znamenat prodloužení indukčního období, to však záleží na i) množství antioxidantu přidaného do určité koncentrace, ii) médiu, ve kterém se antioxidant nachází a také iii) na době zabudování antioxidantu [33].

Antioxidanty v organismu tvoří komplexní antioxidační obranný systém, který zahrnuje jak endogenní enzymatické a neenzymatické, tak exogenní antioxidanty. Tyto komponenty společně přispívají k udržení redoxní homeostázy v těle. První obrannou linii tvoří enzymatické antioxidanty, jenž neutralizují primární reaktivní formy kyslíku. Druhou linii představují především neenzymatické antioxidanty, zahrnující jak endogenní látky, tak exogenní antioxidanty, jež účinně zachycují a inhibují volné radikály a oxidanty. Třetí

obránnou linii tvoří buněčné opravné mechanismy, které zabráňují dalšímu šíření oxidačního poškození a podílejí se na reparaci poškozených struktur [34].

### 1.3.3 Vlastnosti jednotlivých skupin antioxidantů

Polyfenoly jsou rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů rostlin zahrnujících flavonoidy, fenolové kyseliny, lignany či stilbeny. Dosud bylo identifikováno více než 8 000 různých typů polyfenolů. Polyfenolické sloučeniny se nacházejí v mnoha rostlinách, včetně čajovníkových listů, semen hroznů, borůvek, granátového jablka nebo v mandlích, špenátu či třešních. Mechanismy účinku polyfenolů zahrnují protizánětlivou a imunitní stimulaci, detoxikaci, antioxidační modulaci či změnu genové exprese [35]. Vědecký výzkum [36] potvrdil, že tyto sloučeniny působí více možnými cestami a udržují tak homeostázu tkání prostřednictvím více mechanismů. Polyfenoly se však vyznačují a jsou používány především pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Mimo tyto vlastnosti odhalila vědecká práce [37] provedená na myších modelech také antimutagenní či antikarcinogenní vlastnosti, při lokálním či perorálním podávání polyfenolů. Polyfenoly obsahují benzenové kruhy s připojenými hydroxylovými, –OH skupinami. Na počtu a poloze –OH skupin poté závisí antioxidační aktivita polyfenolů [35].

Nejrozšířenější a nejvýznamnější skupinou polyfenolů jsou flavonoidy. Je známo více než 5 000 flavonoidů, kdy chemicky sdílejí základní strukturu sestávající se ze dvou aromatických kruhů, které jsou spolu vázány třemi atomy uhlíku, což vytváří okysličený heterocyklus. V přírodě se flavonoidy vyskytují ve formě glykosidů, které jsou složeny z vlastního flavonoidu (aglykonu), například kvercetinu či rutinu a uhlovodíku. Mechanismus účinku flavonoidů vychází ze skutečnosti, že většina flavonoidů se vyskytuje ve formě rezonančně stabilizovaných aniontových radikálů, což umožňuje vylavování téměř všech typů volných radikálů či ROS, a také mají vysokou afinitu k singletovému kyslíku. Flavonoidy jsou schopny také inhibice různých faktorů, které indukují tvorbu ROS, čímž zabráňují jejich další tvorbě. Antiradikálová aktivita flavonoidů je podpořena také schopností absorbovat ultrafialové (UV) záření. Další důležitou vlastností flavonoidů je jejich protizánětlivá aktivita. Flavonoidy jsou schopny interagovat s protizánětlivými faktory a enzymy, které se přímo nebo nepřímo podílejí na vzniku či šíření zánětlivých reakcí. Vylavováním volných radikálů dochází k inhibici oxidačních procesů membránových lipidů, což vede k uvolňování kyseliny arachidonové, která je poté přeměněna na protizánětlivé leukotrieny či prostaglandiny zabráňující infekci. Flavonoidy lze na základě poloh a počtů hydroxylových skupin rozdělit do podtříd flavonolů, flavonů,

flavonanů, antokyanů či isoflavonů. V průmyslových aplikacích nacházejí uplatnění především zástupci z podtřídy flavonolů, a to kvercetin, myricetin, rutin, morin či kemferol [35], [38], [39].

Fenolové kyseliny jsou polyfenolové sloučeniny, které lze rozdělit na dva hlavní typy vycházející buď z kyseliny benzoové, například kyselina gallová, či z kyseliny skořicové, například kyselina kávová. Fenolové kyseliny se volně vyskytují v ovoci či v zelenině, avšak v zrnech, semenech, otrubách či slupkách bývají obvykle vázány [35].

Vitaminy jsou skupiny komplexních organických sloučenin přítomných v potravinách, nezbytné pro zdraví organismů. Některé vitaminy však mohou být syntetizovány z jiných zdrojů, například UV záření je klíčové pro syntézu vitaminu D. Vitaminy jsou odlišovány od ostatních živin díky své výrazné chemické povaze a funkci. Obecně jsou vitaminy děleny do dvou hlavních skupin, a to na vitaminy rozpustné ve vodě, zahrnující komplex vitaminů B a C, či na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E a K). Antioxidační aktivita je připisována především vitaminům E a C, díky jejich schopnosti reagovat s volnými radikály, zejména peroxylovými a singletovým kyslíkem, a také vitaminu A. Vitamin E, neboli tokoferol, je pokládán za nejhojnější a nejúčinnější lapač peroxylových radikálů, za vzniku tokoferoxylových radikálů, v biologických lipidových strukturách, jako jsou buněčné membrány či LDL. Vitamin C je schopen poté redukovat tokoferoxylové radikály podporující antioxidační účinnost vitaminu E [39], [40].

Stopovým prvkem se rozumí jakýkoliv chemický prvek, který je v organismu obsažen ve velmi malém množství, obvykle do 0,1 % objemu. Stopové prvky lze klasifikovat jako nutričně esenciální, pravděpodobně esenciální či potenciálně toxické. Nutričně esenciální prvky jsou nezbytné pro správné fyziologické a metabolické funkce. V lidském těle bylo popsáno nejméně 21 stopových prvků, z nichž nejdůležitějšími jsou železo, měď, kobalt, zinek, selen, mangan, chrom, jód a molybden. Nedostatek či nadbytek některého ze stopových prvků může způsobit různé zdravotní problémy či ovlivnit vývoj a růst organismu. Antioxidační aktivita se liší v závislosti na rozdílných vlastnostech stopových prvků. Stopové prvky jsou kritickými složkami pro řadu procesů a jejich nedostatek může vést také k narušení celkového antioxidačního systému. Měď, mangan, selen a zinek působí jako kofaktory antioxidačních enzymů, které chrání tělo před ROS. Pro měď platí určitá rovnováha, jelikož se jedná o redoxní stopový prvek. Měď může iniciovat reakce volných radikálů, avšak také je kofaktorem SOD, enzymu pohlcujícího volné radikály [41], [42].

Karotenoidy jsou přírodní lipofilní pigmenty, jež jsou kumulovány v lipoproteinech, buněčných membránách a intracelulárních lipofilních systémech. Chemicky lze popsat karotenoidy jako tetraterpeny primárně složené z izoprenových jednotek a uhlíkových skeletů běžně tvořených z polyenových řetězců. Karotenoidy lze na základě jejich chemických struktur klasifikovat do dvou hlavních podskupin, a to na karoteny a xantofyly. Hlavním rozdílem podskupin je přítomnost kyslíku v chemické struktuře xantofylů. Karotenoidy obsahují více než 700 přirozeně se vyskytujících pigmentů, produkovaných především rostlinami, zvířaty či mikroby. Karotenoidy zodpovídají za barevnost ovoce či zeleniny. Jsou také nezbytnou součástí lidské stravy a mají zásadní vliv na lidské zdraví, především pro své antioxidační, cytoprotektivní či fotoprotektivní vlastnosti [43]. Mezi karotenoidy, jež jsou významné pro lidské zdraví, patří beta a alfa karoten, kryptoxantin, lykopen, lutein a zeaxanthin [44]. Antioxidační aktivita karotenoidů je dána jejich schopností zhaset volné radikály či singletový kyslík. Pro antioxidační aktivitu karotenoidů jsou klíčové konjugované dvojné vazby v molekulách, které určují účinnost fyzikálního zhasení. Fyzikální zhasení zahrnuje přímý přenos energie mezi karotenoidy a radikály, navíc karotenoidy jsou schopné účinně deaktivovat molekuly, které volné radikály produkují [43].

Syntetické antioxidanty jsou obecně antioxidačně účinnější a z chemického hlediska čistější nežli antioxidanty přírodní [6].

Antioxidant BHA je bílá voskovitá látka nejčastěji dostupná ve formě vloček či tablet známá pod označením E-320 a BHT je bílá krystalická pevná látka označována jako E-321. Vzhledem ke své chemické struktuře jsou tyto antioxidanty velmi těkavé, a proto není doporučováno jejich použití pro tepelné procesy. Mechanismus působení těchto antioxidantů spočívá v zabránění peroxidace lipidů pomocí donoru vodíku, čímž dochází k přerušení volné radikálové autooxidační řetězové reakce, výsledný oxidovaný fenolový iont je následně stabilizován vlastní rezonancí benzenového jádra. Antioxidant TBHQ je dostupný ve formě prášku, známý pod označením E-319 [6], [9].

Antioxidační aktivitu nanoantioxidantů lze přičíst jejich katalytickým či redoxním vlastnostem, a také schopnosti oscilovat mezi různými oxidačními stavy. Nanoantioxidanty disponují několika výhodami vůči běžným antioxidantům, především zvýšenou biologickou dostupností, řízeným uvolňováním, cíleným dodáváním systémů na místo určení, biokompatibilitou či vysokou stabilitou [12], [45].

## 1.4 Aplikace antioxidantů

Nejdůležitější a nejvyhledávanější uplatnění antioxidanty nalézají převážně v kosmetickém a potravinářském průmyslu, či ve farmacii [7]. Aplikace antioxidantů v těchto odvětvích, na základě jejich klasifikace dle zdroje původu, jsou popsány v následujících kapitolách mimo využití v kosmetickém průmyslu uvedeném v kapitole 2.

### 1.4.1 Aplikace přírodních antioxidantů

V důsledku trendu o usilování zdravějších návyků ve společnosti a také z legislativních nároků týkajících se bezpečnosti potravin, léčiv či kosmetiky, jsou v posledních letech žádanější a vyhledávanější více antioxidanty přírodního původu. Tuto skutečnost potvrzuje také omezované použití velmi známých a účinných antioxidantů syntetického původu BHA a BHT, které jsou již například v Japonsku zcela zakázány [4], [5]. Tyto antioxidanty představují potenciální zdravotní rizika, která jsou spojena s kontaminací chemickými prekursorů nebo toxickými rozpouštědly používanými při jejich přípravě, stejně jako s tvorbou nebezpečných vedlejších produktů, například při jejich rozkladu, viz studie [46]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) dokonce zařadila antioxidant BHA mezi podezřelé karcinogeny skupiny 2B [6].

Potravinářský průmysl se zaměřuje na využití přírodních antioxidantů k prodloužení trvanlivosti produktů, což zvyšuje bezpečnost potravin a spotřebitelský výběr zdravějších produktů, jelikož přírodní antioxidanty využívané v potravinách zachovávají nutriční obsah a minimalizují zdravotní rizika související s oxidačním stresem. V potravinářském průmyslu jsou vyhledávány především antioxidanty, které neovlivňují senzorické vlastnosti či cenu potravin. Prodloužení trvanlivosti potravin pomocí antioxidantů je spojeno především se zabráněním oxidace nenasycených dvojných vazeb mastných kyselin začleněním antioxidantů do tuků či olejů jako konzervačních látek. Oxidace lipidů je hlavní příčinou zhoršení kvality mnoha typů potravin, jelikož vede ke žluknutí potravin, čímž jsou zhoršeny senzorické vlastnosti, či k produkci potenciálně toxických reakčních produktů. Antioxidanty, jakožto konzervační látky, je možno využít například v masných či mléčných výrobcích [47].

V poslední době bylo provedeno několik studií zaměřujících se na použití přírodních antioxidantů ke konzervaci a zlepšení senzorických vlastností masa a masných výrobků [48]. Ve vědecké studii [49] byly využity ke konzervaci masa hroznové výlisky, jež se ukázaly jako účinné konzervanty hovězího masa a výrobků z něj. Ze tří testovaných typů hroznových

výlisků byla nejsilnější antioxidační aktivita připisována výliskům z červeného vína bez pecek, přičemž všechny byly účinnější nežli standardně používaný siřičitan. V obdobné studii Munekata a kol. [50] byl testován extrakt z arašídů, který vykazoval vyšší antioxidační aktivitu v porovnání se syntetickým antioxidantem BHT.

Díky obsahu velkého množství antioxidačních látek patří mléčné výrobky mezi nejzajímavější a nejslibnější potraviny s ohledem na jejich antioxidační aktivitu. Nejvýznamnějšími antioxidanty v mléčném tuku jsou konjugovaná kyselina linolová, beta karoten, vitamin A, E, D i C, koenzym Q10, fosfolipidy a antioxidační aktivitu mohou vykazovat také biopeptidy, které jsou produkovány při fermentaci či zrání sýrů. Je však nutno zmínit, že zastoupení antioxidantů v mléce je rozlišné v závislosti na různých faktorech. Vliv na zastoupení antioxidantů v mléce může mít fáze laktace zvířete, tepelné ošetření mléka či výživa zvířat. Během posledních let bylo zkoumáno několik přírodních zdrojů jako možných antioxidačních posilovačů mléka k vyrovnání rozdílného množství obsahu antioxidantů, zvýšení kvality a nutričních hodnot potravin či k vývoji nových funkčních potravin [48]. V tomto směru například Alenisan a kol. [51] zkoumali vliv extraktu z červeného ženšenu na fyzikálně-chemické parametry, senzorické vlastnosti a antioxidační aktivitu mléka. Na základě výsledků autoři dospěli k názoru, že rostlinnými extrakty lze plně nahradit syntetické konzervační látky a zvýšit antioxidační vlastnosti konečných produktů, aniž by došlo ke změně nutričního profilu. Zahrnutí sloučenin bohatých na antioxidanty, například z potravinového odpadu, již do krmiv pro zvířata, by mohlo zlepšit antioxidační kapacitu a kvalitu potravin, a také celkový stav zvířat [48].

Antioxidační potravinové doplňky či funkční potraviny obsahující antioxidanty, jako například vitamin C,  $\alpha$ -tokoferol, rostlinné fytochemikálie, extrakt ze zeleného čaje či hroznových semen, zaznamenaly na současném trhu obrovskou poptávku. Mezi nejvyhledávanější doplňky stravy obsahující komplex antioxidantů patří například spirulina, chlorella či zelený ječmen [52].

Mimo již zmíněné pozitivní vlastnosti a vlivy antioxidantů na lidské zdraví jsou antioxidanty ve farmacii využívány také jako pomocné látky ve farmaceutických formulacích, kde zachovávají účinnost, bezpečnost a stabilitu bioaktivních sloučenin či terapeutických činidel. Farmaceutický průmysl využívá také mnoho antioxidantů v biomedicínských produktech, příkladem mohou být medicínské produkty k hojení ran s obsahem vitaminu E [7].

Antioxidanty jsou často přidávány také do průmyslových produktů, zejména jako stabilizátory v palivech či mazivech. Například v benzínu jsou využívány k zabránění polymerace, která vede k znečištění motoru. Dále jsou také široce využívány k prevenci oxidační degradace polymerů, konkrétně pryží, plastů či lepidel, kde oxidace způsobuje ztrátu pevnosti či elasticity materiálů [47]. Dalším průmyslovým využitím antioxidantů je jejich zakomponování do obalových materiálů pro zajištění bezpečnosti, stability či konzervace balených produktů [53].

#### 1.4.2 Aplikace syntetických antioxidantů

Jak již bylo zmíněno, tak syntetické antioxidanty, jsou z hlediska antioxidační aktivity účinnější nežli antioxidanty přírodní. Syntetické antioxidanty jsou využívány také kvůli nízké pořizovací ceně, stabilitě či reprodukovatelnosti [6].

Antioxidanty BHA a BHT nacházejí využití především v potravinářském průmyslu při výrobě olejů, kde oba antioxidanty vykazují vysokou antioxidační účinnost převážně v živočišných tucích, méně však v tucích či olejích rostlinných. Dále mohou být využívány v obalových materiálech pro potraviny, krmivech, méně v léčivech či kosmetice. Dle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je však maximální možné dávkování do 0,02 % na množství oleje či tuku. V rostlinných tucích a olejích je běžné užívaný TBHQ, kde vykazuje vyšší účinnost, než již zmiňované antioxidanty BHA a BHT, jeho výhodou je i tepelná stabilita [6], [9].

Rozvojem nanotechnologií vznikají nová kreativní řešení pro léčbu poruch a onemocnění souvisejících s oxidačním stresem, díky vyšší antioxidační účinnosti proti antioxidantům přírodním, a proti antioxidantům syntetickým nepředstavující zdravotní rizika. Je však nutná potřeba dalších výzkumů především v lékařské a farmaceutické oblasti k překonání toxikologických omezení a u nanoantioxidantů na bázi kovů pro potřeby dlouhodobé léčby a přiblížení technologií potřebám klinické praxe [45].

## 2 ANTIOXIDANTY V KOSMETOLOGII

V dnešní době je stále více věnována pozornost tématům, jako je ekologie a udržitelnost. Z těchto důvodů, se mnoho spotřebitelů odvrací od syntetických chemikálií využívaných v kosmetických produktech ve prospěch přírodních alternativ, doufajíce, že tyto kosmetické produkty nejsou škodlivé pro zdraví a jsou šetrnější k životnímu prostředí. V závislosti na těchto trendech, v posledních letech vzrostl zájem také o účinky přírodních antioxidantů, vzhledem k jejich bezpečnosti a použitelnosti v kosmetických produktech. Antioxidanty využívané v kosmetice jsou často označovány jako kosmeceutika. Termín kosmeceutikum je definován jako kosmetická surovina obsahující aktivní látky s vlastnostmi podobnými léčivům. Zakomponování antioxidantů do kosmetických produktů přináší také stabilizační či konzervační výhody [39].

### 2.1 Oxidační a antioxidační systémy kůže

Kůže je největší orgán lidského těla, jenž jej chrání před vnějšími vlivy prostřednictvím udržování homeostázy, zadržováním škodlivých mikrobů či chemikálií a blokováním slunečního záření. Kůže je dělena na tři základní části, a to *epidermis*, *dermis* a *subcutis*, z nichž každá má své specifické složení, funkce či vlastnosti. *Epidermis* neboli pokožka je nejzevnější vrstvou tvořenou keratinocyty, melanocyty, Langerhansovými buňkami a mechanoreceptory v podobě Merkelových buněk. Na základě složení, *epidermis* zásadně ovlivňuje vzhled, texturu, hydrataci či zbarvení kůže. *Epidermis* je dále děleno na *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale*. *Stratum corneum* (SC), jenž obsahuje keratinocyty bez buněčných jader, tzv. korneocyty, je nejsvrchnější vrstvou kůže. Jedná se o selektivně propustnou heterogenní epidermální vrstvu, která poskytuje ochranu proti poškození okolním prostředím a zároveň udržuje hydrataci pokožky. *Dermis* neboli škára je střední vrstvou kůže, tvořena vazivovými kolagenovými a elastinovými vlákny, mezi nimiž jsou rozptýleny buňky, pleteně krevních cév, nervové pleteně, včetně nervových zakončení, mazové či potní žlázy, vlasové folikuly a v dolní části také tukové buňky. *Dermis* zodpovídá za pevnost a pružnost kůže. *Hypodermis* neboli podkožní vazivo tvoří největší část kůže, a to z 10–15 % tělesné hmotnosti u žen a z 15–20 % u mužů. *Hypodermis* je tvořeno tukovými buňkami – adipocyty, z čehož vyplývá funkce *hypodermis* spočívající v tvorbě energetických zásob [39], [54].

Kůže je chráněna pevným ochranným systémem, jenž zahrnuje SC jako primární bariéru a komplexní antioxidační obranný systém zajišťující udržení redoxní homeostázy pokožky. Avšak málokterá tkáň je vystavována tak velkému oxidačnímu stresu, jako právě kůže. Na kožní tkáň působí endogenní i exogenní zdroje ROS, čímž může docházet k narušení redoxní rovnováhy [55], [56].

Endogenní ROS jsou neustále produkovány jako vedlejší produkty buněčného metabolismu v mitochondriích, peroxisomech, endoplazmatickém retikulu (ER) či enzymem NADPH oxidázou (NOX), který je přítomen téměř ve všech vrstvách kůže. V mitochondriích dochází k přeměně 1–5 % spotřebovaného kyslíku na  $\bullet\text{O}_2^-$ , jehož nadměrná tvorba v důsledku dysfunkce mitochondrií zvyšuje riziko poškození DNA a apoptózy. V peroxisomech vzniká během  $\beta$ -oxidace mastných kyselin peroxid vodíku, obdobně jako při skládání proteinů v ER. Redoxní rovnováha v ER je udržována glutathionem či glutathiondisulfidovým cyklem, avšak při nadměrné zátěži dochází k akumulaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a narušení rovnováhy. Mezi hlavní exogenní faktory přispívající k oxidačnímu stresu patří UV záření a látky znečišťující ovzduší [56].

Antioxidanty přítomné v kůži vykazují gradient v lidské *epidermis*, konkrétně vyšší hladiny v bazálních vrstvách a nižší v horních vrstvách kůže, což může být vysvětleno postupným vyčerpáváním antioxidantů z horních vrstev kůže v důsledku neustálého vystavování kůže vnějšímu okolí. Také bylo zjištěno, že *epidermis* vykazuje vyšší antioxidační aktivitu v porovnání s vrstvou *dermis*. Hladiny antioxidantů jsou však postupně snižovány vlivem vnitřních i vnějších faktorů podílejících se na stárnutí kůže [39], [55], [56].

Klíčové antioxidační enzymy zahrnují SOD, CAT a GPx. Enzym SOD, přítomen v mitochondriální matrix, je schopen vychytávat  $\bullet\text{O}_2^-$  a katalyzovat jej na  $\text{H}_2\text{O}_2$  a kyslík ( $\text{O}_2$ ). Tento proces je zásadní, neboť  $\bullet\text{O}_2^-$  může v kůži vyvolat peroxidaci lipidů, degradaci kolagenu či poškození DNA, což následně vede ke změně kožních stavů, jako je zvrásnění kůže či pigmentace. V současné době byly v kůži identifikovány tři formy SOD s různými kovalentně vázanými látky zahrnující měď (Cu), zinek (Zn) či mangan (Mn), přičemž bylo zjištěno, že Cu/Zn-SOD vykazuje vyšší hladiny u mužů nežli u žen. Enzym GPx obsahující selen je schopen katalyzovat různé formy lipidových hydroperoxidů a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na úkor glutathionu, kdy konečným produktem reakce je voda. Koexistence SOD a GPx v kůži, snižuje zánět a podporuje hojení poraněné kůže. Enzym CAT, vykazující vyšší antioxidační aktivitu nežli GPx, se nachází především v *epidermis* a je schopen neutralizovat  $\text{H}_2\text{O}_2$  vznikající při rozkladné reakci SOD či z okolního prostředí [56]. Aktivita antioxidačních

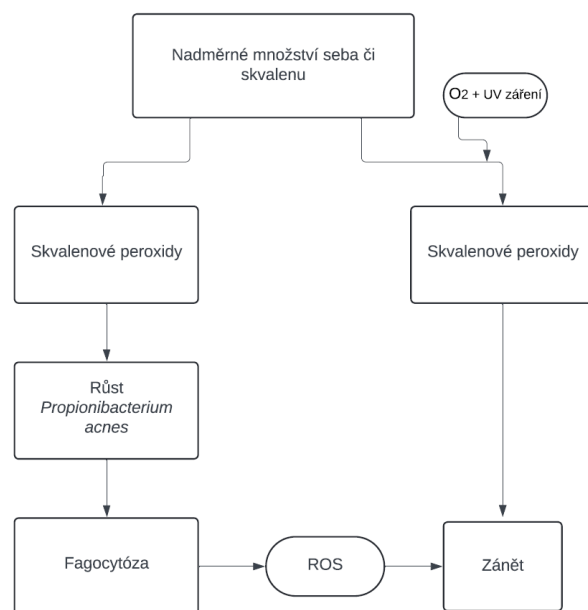
enzymů se směrem k povrchu kůže snižuje a je ovlivňována především působením UV záření. Ve studii [57] bylo zjištěno, že UVA záření snižuje aktivitu CAT, zatímco aktivita SOD zůstává zachována, UVB záření tento efekt nevykazuje. Obnovení aktivity CAT bylo zpozorováno do čtyř týdnů po expozici UVA zářením.

Z karotenoidů byly v kůži detekovány zejména beta-karoten, lykopen, zeaxanthin a lutein. Jejich hladina v pokožce byla prokázána jako pozitivně korelující s příjmem ovoce a zeleniny. Vitamin C vykazuje v kůži vyšší koncentrace než v plazmě, což potvrzuje jeho aktivní akumulaci, zejména v *epidermis*, kde může dosahovat až pětinasobně vyšších hladin ve srovnání s *dermis*. Vitamin E představuje klíčový antioxidant první linie, přičemž hladina vitaminu E je v *epidermis* přibližně o 90 % vyšší než v *dermis* [56].

Při nedostatečné detoxikaci ROS pomocí antioxidantů přítomných v kůži dochází k poklesu jejich hladin, čímž je podporován rozvoj oxidačního stresu a zánětlivých procesů. Tento stav narušuje integritu kožní bariéry, což vede ke zvýšení transepidermální ztráty vody (TEWL) a snížení hydratace pokožky. Kromě zrychlení procesů stárnutí, podrobně rozebraných v podkapitole 2.1.1., bývá dlouhodobé narušení redoxní rovnováhy spojováno také s rozvojem onemocnění kůže, jako je psoriáza, *acne vulgaris*, vitiligo či atopická dermatitida [55], [56].

*Acne vulgaris* představuje běžné kožní onemocnění, jehož vznik je spojován s bakterií *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) a zvýšenou tvorbou kožního mazu (seba), typicky u jedinců s mastnou pletí. Toto onemocnění postihuje muže i ženy napříč věkovými kategoriemi, nejčastěji však v období puberty. Vyskytuje se v různých formách závažnosti, přičemž těžší formy mohou být provázeny bolestivými lézemi a vést k nerovnoměrné struktuře pokožky. *Sebum*, produkované mazovými žlázami a uvolňované na povrch kůže skrze vlasový folikul, je tvořeno triacylglyceroly, skvalenem, voskovými estery, volnými mastnými kyselinami a deriváty cholesterolu. Skvalen jakožto nenasyčený uhlovodík podléhá snadno peroxidaci, jejímž důsledkem je tvorba lipoperoxidů – prozánětlivých molekul. Při nadprodukci mazu dochází k ucpání vlasového folikulu směsí seba a keratinocytů, čímž vzniká příznivé prostředí pro růst bakterie *P. acnes*. Její růst následně stimuluje akumulaci a aktivaci neutrofilů, které prostřednictvím fagocytózy produkují ROS jako součást obranného mechanismu. Tento proces bývá doprovázen poškozením folikulárního epitelu a zánětlivou odpovědí, která se projevuje otokem, zarudnutím či bolestí, viz Obrázek 2. V případě zdravé pokožky je endogenním antioxidačním systémem udržována rovnováha mezi tvorbou ROS a jejich eliminací. U pacientů s *acne vulgaris* však

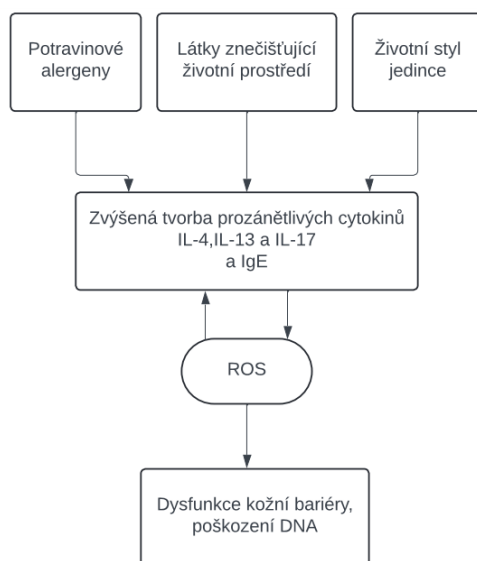
bývá tato rovnováha narušena v důsledku zvýšené oxidační zátěže a zánětlivých procesů. Byla prokázána snížená aktivita enzymu GPx ve vzorcích kůže odebraných z aknézních lézí ve srovnání se zdravou pokožkou, přičemž tato hladina nepřímo koreluje se závažností onemocnění. Také při studiu celkové rovnováhy oxidant – antioxidant u pacientů s akné byly zaznamenány nižší hladiny SOD, CAT, vitaminu E a zinku. Tyto výsledky prokázaly, že akné je spojeno s lokálním i systémovým oxidačním stresem, pravděpodobně v důsledku zánětlivého pozadí onemocnění [58].



Obrázek 2 Porušení redoxní rovnováhy pokožky  
u *acne vulgaris*  
(zdroj: upraveno dle [56])

Atopická dermatitida, známá také jako atopický ekzém, je chronické, zánětlivé, svědivé onemocnění kůže. Atopická dermatitida se vyznačuje suchostí, zarudnutím, praskáním, šupinatěním či tvorbou krust na kůži, což je způsobeno porušením kožní bariéry a projevy v důsledku senzibilizace na alergenů pocházející z potravy či životního prostředí nebo v závislosti na životním stylu jedince. Reakce jsou zprostředkovány imunoglobulinem E (IgE) aktivovaným cytokiny. Atopická dermatitida se obvykle projevuje již během kojeneckého věku a dětství, ale může postihnout téměř každou věkovou kategorii. Propojení mezi oxidačním stresem a atopickou dermatitidou bylo již dříve navrhováno s důkazy potvrzující zvýšenou peroxidaci lipidů, vedoucí k snížené aktivitě SOD, CAT, GPx a také hladinám neenzymatických antioxidantů, jako je glutathionu, vitaminu E, C a A [56]. Byla provedena *in vitro* studie [59] s využitím zdravých lidských epidermálních keratinocytů, které byly ošetřeny prozánětlivými cytokiny IL-4, IL-13 a IL-17. Ošetření vedlo ke zvýšení hladiny ROS a následnému poškození DNA. Tato skutečnost může částečně objasnit

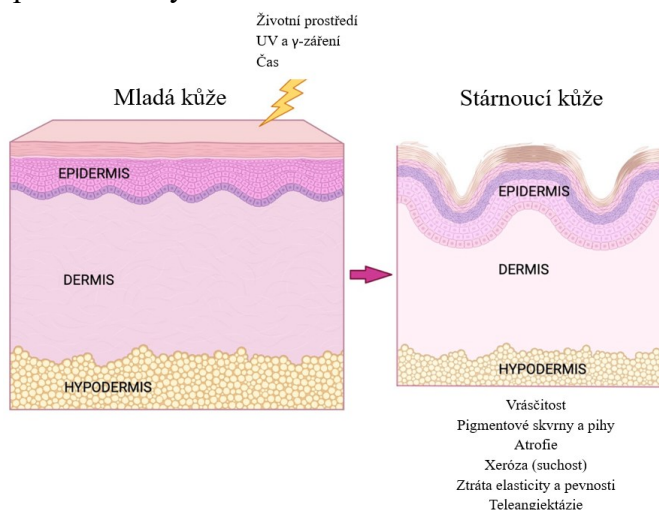
souvislost mezi oxidačním stresem a zánětlivými procesy vedoucími ke sníženému přežití keratinocytů a vzniku lézí u pacientů s atopickou dermatitidou, viz Obrázek 3.



Obrázek 3 Porušení redoxní rovnováhy pokožky u atopické dermatitidy  
(zdroj: upraveno dle [56])

### 2.1.1 Faktory podílející se na stárnutí kůže

Stárnutí je velmi složitý přirozený biologický proces zahrnující nespočet změn, ke kterým dochází v důsledku kombinace exogenních a endogenních faktorů, ovlivněný také individuálními genetickými, metabolickými či hormonálními vlivy. Stárnutí je spojováno také s životním stylem či výživou, jelikož ke stárnutí přispívá například kouření tabákových výrobků, konzumace alkoholu, stres, nezdravá strava či nedostatečný pohyb. Tyto faktory vedou ke kumulativním strukturálním a fyziologickým změnám v celém organismu, jenž se projevují změnou vzhledu či funkce jednotlivých orgánů [60]. Změny uskutečňující se v kůži během stárnutí jsou prezentovány na Obrázku 4.



Obrázek 4 Změny kůže během stárnutí  
(zdroj: [61])

Změny nastávající v kůži během stárnutí jsou připisovány především molekulárním a buněčným změnám, buněčnému cyklu stárnutí, volným radikálům, ROS či oxidačnímu stresu a v neposlední řadě glykaci, viz Obrázek 5. Glykace je věkem podmíněná buněčná degenerace zahrnující akumulaci konečných produktů pokročilé glykace (AGE), což jsou nevratně modifikované, strukturně odlišné biopolymery. Produkty AGE vedou například k zesíťování kolagenu, abnormalitám v extracelulárním matrix či k narušení interakce buňka-matrix. Produkty AGE jsou schopny také vazby na specifické receptory imunitních buněk, což způsobuje uvolnění zánětlivých mediátorů a následnou tvorbu ROS [62].



Obrázek 5 Faktory ovlivňující stárnutí kůže  
(zdroj: upraveno dle [62])

Obecně lze stárnutí kůže dělit na několik typů. Přírozené stárnutí je charakterizováno postupnými změnami, jako je hladší, bledší, tenčí a sušší kůže, snížená elasticita a tvorba jemných vrásek. Proti tomu předčasně zestárlá kůže, která je výsledkem působení vnějších faktorů, především UV či rentgenovým zářením, ozonem či látkami znečišťující životní prostředí, vykazuje zesílení *epidermis*, nerovnoměrnou pigmentaci, hluboké vrásky, ztrátu pružnosti, matnost a drsnost pokožky. Samostatnou kategorií je hormonální stárnutí, spojováno především s poklesem hladin pohlavních hormonů (zejména estrogenů), které vedou ke snížené syntéze kolagenu a elastinu, snížení hydratace pokožky a oslabení bariérové funkce kůže. Je udáváno, že syntéza kolagenu a elastinu v kůži klesá o 1 % ročně, což vede k reorganizaci tkáně a způsobuje rozvoj kožních vrásek ve vrstvě *dermis*.

Předpokládá se, že obecně vnější faktory jsou hlavní příčinou stárnutí kůže a pouze 3 % faktorů podporující stárnutí kůže jsou endogenního původu [62].

Předčasné stárnutí kůže je převážně připisováno fotostárnutí, které je důsledkem dlouhodobého vystavování kůže slunečnímu záření, zejména UV složce. Ultrafialové záření, jenž dopadá na Zemi, lze rozdělit z 95 % na UVA záření s vlnovými délkami 320–400 nm a z 5 % na UVB záření s vlnovými délkami 290–320 nm. Záření typu UVA je schopno pronikat do vrstev *epidermis* a *dermis* a vytvářet nepřímé poškození pokožky prostřednictvím tvorby ROS, aktivace transkripce, peroxidace lipidů či zlomů v DNA. Záření typu UVB proniká především do vrstvy *epidermis*, kde způsobuje přímé poškození DNA, erytém či pigmentaci kůže, a rovněž přispívá k tvorbě ROS. Ultrafialové záření interaguje s endogenními chromofory přítomnými v kůži, které při excitaci vedou k tvorbě volných radikálů nebo vyvolávají přímé fotochemické změny v biomolekulách. Mezi tyto chromofory patří melanin, nukleové kyseliny, kyselina urokanová, riboflavin, vitaminy, steroidy či některé aminokyseliny. Negativní vliv na zdraví pokožky mají i látky znečišťující ovzduší. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) mezi nejproblematictější složky znečištěného ovzduší patří pevné částice, ozon, oxid dusičitý a oxid siřičitý. Tyto látky mohou zvyšovat oxidační stres prostřednictvím peroxidace lipidů, snižovat antioxidační kapacitu kůže a narušovat její bariérovou funkci. Ozon navíc přispívá ke vzniku proteinových karbonylů, jenž se podílí na zvýšené tvorbě vrásek [56].

## 2.2 Systémy s antioxidační aktivitou

Emulze patří mezi nejčastěji využívané systémy v péči o pokožku díky své univerzálnosti, jelikož umožňují současné dodání hydrofilních i hydrofobních látek do kůže. Z chemického hlediska se jedná o nestabilní heterogenní systém, v němž jsou dvě nebo více nemísitelných kapalin či polotuhých materiálů dispergovány v jiné kapalině ve formě kapiček. Dispergovaná složka tvoří vnitřní fázi, zatímco okolní prostředí tvoří spojitou fázi vnější. Existuje několik typů emulzí, mezi něž patří olej ve vodě (o/v), voda v oleji (v/o), dále vícefázové emulze (o/v/o či v/o/v), nanoemulze, mikroemulze či Pickeringovy emulze stabilizované pevnými částicemi. Emulze obvykle vznikají disperzními či kondenzačními metodami. Disperzní metody zahrnují mechanické míchání například pomocí homogenizátorů, za přítomnosti emulgátoru. Výsledkem je vytvoření hrubé disperze. Emulgátor je molekula amfipatické struktury, jenž se nachází na rozhraní dvou nemísitelných fází (o/v), čímž snižuje povrchové mezifázové napětí a umožňuje rozptýlit

kapičky oleje ve vodě. Kondenzační metody se uplatňují především při přípravě emulzí typu v/o. Mezi další techniky pro přípravu emulzí patří fázová inverze či elektrické metody [63].

Emulze o/v vykazují nižší pocit mastnoty po aplikaci na pokožku a přispívají ke zvýšené hydrataci, což je činí vhodnými pro použití v hydratačních kosmetických přípravcích. Naopak emulze typu v/o zanechávají mastnější film a bývají využívány zejména ve výživových či ochranných přípravcích, například proti slunění. Alternativou k nestabilním makroemulzním systémům o/v jsou čiré stabilní mikroemulze s velikostí částic 5–50 nm. Stabilita systému je zajištěna pevnými částicemi přítomnými na rozhraní fází, čímž je snižována povrchová energie. Vícefázové emulze představují speciální typ emulzního systému, tvořený lamelární gelovou fází vytvářející komplexní síť ve fázi vodné, zajišťující udržení kapiček olejové fáze. Uspořádání vícefázových emulzí brání koalescenci, zvyšuje viskozitu a stabilitu emulzního systému [63].

Příprava systémů s antioxidanty nese několik úskalí, jako jsou chemická stabilita, biokompatibilita, funkčnost či transdermální absorpce antioxidantů. Stabilitu antioxidantů v systémech ovlivňují fyzikální vlastnosti, jako velikost částic a homogenita, obsah vlhkosti a hygroskopicitu, tepelné vlastnosti či reologické vlastnosti, jež jsou při přípravě systémů hodnoceny běžnými měřicími technikami. Další úskalí takových systémů představuje také formulační a skladovací stabilita. Ve většině případů může být stabilita hodnocena monitorováním zadržování antioxidantů systémem při vystavení systému různým podmínkám prostředí, jako například světlu či zvýšené teplotě. Stabilita je poté vyhodnocena například poměrem antioxidantů, jenž v systému zůstaly po skladování a počátečním obsahem antioxidantů v systému. Obsah antioxidantů v systému je měřen pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) či UV-VIS spektroskopie. Biokompatibilita systémů s antioxidanty je hodnocena pomocí měření toxicity *in vitro* či *in vivo*. Hodnocení toxicity zahrnuje měření cytotoxicity, fototoxicity, míry podráždění a klinické tolerance systému s antioxidanty. Funkčnost systémů s antioxidanty je měřena především *in vivo* testováním, pomocí exaktně měřených veličin kůže [64].

Existuje určité nedorozumění ohledně termínů, které jsou používány k popisu systémů s antioxidantní aktivitou. Termín antioxidantní aktivita se týká kinetických testů, jenž měří rychlostní konstantu reakce mezi reaktanty či procenta vychytávání volných radikálů za jednotku času. Termín je tedy specifický pro jednotlivý antioxidant a oxidant, vyjádřený jako hodnota reakční rychlosti. Naopak antioxidantní kapacitu lze definovat jako účinnost antioxidantů inhibovat oxidační degradaci různých biosloučenin. Měření jsou založena na

reakci mezi jednotlivými antioxidanty a volnými radikály. Antioxidační kapacita je vyjadřována v množství (molech) daného volného radikálu, kterým je vzorkem zachycen [65].

Pro stanovení antioxidační aktivity je k dispozici velké množství testů pro přímé měření přenosu atomu vodíku či elektronu z antioxidantů na volné radikály, jako například spektrometrické, elektrochemické, včetně voltametrie či amperometrie a chromatografické metody, zahrnující HPLC či plynovou chromatografii. Nevýhoda přímého měření je však, že není odrážena situace například v potravině, kosmetickém produktu či *in vivo*. Testy běžně obsahují oxidant (volné radikály či jiné ROS), oxidační substrát a jednotlivé antioxidanty. Antioxidační aktivita může být stanovena také pomocí různých chemických testů. Dle chemických reakcí jsou testy ke stanovení antioxidační aktivity děleny na metody založené na přenosu atomu vodíku (HAT) a na metody založené na přenosu jednoho elektronu (SET), čímž dochází k odstranění volných radikálů. Chemické testy měřící antioxidační aktivitu jsou dostupné, rychlé, typicky automatizované a využívají se především při screeningu a prvotním hodnocení antioxidačních sloučenin či finálních reálných produktů [65].

## 2.3 Vybrané antioxidanty pro kosmetologické aplikace

Bioaktivní sloučeniny rostlinného původu jsou v současné době velmi vyhledávanými aktivními složkami v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, zejména díky jejich bohatému terapeutickému potenciálu, šetrnosti k životnímu prostředí či vhodnosti pro všechny typy pleti. V následující kapitole budou popsány vybrané antioxidanty, které jsou nejčastěji využívány v kosmetologických aplikacích.

### 2.3.1 Kvercetin

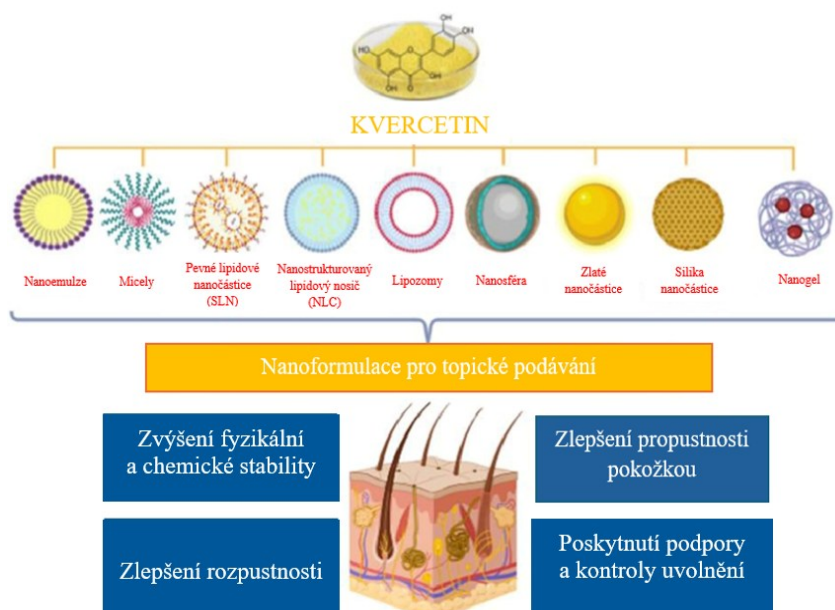
INCI: *Quercetin*

CAS: 117–39–5

Kvercetin patří mezi polyfenolické flavonoidy, konkrétně do třídy flavonolů s hydroxylovou (OH) skupinou v polohách 3, 5, 7, 3' a 4'. Aglykonová forma kvercetinu vykazuje špatnou rozpustnost ve vodě, avšak příznivou rozpustnost v alkoholech či lipidech. Mezitím deriváty kvercetinu, například glykosidy, které mají navázaný cukr jako náhradu jedné z OH skupin, nejčastěji v poloze 3, vykazují rozpustnost ve vodě. Hlavními zdroji kvercetinu jsou zelený čaj, brusinky, jablka, borůvky, cibule, chřest, pohanka, brokolice či

koriandr. Kvercetin vykazuje antioxidační, protizánětlivé, cytoprotektivní, kardio-protektivní, antivirové či antibakteriální účinky. Podobně jako u jiných polyfenolických sloučenin pocházejících z rostlin, protizánětlivý účinek kvercetinu je připisován inhibici produkce cytokinů, jako je tumor nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ ) a prozánětlivých interleukinů (IL). V preklinických a klinických výzkumech byly prokázány příznivé přínosy kvercetinu na kardiovaskulární onemocnění, rakovinu, cukrovku, neurodegenerativní onemocnění, alergická astmata, osteoporózu či poruchy zraku. Z těchto důvodů je kvercetin ve farmakologii využíván také jako nutraceutikum [66], [67].

Kvercetin je v kosmetice využíván především v anti-aging kosmetických přípravcích pro svou pleť zklidňující a protizánětlivou aktivitu s regeneračním účinkem, který stimuluje obnovu poškozené či podrážděné pokožky. Na buněčných modelech, viz studie [68], bylo zjištěno, že kvercetin inhibuje lipopolysacharidem indukovanou expresi TNF- $\alpha$  a IL-8 a produkci zánětlivých enzymů cyklooxygenázy a lipooxygenázy. Dále byla zkoumána také jeho účinnost vůči *P. acnes* způsobující zánět, jenž byl měřen zvýšením prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8. Bylo zjištěno, že kvercetin je schopen výrazně snížit zánět i v relativně nízkých koncentracích. Byla provedena také studie [69], jenž prokázala, že lokální aplikace 1% kvercetinu v krémové matrici podporuje obnovu kožní bariéry a normální hydrataci pokožky po poškození UV zářením či chemikáliemi. Konkrétně za 10–120 minut po lokální léčbě 1% kvercetinem bylo pozorováno významné zlepšení chemicky indukovaného erytému a zánětu na kožních modelech. U poškození kožních modelů způsobeného peroxidem kvercetin byl schopen snižovat akumulaci ROS, zvyšovat přežití buněk a podporovat omlazující buněčnou morfologii. Zatím nejsou známy žádné nežádoucí účinky použití topického kvercetinu, jelikož se jedná o poměrně nově používanou aktivní látku. Dále nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita mezi kvercetinem a jinými aktivními látkami, které jsou běžně využívány v kosmetických přípravcích a kvercetin je pokládán za účinnější antioxidant nežli vitamin E. Klinické využití kvercetinu ve farmakologii či v kosmetice je však omezeno z důvodu jeho špatné rozpustnosti ve vodě, intenzivní žluté barvě, podstatnému metabolismu při průchodu játry, následné nízké biologické dostupnosti či propustnosti pokožkou, což by mohlo být vyřešeno například zakomponováním kvercetinu do nanoformulací, viz Obrázek 6 [70].



Obrázek 6 Zabudování kvercetinu do nanoformulací  
(zdroj:upraveno dle [70])

### 2.3.2 Betakaroten

INCI: *Beta-karotene*

CAS: 7235–40–7

Betakaroten je pigment řadící se mezi karotenoidy, typický svou oranžovou až červenožlutou barvou. Pro lidský organismus je betakaroten esenciální látkou, a tak je nutný jeho příjem v potravě. Betakaroten je obsažen především v ovoci či zelenině, jako například v mrkvi, meruňkách, mangu, broskvích či brokolici, ale je znám jeho obsah také v másle, vaječných žloutcích či v lososu. Betakaroten tvoří významnou část neenzymatických ochranných mechanismů organismu, jelikož vykazuje vysokou antiradikálovou aktivitu a schopnost neutralizovat singletový kyslík. Betakaroten je po konzumaci či lokální aplikaci přeměněn na vitamin A, kdy z jedné molekuly betakarotenu vznikají dvě molekuly vitaminu A. Přeměněný vitamin A poté působí jako přirozený ochranný faktor (SPF), který je schopen chránit imunitní systém před škodlivou aktivitou UVA záření a snižovat tak riziko vzniku rakoviny kůže, a navíc stimulovat proces melanogeneze. V kosmetických aplikacích je betakaroten využíván především pro své antioxidační, fotoprotektivní, anti-agingové, rozjasňující a barvicí schopnosti, s uplatněním v make-upech, pudrových produktech, šamponech, samoopalovacích přípravcích a zejména v přípravcích určených k ochraně pokožky během vystavování slunci či k následné péči [71], [72].

Byl proveden výzkum [73], na buňkách produkující pigment u lidí, kdy bylo zjištěno, že v případě poruch pigmentace, jako jsou změny barvy kůže například po akné, vitiligu či melasmě, je betakaroten schopen bránit vzniku těchto lézí či urychlit proces jejich hojení. Výzkum prokázal, že betakaroten je schopen inhibovat syntézu melaninu prostřednictvím mechanismu blokování aktivity tyrosinázy, enzymu zodpovědného za biosyntézu melaninu. Tato zjištění potvrdila, že betakaroten vykazuje také bělící vlastnosti, což se může zdát poněkud kontroverzní, jelikož je využíván spíše jako látka urychlující opálení. Zjištění také potvrzuje vysokou biologickou dostupnost betakarotenu a jeho vyšší kumulaci v *epidermis*.

### 2.3.3 Koenzym Q10

INCI: *Ubiquinone*

CAS: 303–98–0

Koenzym Q10 znám také jako ubichinon, je chinon žlutooranžové barvy rozpustný v tucích. Ubichinon v chemické struktuře obsahuje izoprenové jednotky. Jejich počet je měněn v závislosti na živočišném druhu, například u lidského organismu se jedná o 10 izoprenových jednotek, odkud pochází číselné označení koenzymu Q10. Jedná se o důležitý neesenciální koenzym, který je přítomen ve všech lidských buňkách, avšak nejvyšší zastoupení je v mozku, játrech, srdci či plicích. Je udáváno, že přibližně od 20. roku života je obsah koenzymu Q10 v lidském organismu snižován. V lidském těle je koenzym Q10 nenahraditelnou sloučeninou, jenž se podílí na fungování mitochondriálního řetězce, kde pomáhá při tvorbě energie za pomoci kyslíku, je spouštěčem enzymů a také vykazuje významnou antioxidační účinnost v lidském těle. Zdravý člověk si dostatečné množství koenzymu Q10 je schopen produkovat z potravy. Vyšší obsah koenzymu Q10 vykazuje hovězí maso, sardinky, makrely, sójový olej či arašídy. V případě nedostatečné produkce koenzymu Q10 vlastním organismem, je možno jej suplementovat v doplňcích stravy [71], [74].

V kosmetickém průmyslu je koenzym Q10 využíván především v anti-aging kosmetice pro své antioxidační schopnosti, podporu správné funkce pokožky, schopnosti urychlovat hojení ekzémů či zánětů, a také napomáhání buňkám při tvorbě kolagenu či elastinu [74]. Provedená studie [75] na poraněných modelech kůže potvrdila, že lokální aplikace kosmetického produktu s obsahem koenzymu Q10, je přínosná s ohledem na efektivní doplnění koenzymu Q10 do pokožky. Aplikace významně zvýšila obsah koenzymu Q10 v horních vrstvách *epidermis*, avšak koenzym Q10 byl kumulován spíše ve vrstvách

hlubších, čímž byla potvrzena účinná suplementace koenzymu Q10 do pokožky. Poraněná kůže po lokální aplikaci kosmetického produktu s obsahem koenzymu Q10 vykazovala také nižší obsah volných radikálů a zvýšení antioxidační kapacity pokožky, čímž byly prokázány také antioxidační vlastnosti koenzymu Q10.

#### 2.3.4 Vitamin E

INCI: *Tocopherol*

CAS: 7616–22–0

Vitamin E neboli tokoferol je žlutá až hnědočervená viskózní olejovitá látka, složená ze čtyř forem tokoferolů a tokotrienolů. Tyto formy poté tvoří osm přirozeně se vyskytujících forem vitaminu E, kdy v přírodních zdrojích jsou nejčastěji přítomny formy alfa-, beta-, gama- či delta-. Mezi zdroje vitaminu E patří například slunečnicový či sójový olej, maso, vejce, mléčné produkty, ořechy či ovoce a zelenina, jako například špenát, chřest, řepa, hořčice, olivy, brusinky, kiwi, maliny, mrkev a další. V kosmetickém průmyslu je vitamin E využíván především pro své silné antioxidační, cytoprotektivní, hydratační či fotoprotektivní vlastnosti. V kosmetických přípravcích, nežli samotný tokoferol jsou využívány spíše jeho estery, jako například tokoferyl acetát, tokoferyl linoleát či tokoferyl sukcínát s využitím v dekorativní, čisticí či pečující kosmetice [39], [40], [71].

Tsourelis-Nikita a kolektiv provedli placebem kontrolovanou studii [76], v níž bylo 96 pacientů s atopickou dermatitidou léčeno perorálním vitaminem E či placebem po dobu 8 měsíců. Bylo zjištěno, že u pacientů, jimž byl podáván vitamin E došlo ke zlepšení a téměř k remisi atopické dermatitidy a 62% poklesu sérových hladin imonoglobulinu E. Ve studii [77] byla hodnocena hydratační kapacita SC použitím vitaminu E v koncentraci 5 % v emulzích voda v oleji (v/o) a olej ve vodě (o/v). Studie prokázala hydratační aktivitu vitaminu E a také lokální aplikací kosmetického produktu s obsahem vitaminu E po dobu 2–4 týdnů byla zlepšena schopnost zadržování vody v pokožce. Ve studii [78] byla také potvrzena účinnost vitaminu E na snížení pigmentace u lézí melasmatu a pigmentové kontaktní dermatitidy. Dále bylo zjištěno, že vitamin E je schopen snižovat zánětlivé reakce kůže, tlumit produkci prostaglandinů či protizánětlivých cytokinů a také je schopen výrazně potlačit degradaci kolagenu inhibicí metaloproteinu 1, jenž se účastní počáteční hydrolýzy kolagenu.

### 2.3.5 Vitamin C

INCI: *Ascorbic acid*

CAS: 50–81–7

Vitamin C neboli kyselina askorbová je ve vodě rozpustná, bílá organická látka, nestabilní například pod UV zářením. Vitamin C není řazen mezi alergen, avšak ve vyšších koncentracích může způsobovat podráždění. Vitamin C je v lidském těle přítomen v redukované formě jako kyselina L-askorbová a v oxidované formě jako L-dehydroaskorbová kyselina. Kromě antioxidační aktivity plní v těle také mnoho biologických funkcí, jako je například přeměna železa na formu snadno vstřebatelnou do střev, syntéza některých neurotransmiterů zapojených do signalizace pocitových myšlenek a příkazů v celém mozku a nervovém systému či je nezbytnou součástí syntézy kolagenu a serotoninu. Vitamin C je také schopen hojit světlé střípy či narušené tkáně. Potravinovým zdrojem vitamínu C jsou brokolice, jahody, ananas, citrusy, rajčata a další. Vitamin C neboli kyselina askorbová patří k nejčastěji používaným doplňkům stravy [39], [40], [71].

V kosmetickém průmyslu je vitamin C hojně vyhledávanou kosmetickou surovinou, především pro své silné antioxidační, fotoprotektivní, zjemňující, regenerační, sjednocující, prozánětlivé či lehce exfoliační účinky. Do kosmetických přípravků může být přidáván také za účelem stabilizace pH produktů. Průkopníkem zabývajícím se studiem vitamínu C a patologií spojených s jeho nedostatkem byl Dr. James Lind ve svém „Pojednávání o kurdějích“ v roce 1753. Od této doby se počet výzkumů zaměřených na tuto problematiku výrazně zvýšil a bylo prokázáno, že nedostatek vitamínu C může být příčinou různých kožních poruch či abnormalit [39], [71].

Perorální suplementace vitamínu C pro zvýšení jeho koncentrace v pokožce je téměř neúčinná z důvodu omezení střevními transportními mechanismy. Lokální aplikace však přináší také problémy spojené s nestabilitou a hydrofilní povahou aktivní formy kyseliny L-askorbové vůči hydrofobní povaze SC. Pro dobrou penetraci vitamínu C do *epidermis* by optimální pH přípravku mělo vykazovat hodnotu nižší než 3,5; čehož může být dosaženo přidáním kyseliny ferulové, která zároveň působí jako stabilizátor kyseliny L-askorbové. Řešením penetrace vitamínu C do pokožky by mohlo být zapouzdření vitamínu C, formulace s nízkým pH, přidání elektrolytů či dalších antioxidantů či zakomponování vitamínu C do nanočástic. Optimální koncentrace vitamínu C v kosmetických produktech by měla být vyšší než 8 % a nižší než 20 %, jelikož vyšší

koncentrace mohou vykazovat dráždivé účinky na pokožku. V kosmetickém průmyslu jsou v dnešní době také hojně využívány deriváty vitaminu C, jako například L-askorbyl-6-palmitát, askorbyl fosfát hořečnatý, askorbyl fosfát sodný, z důvodu jejich snadnějšího zakomponování do kosmetických formulací a vyšší stability [79].

### 2.3.6 Vitamin A

INCI: *Retinol*

CAS: 11103–57–4

Vitamin A známý také jako retinol, hraje důležitou roli při růstu a vývoji buněk a je nezbytný pro správné fungování zraku. Provitamin A je obsažen v batátech, mrkvi, špenátu, bazalce, melounu a dalších. Zatímco takzvaný předpřipravený vitamin A obsahují především živočišné výrobky, například vejce, jogurty, sýry, poté krevety, losos, sardinky a kuřecí, krůtí, hovězí či jehněčí maso [38], [39], [40]. Vitamin A není zahrnován mezi populární antioxidanty, avšak některé studie naznačují, že může být užitečný při ochraně těla před poškozením oxidačním stresem [80]. Například studie [81] uvádí, že retinol by mohl zvyšovat aktivitu enzymatických antioxidantů v lidském těle.

Dle nařízení komise (EU) 2024/996 ze dne 3. dubna 2024, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, pokud jde o používání látek vitaminu A, Alpha-Arbutin a Arbutin a některých látek s vlastnostmi, které potenciálně narušují činnost žláz z vnitřní sekrecí, v kosmetických přípravcích [82], bylo oznámeno, že látky, jimž dle Mezinárodní nomenklatury kosmetických přísad (INCI) byly přiděleny názvy *Retinol*, *Retinyl Acetate* a *Retinyl Palmitate*, a které jsou společně známy jako vitamin A, nejsou nařízením (ES) č. 1223/2009 upraveny. Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (VVBS) dospěl ve stanovisku z roku 2016 k závěru, že vitamin A je bezpečný pro používání, ale uznal, že celková expozice obyvatelstva vitaminu A by mohla překročit horní hranici příjmu stanovenou Evropským úřadem pro bezpečnost potravin. V roce 2022 přijal VVBS revidované stanovisko k vitaminu A, v němž dospěl k závěru, že vitamin A je bezpečný v kosmetických přípravcích do koncentrací 0,05 % ekvivalentu retinolu v tělovém mléce a 0,3 % retinolu v jiných oplachových či bezoplachových přípravcích. Vzhledem ke stanovisku VVBS bylo usneseno, že používání vitaminu A v kosmetických přípravcích sebou nese určité riziko pro lidské zdraví, pokud by jeho koncentrace překročila dané úrovně. Také by mělo být připojeno upozornění, jímž budou spotřebitelé, kteří jsou již

vystavení vitamínu A z potravin či doplňků stravy, informování o možné nadměrné expozici při používání kosmetických přípravků obsahujících vitamin A.

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době je na trhu dostupná široká škála kosmetických přípravků pro zralou pleť s inkorporovanými inovativními aktivními látkami podporujícími účinek nejen proti chronologickému stárnutí, ale i proti vnějším vlivům jako je především ochrana před environmentálním stresem. Rostoucí globální podíl starší populace spolu s technologickým pokrokem v kosmetickém průmyslu sehrávají pro vývoj tohoto kosmetického portfolia klíčovou úlohu [83].

Z uvedených důvodů bylo během posledního desetiletí vyvinuto značné množství technik pro přípravu systémů s antioxidační aktivitou. Bohužel problémem přírodních antioxidantů je jejich hydrofobní povaha, která zapříčiňuje jejich špatnou rozpustnost ve vodě. Díky pokrokům v technologiích, největší rozmach možnosti přípravy systémů s antioxidanty zaznamenala enkapsulace. Enkapsulace neboli zapouzdření výrazně přispívá k lepší rozpustnosti, chemické a fyzikální stabilitě, biokompatibilitě, absorpci kůže a dermokosmetické účinnosti při lokální topické aplikaci systémů obsahujících antioxidanty. V komerčních produktech s enkapsulovanými antioxidanty uvedenými na trh jsou využívány především čtyři typy nosičů pro dermokosmetické dodávání rostlinných složek, a to vezikulární, částicové, emulzní a vláknité systémy [64].

Kroky vedoucí ke zlepšení rozpustnosti antioxidantů a možnostmi dodávání účinných látek se zabývá řada studií [64], [70]. Mezi nejčastěji zkoumané látky patří již zmiňovaný kvercetin. Bylo prokázáno, že kvercetin, podobně jako ostatní flavonoidy, má řadu příznivých účinků na lidskou pokožku, které mohou inhibovat oxidační stres a zánětlivé procesy, předcházet rakovině a zpomalovat stárnutí kůže [84], [85]. Začleněním kvercetinu do formulací jsou uvedené dysfunkce potlačovány a nabízí se hned několik možností pro využití kvercetinu v kosmetických produktech. Bylo zjištěno, že například nosný systém tvořen nanokrystaly se zakomponovaným kvercetinem vykazoval povrchovou depozici kvercetinu na kůži, což může být ideální pro přípravky na ochranu proti slunečnímu záření. Systémy obsahující fosfolipidy, jako jsou lipozomy, SLN či NLC byly popsány jako účinné zesilovače prostupu kvercetinu kůží prostřednictvím mechanismu hydratace či okluze pokožky. U kosmetických přípravků je důležité, aby účinné látky zůstaly v pokožce, dostatečně penetrovaly [64], [83], [86]. Penetrační studie [87], [88], [89], [90] prováděné s léčivy ve farmaceutických dermálních přípravcích odhalily, že stupeň penetrace závisí na složení formulace. Další faktory ovlivňující stupeň penetrace jsou filmotvorné vlastnosti ovlivňující míru hydratace kůže, ale také interakce systému lipidů a povrchově aktivních

látek s kožními lipidy. Zakomponováním kvercetinu do systémů obsahující fosfolipidy docházelo ke zvýšení antioxidační aktivity, také bylo uvedeno, že přítomnost ethanolu, v systému na bázi fosfolipidů, přispívá ke zvýšení transdermálního dodávání kvercetinu [64], [83], [86]. Ve studii [87] bylo naopak zjištěno, že použití lipozomu obsahujícího glycerol umožňuje ukládání kvercetinu do hlubších vrstev kůže, z důvodu vyvolání konformační změny struktury kutikuly glycerolem. Rychlý vývoj rezistence mikroorganismů, také zintenzivnil zájem o nové antimikrobiální látky. Ve studii [88] Milanezi a kol. byly syntetizovány zlaté nanočástice s kvercetinem a byla vyhodnocena jejich antimikrobiální aktivita. Zlaté nanočástice s kvercetinem vykazovaly výrazně vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s volným kvercetinem, což potvrzuje potenciální využití nanočástic také jako antimikrobiálních látek. Amer a kol. [89] ve své studii vyvinuli kvercetinem nabité nanovezikuly (aspasomy) a analyzovali jejich účinek na akné. Připravené aspasomy s kvercetinem měly vhodnou velikost v rámci nanoměrů (125–184 nm), negativní náboj s dobrou stabilitou při skladování a také vykazovaly vysokou míru ukládání v kůži. Navíc byla zachována antioxidační aktivita kvercetinu a účinek proti *P. acnes* byl mnohonásobně vyšší nežli v případě volného kvercetinu. Choudhary a kol. [90] vyvinuli kvercetinem naplněné chitosanové nanočástice pro aplikace na hojení ran. Nanočástice s 0,03% obsahem kvercetinu byly aplikovány na chirurgicky připravenou ránu, přičemž bylo prokázáno, že ošetřená tkáň nanočásticemi s kvercetinem vykazovala více krevních cév, méně zánětlivých buněk, lepší hustotu kolagenních vláken a novou epitelizaci tkáně.

Několik studií [91], [92], [93] publikovalo zajímavé výsledky o zakomponování vitaminů do různých nosičů pro jejich lokální aplikaci, zlepšení jejich stability při skladování, biologické dostupnosti, dodávání do vrstev kůže a kosmetické účinnosti. Například kosmetické využití vitamínu C je omezeno z důvodu jeho nízké rozpustnosti v tucích, spojené s nízkou dermální vstřebatelností. Lipozomy, mikrokapsle a chitosanem naroubované celulózové nanokrystaly se jeví jako slibné dodávací systémy ke stabilizaci vitamínu C pro kosmetické dermální aplikace. Jako účinné dodávací systémy s řízeným uvolňováním do kůže byly popsány také lipidové nosiče jako lipozomy, nanočástice či nanoemulze. Z uvedených nosičů prokázaly lipidové nanočástice SLN a NLC výhody pro transdermální podávání díky své vysoké kompatibilitě s kožními lipidy a účinkům, které zvýšily dermální biologickou dostupnost. Ve spojitosti s vitaminy se stala v současné době populární také příprava nanonosičů s použitím rostlinných olejů. Byl popsán NLC nasycený vitamínem A či E, v přítomnosti oleje ze semen kaktusu. Přítomnost oleje zamezila

krystalizaci lipidů, což zvýšilo účinnost enkapsulace, uvolňování *in vitro* a ukládání vitamínu v kůži. Nanoemulze s využitím vitamínu E jako olejové fáze by mohla poskytnout také možnost vývoje vodných formulací přírodních lipofilních látek pro topickou aplikaci.

Zatímco vědecké zprávy o inovativních nosičích a enkapsulačních technikách pro vylepšené dermokosmetické dodávání antioxidačních rostlinných látek jsou slibné a rostou, pro jejich komercializaci a klinické využití je potřeba ještě vyřešit několik úskalí. Především mechanismy těchto zlepšených kosmetických vlastností a perkutánní absorpce nejsou stále zcela jasné. Dále jsou známa také technická omezení jako je složitá či drahá průmyslová výroba ve velkém měřítku či nedostatečné studie o biologické dostupnosti *in vivo* a neúplné toxikologické informace o enkapsulovaných látkách, zejména s odkazem na systémy obsahující nanočástice či povrchově aktivní látky. Z těchto důvodů jsou nutné další výzkumy, aby bylo možno získat ucelené informace o tom, jak nosiče interagují s lidským organismem a kůží, dále rozvíjet technologie výroby a zpracování a zkoumat metody, jež jsou schopny předpovídat klinickou bezpečnost a účinnost nosičů [64].

## 4 CÍLE PRÁCE

Primární cíl:

- Zjistit vliv látek s antioxidační aktivitou na účinnost modelových antia-aging kosmetických formulací na zralou pleť.

Sekundární cíl:

- Připravit nosič pro enkapsulaci a enkapsulovat vybraný antioxidant.
- Charakterizovat fyzikálně-chemické a antioxidační vlastnosti enkapsulovaného antioxidantu.
- Navrhnout a připravit anti-aging kosmetické matrice s inkorporovaným vybraným antioxidantem a směsí dalších účinných látek.
- Charakterizovat mikrobiologické, stabilitní, antioxidační a organoleptické vlastnosti formulací.
- Ověřit biofyzikální parametry a anti-aging efekt formulací *in vivo* pomocí neinvazivních bioinženýrských diagnostických metod doplněných snímáním replik kožního reliéfu.
- Provést test uvolňování vybraného antioxidantu z kosmetické matrice.

Hypotézy

- Inkorporace vybraných antioxidantů do kosmetické matrice významně ovlivňuje stabilitní a organoleptické vlastnosti formulace.
- Aplikace kosmetické matrice s antioxidačními ingrediencemi ovlivňuje fyziologické parametry pokožky (hydratace, TEWL, pH, elasticitu) a kožní mikrorelief.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 METODIKA PRÁCE

### 5.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

Chemikálie pro enkapsulaci vybraného antioxidantu do nosiče:

- Pluronic 407 (Sigma, USA)
- Fosfatidylcholin (Millipore, Indie)
- *Quercetin* (Roth, Německo)
- Ethanol 96 % (VWR International s.r.o., Francie)
- Destilovaná voda (Fakulta technologická UTB, Česká republika, vlastní výroba)

Přístroje a pomůcky pro enkapsulaci vybraného antioxidantu do nosiče:

- Analytické váhy Nimbus (Adam Equipment, Velká Británie)
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, kovové lžičky)
- Magnetické míchadlo Heidolph Instruments MR 1000
- Vakuová odparka Hei-VAP Advantage s membránovou vývěvou bezolejovou PC20
- Ultrazvuková lázeň KAITEK K-10LE

Chemikálie pro přípravu krémových formulací:

- *Aqua* (Fakulta technologická UTB, Česká republika, vlastní výroba)
- *Glycerin* (Kosuro, Česká republika)
- *Panthenol* (FICEHEMA s.r.o., Česká republika)
- *Carbomer* (M+H, Míča a Harašta s.r.o., Česká republika)
- *Fructose* (Lachema a.s., Česká republika)
- *Dermosoft®* 1388 ECO (Ekokoza, Česká republika)
- *Isopropyl Myristate* (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- *Mangifera Indica Seed Butter* (BEWIT, Česká republika)
- *Olivoil Avenate Emulsifier®* (Kosuro, Česká republika)
- *Cera Alba* (BEWIT, Česká republika)

- *Simmondsia Chinensis Oil* (BEWIT, Česká republika)
- *Prunus dulcis Oil* (BEWIT, Česká republika)
- *Cocos nucifera* (BEWIT, Česká republika)
- *Oryza Sativa Bran Cera* (BEWIT, Česká republika)
- *Ubiquinone* (FICEHEMA s.r.o., Česká republika)
- *Tocopherol* (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- *Quercetin* (Roth, Německo)
- *Cucumis Sativus Fruit extract* (Ekokoza, Česká republika)
- *Aloe barbadensis Leaf extract* (Ekokoza, Česká republika)

Přístroje a pomůcky pro přípravu krémových formulací:

- Analytické váhy Nimbus (Adam Equipment, Velká Británie)
- Laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, odměrné válce, Petriho misky, Pasteurovy pipety, hrnec, kovové lžičky, misky a metličky)
- Indukční vařič PHCP 1620 (Philco, USA)
- pH metr PH60S-Z (Apera Instruments, USA)
- Skleněný teploměr

Chemikálie pro mikrobiologické testy:

- Agarové půdy – PCA, ChYGA, PA, TYA (HiMedia Laboratories, Indie)
- Fyziologický roztok, 0,9% NaCl (Lachner s.r.o., Česká republika)
- Ethanol 96 % (VWR International s. r. o., Francie)

Přístroje a pomůcky pro mikrobiologické testy:

- Laboratorní sklo a pomůcky (mikrozkušavky Eppendorf, sterilní kalíšky, kovové lžičky, skleněné hokejky, špičky pro automatické pipety, kovové kličky)
- Analytické váhy SBC 32 (Scaltec, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Biohazard box Euroflow (Schoeller Instrumental s.r.o., Česká republika)

- Inkubátor INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., USA)
- Spiral plater Eddy Jet 2W (IUL SA, Španělsko)
- Automatické počítadlo SphereFlash (IUL SA, Španělsko)
- Laboratorní optický mikroskop (NINGBO HAISHU HONYU, Čína)

Přístroje a pomůcky pro stabilitní testy:

- Laboratorní pomůcky (kovové lžičky, dřevěné či plastové špachtle)
- Inkubátory INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Rotační viskozimetr Brookfield DV-III ultra (Helago-CZ s.r.o., Česká republika)
- pH metr PH60S-Z (Apera Instruments, USA)
- Texturometr TA1 (AMETEK Inc., USA)
- Počítačový software NEXYGENPlus 4.0 (AMETEK Inc., USA)
- Kolorimetr UltraScan VIS a příslušný počítačový software (HunterLab, USA)

Chemikálie, přístroje a pomůcky pro testování účinnosti *in vivo*:

- Destilovaná voda (Fakulta technologická UTB, Česká republika, vlastní výroba)
- Micelární voda (Ellie, Česká republika)
- Dvousložkový silikon (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, buničina)
- Materiál pro přípravu replik (transparentní krycí fólie, papírové rámečky, plastové kalíšky a tyčinky)
- Stanice MPA 10 se sondami: Korneometr® CM 825, Tewametr® TM 300, pH metr® 905, Reviskometr® RVM 600
- Visioskop® PC 35 (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Počítačový software Complete Skin Investigation (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Visiometr® SV 700 s vakuovou pumpou VP 45 s ručním míchacím zařízením a mechanickým pedálem (Courage & Khazaka, Německo)

- Korneofix CF 20 (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)

Chemikálie, přístroje a pomůcky pro stanovení antioxidační aktivity formulací:

- DPPH (Aldrich, Německo)
- Ethanol 96 % (VWR International s.r.o., Francie)
- Laboratorní pomůcky (kovové lžičky, injekční plastové stříkačky, kádinky, odměrné baňky, skleněné vialky)
- Filtr CA 1,2 a 0,45  $\mu\text{m}$ , Millex®GS (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- UV-VIS spektrofotometr V-750 (JASCO, Japonsko)

Chemikálie, přístroje a pomůcky pro test uvolňování aktivních látek:

- PBS pufr (Fakulta technologická UTB, Česká republika, vlastní výroba)
- Laboratorní pomůcky (kovové lžičky, injekční plastové stříkačky, skleněné uzavíratelné láhve, mikrozkuhavky Eppendorf)
- Dialyzační membrána MWCO: 12-14 kD, Spectra Por (P-LAB, Česká republika)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Inkubátor INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Třepačka Digital orbital shaker (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- UV-VIS spektrofotometr V-750 (JASCO, Japonsko)

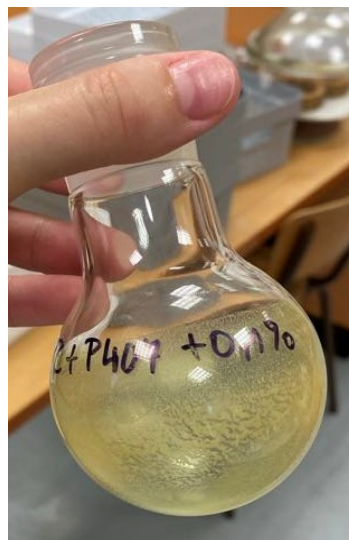
## 5.2 Enkapsulace kvercetinu do nosiče

Dle metodiky práce Matoškové [94] byl nejprve připraven nosný systém navážením 100 mg fosfatidylcholinu (PC) a 10 mg Pluronicu 407 (P407). Do navážky nosného systému byl na objem přidávaného ethanolu, jenž činil 20 ml, přidán kvercetin v množství 0,1 hmotnostních %. Směs kvercetinu s nosným systémem a přidáním ethanolu byla homogenizována na magnetickém míchadle po dobu 20 minut, poté byla baňka vložena do kádinky s vodou a dále homogenizována v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut při 35 °C do kompletního rozpuštění, z důvodu horší rozpustnosti PC na magnetickém míchadle.

Z homogenizované směsi bylo následně odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce Heidolph se zpětným chladičem při 40 °C a 50 rpm, viz Obrázek 7. Po odpaření rozpouštědla byl na spodní části baňky vytvořen tenký film, viz Obrázek 8. Baňka s vytvořeným tenkým filmem byla vložena na 24 hodin do tmy, z důvodu odpaření možného zbytkového rozpouštědla.



Obrázek 7 Vakuová odparka se vzorkem  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 8 Vytvořený tenký film  
(zdroj: vlastní)

Po 24 hodinách bylo do baňky přidáno 10 ml destilované vody, baňka byla vložena do kádinky s vodou a směs byla dispergována v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut při 35 °C. Po úplné dispergaci směsi byly vzorky převedeny do vialek, viz Obrázek 9, a uchovávány v lednici. Tento pracovní postup byl obdobně opakován pro zajištění dostatečného množství enkapsulovaného kvercetinu pro další využití.



Obrázek 9 Připravené vzorky enkapsulovaného kvercetinu  
(zdroj: vlastní)

### 5.2.1 Charakterizace nosiče s enkapsulovaným kvercetinem

Dle metodiky práce Matoškové [94], byl enkapsulovaný antioxidant charakterizován zeta potenciálem, velikostí částic a antioxidační aktivitou.

Měření zeta potenciálu a velikosti částic probíhalo při teplotě  $25 \pm 2$  °C na přístroji Zetasizer Nano series. K měření zeta potenciálu bylo do kyvety napipetováno 6 µl vzorku 0,1 % enkapsulovaného kvercetinu a 3 ml dvakrát filtrované destilované vody, připravené pomocí stříkačkového filtru VWR s velikostí pórů 0,2 µl. Velikosti částic byla měřena napipetováním 0,5 ml 0,1 % vzorku enkapsulovaného kvercetinu do kyvety společně se 3 ml dvakrát filtrované vody, připravované obdobným postupem. Výsledné hodnoty byly stanoveny průměrem ze tří měření.

Antioxidační aktivita 0,1% enkapsulovaného kvercetinu byla stanovena s použitím 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Do skleněných vialek bylo napipetováno 200 µl 0,1 % vzorku kvercetinu společně s 2 ml 0,1 mM roztoku DPPH, připravovaným v 96% ethanolu. Připravený vzorek ve vialce byl následně ponechán po dobu 30 minut ve tmě, při 25 °C. Po uplynutí doby inkubace byla stanovena absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Jako reference byl použit 96% ethanol, využitý při přípravě 0,1 mM roztoku DPPH. Antioxidační aktivita byla následně stanovena, viz vztah pro výpočet (1), jako úbytek absorbance v %. Měření bylo prováděno dvakrát vedle sebe, výsledná hodnota byla vypočtena průměrem.

$$AA = \frac{A_{DPPH} - A_{vzorek}}{A_{DPPH}} \times 100 [\%] \quad (1)$$

Kde:

AA – antioxidační aktivita [%],

$A_{DPPH}$  – absorbance 0,1 mM DPPH,

$A_{vzorek}$  – absorbance vzorku.

## 5.3 Příprava formulací

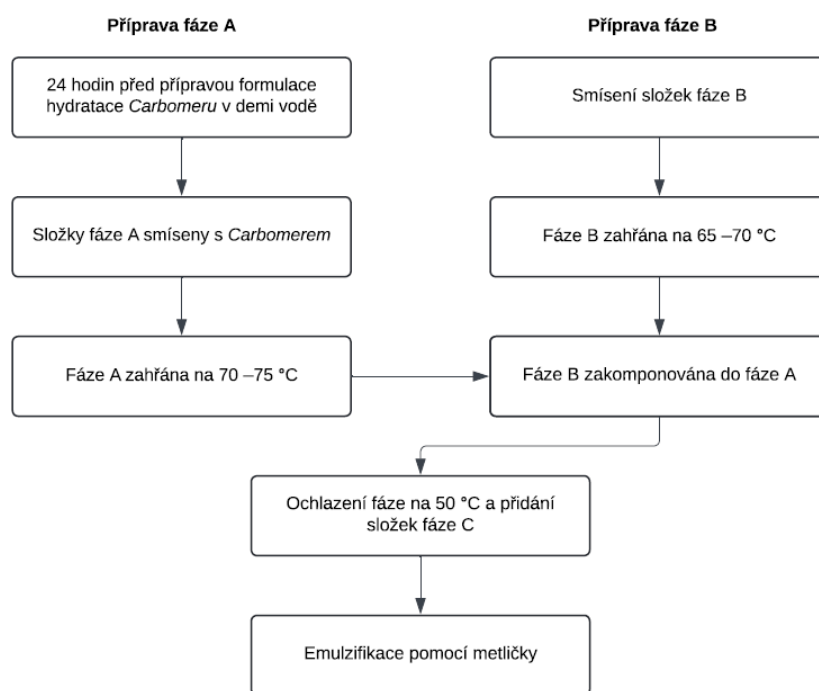
V rámci diplomové práce byly připravovány základní formulace bez zakomponovaného kvercetinu (ZF), formulace s enkapsulovaným kvercetinem (EF) a formulace s neenkapsulovaným kvercetinem (NF), dle složení uvedeného v Tabulce 1. Do formulace EF byl zakomponován nosič s enkapsulovaným 0,1 % kvercetinem v obsahu 5 %. Množství kvercetinu při obsahu připraveného 5% nosiče ve odpovídalo 0,005 % kvercetinu ve

formulaci. Do formulace NF bylo zakomponováno obdobně 0,005 % kvercetinu, přidáním 0,0025 g volného práškového kvercetinu. Celkově pro následovné testování bylo připraveno téměř 2500 g krémových formulací.

Tabulka 1 Složení krémových formulací

| Fáze | Ingredience                                                                                                                                                        | Funkce                             | [%]    |        |        |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|
|      |                                                                                                                                                                    |                                    | ZF     | EF     | NF     |
| A    | <i>Aqua</i>                                                                                                                                                        | vodná báze                         | do 100 | do 100 | do 100 |
|      | <i>Glycerin</i>                                                                                                                                                    | hydratační, změkčující látka       | 3      | 3      | 3      |
|      | <i>Panthenol</i>                                                                                                                                                   | hydratační látka                   | 2      | 2      | 2      |
|      | <i>Carbomer</i>                                                                                                                                                    | modifikátor viskozity              | 0,15   | 0,15   | 0,15   |
|      | <i>Fructose</i>                                                                                                                                                    | hydratační, exfoliační látka       | 0,50   | 0,50   | 0,50   |
|      | Dermosoft®1388 ECO<br>( <i>Glycerin, Aqua, Sodium Levulinate, Sodium Anisate</i> )                                                                                 | konzervant                         | 3      | 3      | 3      |
| B    | <i>Isopropyl Myristate</i>                                                                                                                                         | hydratační látka                   | 2,5    | 2,5    | 2,5    |
|      | Olivoil Avenate<br>emulsifier®<br>( <i>Potassium Olivoyl Hydrolysed Avena Protein, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Oleate, Glyceryl Stearate, Potassium Hydroxide</i> ) | emulgátor                          | 7      | 7      | 7      |
|      | <i>Cera Alba</i>                                                                                                                                                   | hydratační látka                   | 2      | 2      | 2      |
|      | <i>Oryza Sativa Bran Cera</i>                                                                                                                                      | změkčující látka                   | 0,1    | 0,1    | 0,1    |
|      | <i>Simmondsia Chinensis Oil</i>                                                                                                                                    | hydratační, vyhlazující, SPF látka | 4      | 4      | 4      |
|      | <i>Prunus Dulcis Oil</i>                                                                                                                                           | antioxidační, zjemňující látka     | 4      | 4      | 4      |
|      | <i>Cocos Nucifera Oil</i>                                                                                                                                          | antioxidační, zjemňující látka     | 2,5    | 2,5    | 2,5    |
|      | <i>Mangifera Indica Seed Butter</i>                                                                                                                                | hydratační látka                   | 2,5    | 2,5    | 2,5    |
| C    | <i>Cucumis Sativus Fruit Extract</i>                                                                                                                               | zklidňující, hydratační látka      | 3      | 3      | 3      |
|      | <i>Aloe Barbadensis Leaf Extract</i>                                                                                                                               | hydratační, antioxidační látka     | 2      | 2      | 2      |
|      | <i>Ubiquinone</i>                                                                                                                                                  | antioxidační látka                 | 0,2    | 0,2    | 0,2    |
|      | <i>Tocopherol</i>                                                                                                                                                  | antioxidační látka                 | 0,5    | 0,5    | 0,5    |
|      | Nosič s <i>Quercetinem</i>                                                                                                                                         | antioxidační látka                 | –      | 5      | –      |
|      | <i>Quercetin</i>                                                                                                                                                   | antioxidační látka                 | –      | –      | 0,005  |

Krémové formulace byly připravovány postupem uvedeným na Obrázku 10. Před přípravou formulací byla potřeba, po dobu 24 hodin, hydratovat *Carbomer* ve 2/3 množství destilované vody. Následující den byl nabobtnalý *Carbomer* smísen s dalšími složkami vodné fáze A, která byla poté zahřívána na 70–75 °C. Současně byly homogenizovány složky tukové fáze B, jenž byla zahřívána na 65–70 °C. Vzhledem k využívanému emulgátoru byla následně do zahřáté tukové fáze B pomalu přidávána vodná fáze A. Po ochlazení smísených fází A a B na cca 50 °C byla do směsi přidána fáze bez ohřevu C a následovala emulzifikace pomocí kovové metličky. Po emulzifikaci bylo kontrolně provedeno měření pH, jenž se u všech formulací pohybovalo nad hodnotou 5.



Obrázek 10 Schéma přípravy krémových formulací  
(zdroj: vlastní)

## 5.4 Mikrobiologické testy

Z důvodu testování krémových formulací *in vivo* bylo nejdříve potřeba otestovat krémové formulace na mikrobiologickou čistotu. Současně byla hodnocena také dlouhodobá účinnost použitého konzervantu v krémových formulacích, z důvodu možné mikrobiální kontaminace během testování či při běžném používání spotřebitelem.

#### 5.4.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísni

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů v krémových formulacích byl připraven 0,9% roztok NaCl (fyziologický roztok) a agarové půdy Plate Count Agar (PCA) a Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (ChYGA), dle návodu výrobce Himedia Laboratories (Indie).

Ihned po výrobě krémových formulací bylo do sterilní plastové mikrozkušavky Eppendorf odváženo 0,1 g krémové formulace, ke které bylo přidáno 900  $\mu$ l sterilního fyziologického roztoku. Následně bylo provedeno protřepání obsahu mikrozkušavky po dobu 4 minut na třepačce Vortex při 3000 rpm, viz Obrázek 11. Ze vzniklé suspenze bylo 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l naočkováno pomocí skleněné sterilní hokejky na Petriho misku s příslušnou agarovou půdou. Suspenze byla dále v desítkovém ředění pomocí Spiral Plateru (Obrázek 12) naočkováána na Petriho misku s příslušnou agarovou půdou. Postup byl obdobně proveden pro všechny připravené krémové formulace. Každá formulace byla pomocí hokejky či Spiral Plateru naočkováána na PCA agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a ChYGA agar pro stanovení kvasinek a plísni. Kultivace PCA agarů probíhala po dobu 48 hodin při 30 °C a ChYGA agary byly kultivovány po dobu 5 dnů při 25 °C. Po uplynutí inkubace byly kolonie na agarových půdách spočítány pomocí automatického počítadla, viz Obrázek 13, a vyjádřeny v jednotkách CFU/g.



Obrázek 11 Vortex  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 12 Spiral Plater  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 13 Automatické  
počítadlo kolonií  
(zdroj: vlastní)

#### 5.4.2 Stanovení *Pseudomonas aeruginosa*

Pro stanovení přítomnosti *P. aeruginosa* a testování jeho přežívání byly nejprve připraveny agarové půdy *Pseudomonas* Agar (PA) a Tryptone Yeast Extract Agar (TYA), obdobně dle návodu výrobce Himedia Laboratories (Indie).

Na Petriho misky s PA agarem bylo pomocí přístroje Spiral Plater naočkovááno 50  $\mu$ l suspenze v ředění  $10^{-2}$ , viz příprava uvedena v kapitole 5.4.1. Postup byl opětovně proveden

pro všechny připravené vzorky krémů. Kultivační podmínky pro PA misky byly 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí kultivační doby byly agarové půdy vyhodnoceny.

#### 5.4.3 Test přežívání *Pseudomonas aeruginosa*

Pro test přežívání dle normy ISO 11930:2019 [95] bylo připraveno inokulum *P. aeruginosa* ATCC 27853 o koncentraci  $6,60 \times 10^7$  CFU/ml. Inokulum bylo následně v objemu 50 µl přidáno k 5 g krémových formulací ve skleněných zkumavkách a důkladně asepticky promícháno. Ihned po inokulaci bylo odebráno 0,1 g krémové formulace, které bylo přeneseno do plastové mikrozkušavky Eppendorf. Následně bylo přidáno 900 µl fyziologického roztoku a směs byla homogenizována na třepačce Vortex po dobu 4 minut při 3000 rpm (ředění  $10^{-1}$ ). Z připravené suspenze bylo 100 µl naočkováno pomocí sterilní hokejky na TYA agary. Následně byla suspenze dále ředěna desítkovým ředěním a v objemu 50 µl naočkována pomocí Spiral Plateru na Petriho misky s TYA agarem. Stejný postup byl proveden pro všechny připravené krémové formulace. Kultivace TYA agarů probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí kultivační doby byly agarové půdy hodnoceny a bylo provedeno počítání kolonií pomocí automatického počítadla. Zkušavky s krémovými formulacemi byly dále uchovávány při pokojové teplotě pro potřeby opakovaného měření. Měření bylo analogickým způsobem prováděno po 7, 14 a 28 dnech.

### 5.5 Stabilitní testy

Krémové formulace byly testovány také v rámci své tepelné stability, z důvodu jejich dlouhodobé skladovatelnosti či dalšího testování. Stabilitní testy byly prováděny při teplotách 4, 25, 37, 47 a 55 °C po dobu 28 dnů, měřeny ve třech časových intervalech (v čase 0, po 14 a 28 dnech). V rámci stabilitních testů byla sledována změna organoleptických vlastností, pH, viskozity či textury jednotlivých formulací. Formulace uchovávány v termostatu při vyšších teplotách byly před hodnocením a měřením uvedených vlastností a změn temperovány na pokojovou teplotu 25 °C.

#### 5.5.1 Posuzování organoleptických vlastností

Posuzování změny organoleptických vlastností jednotlivých formulací zahrnovalo vizuální hodnocení vzhledu krémů, především separaci vodné a olejové fáze a změnu barvy měřenou pomocí kolorimetru UltraScan VIS s příslušným počítačovým softwarem, v trojrozměrném prostoru CIE L\* a\* b\*. Formulace byly dávkovány po okraj neprůhledných formiček pomocí kovové lžičky. Před samotným měřením byla provedena kalibrace přístroje na černé a bílé

pozadí. Výsledné hodnoty souřadnic byly získány na základě změny intenzity procházejícího paprsku jednotlivými formulacemi, výpočtem průměru ze 3 měření.

### 5.5.2 Měření pH

Důležitý faktor pro následné hodnocení formulací *in vivo* – pH bylo měřeno vpichovým pH metrem PH60S-Z. Měření pH probíhalo, při pokojové teplotě, vložením měřicí špičky pH metru do jednotlivých formulací a následným odečtením hodnoty po ustálení. Mezi jednotlivým měřením byla špička pH metru vždy očištěna pomocí papírového ubrousku a demineralizované vody. Pro každý vzorek formulace bylo naměřeno 5 hodnot za uvedený časový interval; výsledná hodnota byla následně vypočtena průměrem.

### 5.5.3 Měření viskozity

Změna viskozity jednotlivých formulací byla hodnocena metodou dle Brookfielda, rotačním viskozimetrem Brookfield DV-III ultra. Pro měření viskozity formulací bylo důležité zvolení správného spindlu a otáček, jenž se odvíjelo od výsledného točivého momentu. Hodnoty byly odečítány při dosažení točivého momentu v okolí 85 %. Byl použit spindl 4, vhodný pro měření viskozity vzorků do 20 000 mPa/s, a otáčky o velikosti 50 rpm. Měření viskozity formulací probíhalo při pokojové teplotě vložením spindlu do formulace po vyznačenou rysku a následným spuštěním měření na ovládacím panelu viskozimetru. Mezi měřeními formulací byl spindl vždy očištěn papírovým ubrouskem a bylo měřeno 5 hodnot; výsledná hodnota za jednotlivá měření byla vypočtena průměrem.

### 5.5.4 Instrumentální měření texturních vlastností

Změny v textuře jednotlivých formulací byly měřeny pomocí texturometru typu TA1 penetrometrickou metodou pro polotuhé matrice, v režimu měření komprese v jednom měřicím cyklu. Texturometr typu TA1 simuluje působení lidského prstu při roztírání krémové formulace, současně s měřením texturních vlastností. Měření probíhalo ve skleněné kónické nádobce upevněné ve stolku, s kompatibilní kónickou sondou s úhlem kužele 90°, upevněné k analyzátoru texturometru. K vyhodnocení naměřených hodnot byl využit počítačový software NEXYGEN Plus.

Jednotlivé formulace byly dávkovány do skleněné nádobky pomocí kovové lžičky, po povrch nádobky, jenž byl zarovnan pomocí dřevěné špachtle. Takto připravená nádobka byla upevněna do kovového upínacího stolku a měřicím ramenem texturometru byla nastavena vzdálenost mezi sondou a nádobkou asi na 5 mm. Následně bylo spuštěno měření sondy

rychlostí 50 mm/min a silou 10 N k průniku do formulace. K měření následující formulace byla kónická nádobka i měřicí sonda vždy očištěna papírovým ubrouskem a lihem. Texturometrem byla zjišťována adhezivita, kohezivita, konzistence a tuhost jednotlivých krémů v čase. Měření probíhalo v 5 opakováních u každé formulace, výsledné hodnoty byly vypočteny průměrem.

## **5.6 Senzorické posuzování organoleptických vlastností krémových formulací**

Krémové formulace byly hodnoceny také senzorickým posuzováním organoleptických vlastností. Formulace byly hodnoceny 22 zaškolenými posuzovateli v laboratoři senzorické analýzy Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, v období listopad–prosinec 2024 dle podmínek uvedených v [96]. Hodnotitelům byly zakódované krémové formulace předkládány ve stejných dávkách v nádobách za totožných teplotních podmínek dle [97], [98]. Posuzované formulace byly kódované klíčem: 333 – ZF, 555 – EF, 777 – NF. Krémové formulace byly hodnoceny 5 pořadovými a 3 párovými porovnávacími zkouškami (Příloha PI).

### **5.6.1 Pořadové zkoušky**

Pořadové zkoušky slouží k posouzení vzorků například dle intenzity znaku či preference jednotlivých hodnotitelů. Pořadové zkoušky jsou typem zkoušek s nucenou volbou, každý vzorek musí mít své jednotlivé pořadí. Pořadovými zkouškami dle intenzity znaku byly hodnoceny vůně, barva, roztíratelnost či vstřebatelnost krémových formulací, a také osobní preference hodnotitelů. Vůně krémových formulací byla hodnocena stupnicí 1–nejvíce příjemná, 3–nejméně příjemná. Barva formulací byla obdobně hodnocena stupnicí 1–nejsvětlejší, 3–nejtmavší. Pořadová zkouška na základně intenzity znaku roztíratelnosti jednotlivých formulací probíhala nanesením stejného množství hodnoceného vzorku krému špachtlí na volární stranu předloktí. Následně byly hodnocené formulace prstem rozetřeny do plochy o velikosti 2×4 cm. Vyhodnocení zkoušky probíhalo dle stupnice 1–nejlépe roztíratelná, 3–nejhůře roztíratelná. Po uplynutí 3–5 minut od rozetření jednotlivých formulací byla vyhodnocena vstřebatelnost formulací, dle stupnice 1–nejlépe vstřebatelná, 3–nejhůře vstřebatelná. V neposlední řadě byla hodnotiteli pořadovou zkouškou hodnocena také osobní preference u jednotlivých formulací, dle stupnice 1–nejvíce preferovaná, 3–nejméně preferovaná.

### 5.6.2 Párové porovnávací zkoušky

Párové porovnávací zkoušky slouží k posouzení sensorických znaků dvou posuzovaných vzorků, na základě osobní preference jednotlivých posuzovatelů či k určení rozdílu mezi jednotlivými vzorky. Párovou porovnávací zkouškou byla hodnocena roztíratelnost, vstřebatelnost a osobní preference hodnotitelů vůči posuzovaným krémovým formulacím.

## 5.7 Ověřování účinnosti formulací *in vivo* diagnostickými metodami

Testování *in vivo* bylo do diplomové práce zařazeno především za účelem ověření anti-aging účinnosti připravených krémových formulací. V rámci klinického testování byly u dobrovolnic monitorovány biofyzikální parametry pokožky, konkrétně hydratace, TEWL a pH kůže, ve třech časech – na začátku aplikace (týden 0), po 4 týdnech a po 8 týdnech pravidelného používání. Dále byly v časech 0 a 8 týdnů hodnoceny i parametry elasticity kůže, snímány povrchové otisky (repliky) a pořizovány fotografie kožního reliéfu, sloužící ke kvantitativnímu a vizuálnímu posouzení změn v mikrostruktuře pokožky v důsledku aplikace testovaných formulací.

### 5.7.1 Soubor dobrovolnic

Dobrovolnice byly vybírány na základě předem stanovených kritérií, jejichž přehled je uveden v Příloze PII, a také na základě splnění podmínek zaměřených na předešlý či aktuální zdravotní stav, viz dotazník uveden v Příloze PIII. *In vivo* testování probíhalo na 15 dobrovolnicích, ve věkové rozmezí  $50 \pm 2,7$  let, přičemž každá z formulací byla testována u pěti účastnic. Věkové rozmezí dobrovolnic odpovídalo předpokládané cílové skupině spotřebitelů se zralou pletí.

### 5.7.2 Organizace měření

*In vivo* testování probíhalo v laboratoři Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně při teplotě  $24,9 \pm 2$  °C a relativní vlhkosti  $40,2 \pm 2,1$  %. Testování bylo prováděno v měsících únor až duben v čase 0 a následně vždy po uplynutí 4 týdnů aplikace jednotlivých formulací.

Dobrovolnicím před testováním bylo poskytnuto obeznámení s metodikou testování, viz Příloha PIV. Také byl požadován podpis informovaného souhlasu a prohlášení souhlasu s dobrovolnou účastí v testování, Příloha PV. Dobrovolnice byly instruovány k aplikaci jednotlivých krémů 2krát denně, především v oblasti očí a čela po dobu 8 týdnů. Také bylo požadováno, aby v účastnice v průběhu testování nepoužívaly jiné krémové formulace.

Dobrovolnice před měřením byly ponechány po dobu 20 minut v laboratorních podmínkách v klidovém režimu za účelem aklimatizace a zajištění standardizovaných podmínek měření. Po uplynutí této doby bylo v pravé i levé periorbitální oblasti a ve střední části čela prováděno měření biofyzikálních parametrů pokožky, konkrétně hydratace, TEWL a pH, s využitím měřicí stanice MPA (Courage + Khazaka) s příslušnými sondami. Periorbitální oblast je anatomická oblast obklopující oční (orbita), která zahrnuje měkké tkáně včetně očních víček, podkoží, kůže a svalově-cévních struktur [99]. Získaná data byla zpracována prostřednictvím softwaru CK-Multi Probe Adapter, propojeného s měřicí stanicí. V časech 0 a 8 týdnů bylo navíc prováděno hodnocení elasticity pokožky pomocí příslušné sondy MPA systému, dále snímání mikroreliéfu kůže pomocí silikonových replik a vizuální analýza kožního povrchu se zaměřením na výskyt pórů, pigmentových skvrn a vrásek za pomoci visioskopu. Přehled použitých přístrojů je znázorněn na Obrázku 14.



Obrázek 14 Stanice MPA s příslušnými sondami a Visioskop® PC 35  
(zdroj: vlastní)

### 5.7.3 Korneometrie

Hydratace pokožky byla měřena za pomoci Korneometr® CM 825. Na testovaných místech bylo vždy naměřeno 5 hodnot hydratace pokožky, přitlakem korneometrické sondy. Interpretace výsledků byla založena na běžně používané klasifikaci. Hodnoty nižší než 30 k. j. byly považovány za indikátor extrémně suché pokožky, rozmezí 30–45 k. j. bylo hodnoceno jako suchá pokožka, zatímco hodnoty nad 45 k. j. svědčily o normálně hydratované kůži, odpovídající stavu zdravé epidermální bariéry [100].

#### 5.7.4 Tewametrie

Transepidermální ztráta vody byla hodnocena pomocí měřicí sondy Tewameter® TM 300, která umožňuje neinvazivní měření intenzity difuze vodních par přes epidermální bariéru. Měření bylo prováděno na vybraných místech pokožky, přičemž bylo zaznamenáno 15 hodnot. Pro zajištění přesnosti měření a eliminaci vlivů vnějších podmínek (zejména rozdílů v teplotě a vlhkosti mezi pokožkou dobrovolnice a okolním prostředím) bylo prvních pět hodnot vyloučeno z vyhodnocování. Hodnoty TEWL v rozmezí 0–10 g/m<sup>2</sup>/h byly považovány za velmi dobré, odpovídající optimální funkci epidermální bariéry. Rozmezí 10–15 g/m<sup>2</sup>/h bylo hodnoceno jako dobrá bariérová funkce, zatímco hodnoty mezi 15–25 g/m<sup>2</sup>/h jako fyziologicky normální. Zvýšené hodnoty TEWL v intervalu 25–30 g/m<sup>2</sup>/h již naznačují mírné narušení bariérové funkce pokožky, které může být spojeno například s podrážděním, dehydratací či působením nepříznivých zevních faktorů. Hodnoty přesahující 30 g/m<sup>2</sup>/h jsou klasifikovány jako kritické, indikující významné poškození kožní bariéry a zvýšenou ztrátu vody z povrchu pokožky [100].

#### 5.7.5 pH-metrie

Měření pH bylo provedeno pomocí měřicí sondy pH metr® 905. Pro každou sledovanou oblast v jednotlivých časech byla naměřena vždy jedna hodnota pH. Optimální pH pokožky by mělo vykazovat hodnoty v rozmezí od 4,5–5,5 [63].

#### 5.7.6 Reviskometrie

Elasticita pokožky byla hodnocena pomocí sondy Reviscometer® RVM 600. Měření probíhalo ve 360° rozsahu, kdy byla reviskometrická sonda s jemnou měřicí jehličkou aplikována do kroužku s úhlovou stupnicí, připevněného ke kůži pomocí oboustranně lepícího kruhu. Na každém sledovaném místě bylo provedeno 13 měření, a to v 30° intervalech. Tento přístup umožňuje identifikovat nejen celkový stupeň elasticity, ale také anizotropii kožní tkáně, která odráží orientaci kolagenních a elastinových vláken ve struktuře *dermis*.

#### 5.7.7 Visioskopie

V rámci visioskopie byly za pomoci Visioskop® PC 35 snímány póry, pigmentové skvrny či vrásky, přiložením přístroje na sledované oblasti, zmrazením obrazu a následného vyhodnocení snímku programem CSI-Complete Skin Investigation.

### 5.7.8 Visiometrie

V časech 0 a po 8 týdnech aplikace jednotlivých krémových formulací byla provedena také visiometrie, zaměřená na hodnocení mikrorelífu pokožky pomocí silikonových replik. Snímání bylo prováděno na předem odmaštěných místech pokožky (micelární vodou), přičemž byl použit oboustranně lepicí rámeček, který sloužil jako ohraničení pro nanesení silikonové směsi. Replikační směs byla připravena smísením silikonu a katalyzátoru v poměru 2:1 v plastovém kelímku. Směs byla následně odplyněna pomocí vakuové odsávací pumpy, čímž došlo k eliminaci vzduchových bublin, které by mohly ovlivnit přesnost a kvalitu výsledné repliky. Následně byla směs rovnoměrně nanesena do rámečku a překryta adhezivní krycí fólií Corneofix, která zajistila optimální kontakt se strukturou kůže. Po přibližně 15 minutách byla vytvořená silikonová replika opatrně sejmuta, přenesena na papírovou kartičku a analyzována pomocí předem zkalibrovaného visiometru, který umožňuje hodnocení parametrů povrchového reliéfu pokožky, včetně hloubky a hustoty vrásek či hrubosti pokožky.

## 5.8 Antioxidační aktivita formulací

Měření antioxidační aktivity všech připravených krémových formulací bylo obdobně provedeno metodou DPPH, jako v případě nosiče s enkapsulovaným kvercetinem, viz kapitola 5.2.1.

Do skleněných vialek byl za pomoci injekční stříkačky navážen 1 g příslušné krémové formulace, doplněn 3 ml 0,1 mM roztoku DPPH. Následně byly vialky uchovávány ve tmě po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl supernatant odebrán pomocí injekční stříkačky s jehlou, aby bylo zamezeno vtažení krémové formulace. Odebíraný roztok byl následně přefiltrován přes dva filtry, nejprve s velikostí pórů 1,2  $\mu\text{m}$ , poté s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ , za účelem odstranění všech zbytkových částic, které by mohly ovlivnit měření absorbance. Připravený roztok byl převeden do měřicích kyvet a analyzován pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Naměřené hodnoty byly zpracovány dle vztahu (1), kterým byla vypočtena antioxidační aktivita krémových formulací ve formě procentuální inhibice radikálu DPPH.

## 5.9 Test uvolňování aktivní látky z formulací

Test uvolňování aktivní látky z formulací byl proveden u připravených formulací obsahující kvercetin (EF a NF). Pro každé stanovení byly odebrány 3 g příslušné formulace a přeneseny do dialyzační membrány s molekulovou propustností 12–14 kDa. Membrány byly umístěny do uzavíratelných skleněných lahví doplněných 20 ml PBS pufru o pH 7,3. Tyto láhve byly uchovávány ve tmě a třepány na laboratorní třepačce při 150 rpm a teplotě 32 °C. Následně byly odebírány 2 ml pufru s uvolněnou aktivní látkou v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 8; 24; 48; 72; 96; 120,5; 168 a 216 hodin od začátku experimentu. Po každém odběru byly odebrané objemy nahrazeny stejným množstvím čerstvého PBS pufru. Vzorky byly uchovávány v lednici pro následnou analýzu. Vyhodnocení probíhalo měřením absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 378 nm, jenž odpovídá absorpčnímu maximu kvercetinu. Na základě absorbance byla pomocí kalibrační rovnice stanovena koncentrace aktivní látky, která byla přepočtena na kumulativní koncentraci uvolněného kvercetinu. Tyto hodnoty byly následně vyneseny jako závislost koncentrace na čase.

Test uvolňování byl pro každou formulaci proveden dvakrát vedle sebe. Kinetika uvolňování byla dále vyhodnocena podle modelu kinetiky prvního řádu (viz Rovnice 2) pomocí regresní analýzy metodou nejmenších čtverců v programu Microsoft Excel 365 za využití doplňku Řešitel.

$$C_{REL} = C_{MAX} \times (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Kde:

$C_{REL}$  – koncentrace uvolněné aktivní látky v čase  $t$ ,

$C_{MAX}$  – maximální teoretická koncentrace aktivní látky,

$k$  – rychlostní konstanta.

## 5.10 Statistické zpracování získaných dat

Naměřená data ze stabilitních testů (pH, viskozita, textura), senzorického hodnocení formulací a *in vivo* měření diagnostickými metodami (hydratace, TEWL, pH, elasticita, mikrorelief kůže) byla zpracována programem Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA). U naměřených dat byly s využitím programu vyhodnoceny aritmetické průměry a směrodatné odchylky. Staticky významné změny měřených veličin v průběhu experimentů (signifikantní hodnoty byly označeny symbolem hvězdičky) byly vyhodnoceny

pomocí funkce Analýza dat v programu Microsoft Office Excel, dvouvýběrovým párovým t-test na střední hodnotu s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Pořadové zkoušky v rámci senzorického hodnocení byly statisticky vyhodnocovány pomocí Friedmanova testu na 95% hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). K vyhodnocení získaných dat byla stanovena nulová  $H_0$  a alternativní hypotéza A;  $H_0$ : mezi formulacemi neexistují staticky významné rozdíly při hodnocení jednotlivých senzorických znaků a hypotéza A: existuje alespoň jedna formulace, jenž se ve sledovaných znacích liší. Zjištěné vzájemné difference mezi formulacemi ve sledovaných znacích, byly dále hodnoceny Neményiho metodou na 95% hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ), jenž určila, které konkrétní dvojice formulací se vzájemně liší ve sledovaných znacích.

K vyhodnocení párových porovnávacích zkoušek senzorického hodnocení krémových formulací byla využita Fisherova statistika na 95% hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Opětovně byly stanoveny nulová  $H_0$  a alternativní hypotéza A;  $H_0$  nepředpokládá existenci rozdílu ve sledovaném senzorickém znaku, tudíž nemožnost odlišení formulací a A předpokládá existenci rozdílu v intenzitě a směru sledovaného znaku.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

V praktické části diplomové práce byla nejprve provedena příprava enkapsulovaného vybraného antioxidantu, kvercetinu. Následně byly připraveny krémové formulace, jež byly podrobeny několika testům, zahrnující mikrobiologickou čistotu a účinnost použitého konzervantu, ověření stability, senzorické hodnocení organoleptických vlastností, testování účinnosti *in vivo* a v neposlední řadě také stanovení antioxidační aktivity a uvolnění aktivní látky z formulací. V kapitolách 6.1–6.7 jsou prezentovány a diskutovány získané výsledky jednotlivých testů.

### 6.1 Zhodnocení přípravy enkapsulovaného kvercetinu

V kosmetických přípravcích obsahujících enkapsulované antioxidanty jsou často k enkapsulaci využívány polyfenolické sloučeniny [70], [101], [102]. Na základě uvedených poznatků a zkušeností z přípravy jeho enkapsulované formy z práce [94], byl vybraným antioxidantem kvercetin. V kosmetickém průmyslu se jedná o poměrně málo známou či studovanou kosmetickou ingredienci, vykazující zklidňující, protizánětlivé, regenerační a antioxidační vlastnosti [67]. Využití volného kvercetinu v kosmetických formulacích je poměrně omezeno, z důvodu jeho špatné rozpustnosti, nízké biologické dostupnosti a propustnosti pokožkou. Kvercetin zabudovaný v nosiči by měl vykazovat vyšší fyzikální a chemickou stabilitu, lepší rozpustnost či míru penetrace pokožkou [67]. Byly připraveny a testovány krémové formulace obsahující enkapsulovaný i volný neenkapsulovaný kvercetin.

Kvercetin byl enkapsulován do nosného systému složeného ze 100 mg PC a 10 mg neionického surfaktantu P407, metodou hydratace tenkého filmu. Vzhledem k vyššímu obsahu PC ve složení se jednalo konkrétně o lipozomální enkapsulaci. Lipozomy jsou kulovité vezikuly tvořeny dvojvrstvou membránou, umožňující zapouzdření účinných látek. Vzhledem k podobnosti struktury s lipidovou membránou kůže jsou schopny měnit fluiditu buněčné membrány, a dodávat tak cíleně účinné látky [103]. Pro anti-aging krémy je uváděno množství kvercetinu ve složení formulací v rozmezí od 0,0001–2 % [104]. Enkapsulovaná forma kvercetinu byla limitována kapacitou připraveného nosiče a neenkapsulovaná forma omezenou rozpustností práškového kvercetinu, proto byl kvercetin do formulací přidáván v obsahu 0,005 %.

Ve studii [105] byly porovnávány lipozomální systémy tvořené PC s inkorporovaným P407 a systém PC s polyethylenglykolem (PEG). Bylo zjištěno, že začlenění P407 do

systému vedlo ke zmenšení velikosti systému a zvýšení skladovací teploty ze 4 °C na 25 °C. Závěrem studie byl P407 navržen jako slibná alternativa k PEG při vývoji lipozomů s optimalizovanou biologickou dostupností a skladovatelností systémů. Ve studii [106] byly připravovány lipozomy, složené z PC, cholesterolu, Tweenu 80 a kvercetinu, pomocí techniky injekce ethanolu. Lipozomy vykazovaly vysokou účinnost zapouzdření kvercetinu, malou velikost částic, negativní náboj a jeho dlouhodobé uvolňování ze systému (až 48 hodin). Při testování *in vitro* připravené lipozomy zvýšily penetraci a ukládání kvercetinu do kůže. Dále byl sledován také účinek lipozomů na edém a zánět indukovaný UVB zářením *in vivo*. Výsledky potvrdily zmírnění edému či zánětu po aplikaci lipozomů se zabudovaným kvercetinem. Liu a kol. [107] připravili injekční metodou lipozomy s inkorporovaným 0,23% kvercetinem, které byly dispergovány do hydrogelů sodné soli karboxymethylcelulózy. Studie ukázala, že lipozomy v takovém gelu vykazují dobrou stabilitu v kůži a přilnavost k pokožce. Test DPPH prokázal silnou antioxidační aktivitu hydrogelu. Hydrogel byl testován také na modelu kožního ekzému u myší, kde významně zlepšil stav epidermálního ekzému.

### 6.1.1 Charakterizace nosiče s enkapsulovaným kvercetinem

Připravený nosič byl charakterizován měřením zeta potenciálu, velikosti částic, indexu polydisperzity a antioxidační aktivity, viz Tabulka 2.

Tabulka 2 Charakterizace nosiče

| Zeta potenciál<br>[mV] | Velikost částic<br>[nm] | Index<br>polydisperzity<br>[-] | Antioxidační<br>aktivita<br>[%] |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| -31,4 ± 1,3            | 948,2 ± 66,9            | 0,45–0,55                      | 80,32                           |

Zeta potenciál byl měřen kvůli vlivu elektrostatických sil na stabilitu nosiče. pH připraveného nosiče bylo v rozmezí 4,5–5,5. Hodnoty zeta potenciálu pohybující se nad hodnotou +30 mV či pod hodnotou -30 mV, značí elektrostabilní systémy. Hodnoty pohybující se mezi 0 ± 10 mV naopak vykazují významný pokles stability systémů, z důvodu vyšší tendence k agregaci částic [108]. U připraveného nosiče byla průměrná hodnota zeta potenciálu stanovena na -31,4 mV, i přes použití neionického tenzidu k přípravě nosiče. Tudíž lze nosič pokládat za elektrostabilní bez předpokladu agregace jednotlivých lipozomů, díky vlivu odpudivých interakcí.

U chemické struktury PC a lipozomální povaze nosiče byla předpokládána větší velikost částic. Hodnota velikosti částic u připraveného nosiče byla stanovena průměrem ze tří měření na  $948,2 \pm 66,9$  nm. V rámci měření velikosti částic byl vyhodnocen také index polydisperzity (PDI), jenž udává míru heterogenity vzorků na základě velikosti částic. Vyšší hodnoty značí větší distribuci částic. V případě lipozomálního nosiče s kvercetinem, byl PDI zaznamenán mezi hodnotami 0,45–0,55.

Antioxidační aktivita nosiče s kvercetinem byla stanovena z důvodu zabudování nosiče do krémové formulace a pozdějšího stanovení účinnosti formulací *in vivo* měřením biofyzikálních vlastností kůže a anti-aging efektu. Antioxidační aktivita nosiče 80,32 % stanovená metodou zhášení stabilních radikálů DPPH, byla vyjádřena jako úbytek absorpance oproti referenci 0,1 mM roztoku DPPH v 96% ethanolu.

## 6.2 Zhodnocení složení a přípravy formulací

Krémové formulace patří mezi nejčastěji vyhledávané emulzní systémy v péči o pokožku, jak z důvodu umožnění dodávání účinných látek do pokožky či vlastností preferovaných spotřebiteli. Krémové formulace byly připravovány jako emulzní systém typu o/v, který by zajišťoval hydrataci zralé pleti, nezanechával mastný pocit na pokožce po aplikaci a disponoval antioxidační účinností. Ve složení připravovaných krémových formulací byla zahrnuta rozpouštědla, hydratační, okluzivní, zklidňující, změkčující, vyhlazující a zjemňující látky, modifikátor viskozity, konzervant, emulgátor a bohaté zastoupení antioxidačních látek. Jednotlivé ingredience byly voleny dle jejich dostupnosti a splnění zadání diplomové práce, s ohledem na záměr studie.

Krémové formulace obsahovaly množství hydratačních látek *Glycerin*, *Panthenol*, *Fructose*, *Isopropyl Miristate*, *Cera Alba*, *Oryza Sativa Bran Cera*, *Simmondsia Chinensis Oil*, *Mangifera Indica Seed Butter*, *Cucumis Sativus Fruit Extract* či *Aloe barbadensis Leaf Extract*, z důvodu podpory a udržení hydratace pleti. Hydratační látky mají obecnou schopnost bránit ztrátám vody z pokožky či díky své chemické struktuře molekuly vody na sebe vázat, a tím ji dlouhodobě v pokožce zadržovat. *Panthenol* vykazuje snadnou absorpci pokožkou, kde je přeměňován na tělu přirozenou kyselinu pantothenovou. V kosmetických formulacích mimo hydratační účinky vykazuje také antistatické, protizánětlivé, antibakteriální, regenerační či zklidňující účinky. *Isopropyl Miristate* je látka nižší mastnoty s dobrou kožní penetrací. *Fructose* disponuje mírným exfoliačním účinkem, což může napomáhat pronikání účinných látek do pokožky. *Cera Alba* a *Oryza Sativa Bran Cera* svůj

hydratační efekt podporují tvorbou okluzivní vrstvy na pokožce, čímž napomáhají obnovit přirozený lipidový film pokožky a brání TEWL. *Cera Alba* navíc disponuje také protizánětlivými, regeneračními či zklidňujícími účinky. *Oryza Sativa Bran Cera* je do kosmetických receptur přidáván také jako zahušťovadlo, vykazující zároveň zjemňující či antioxidační vlastnosti. *Simmondsia Chinensis Oil* snižuje pocit mastnosti po aplikaci s řadou dalších benefitů. Pro své hydratační či regenerační vlastnosti je schopen také snižovat viditelnost jizev. U čistě rostlinných vosků či olejů nebyl prozatím prokázán UV filtr, navzdory tomu je *Simmondsia Chinensis Oil* označován jako SPF 3–4. *Mangifera Indica Seed Butter* mimo své hydratační účinky, díky vysokému zastoupení mastných kyselin, vykazuje také antioxidační vlastnosti. Zakomponováním *Cucumis Sativus Fruit Extract* či *Aloe Barbadensis Leaf Extract* do kosmetických formulací, mimo hydratační účinky, je dosaženo také zklidňujících, regeneračních či změkčujících účinků. Extrakty vykazují také antioxidační vlastnosti díky zastoupení vitaminů A, C, E či stopových prvků [71], [109], [110], [111].

Ve složení tukové fáze byly pro své zjemňující, hydratační, zklidňující, regenerační, změkčující či antioxidační vlastnosti zahrnuty *Prunus Dulcis Oil* a *Cocos Nucifera Oil*. Jako regulátor viskozity byl použit *Carbomer*. Emulgátorem krémových formulací byl *Olivoil Avenate emulsifier®* složený z *Potassium Olivoyl Hydrolyzed Avena Protein*, *Cetearyl Alcohol*, *Glyceryl Oleate*, *Glyceryl Stearate*, *Potassium Hydroxide*. Jedná se o samoemulgující rostlinný vosk, jenž vytváří velmi snadně jemné emulze, vhodné pro všechny typy pleti, bez nutnosti přidání jiného emulgátoru či stabilizátoru. Optimální pH kosmetického produktu pro zakomponování *Olivoil Avenate emulsifier®* je 5–8. Jako konzervant formulací byl využit *Dermosoft® 1388 ECO*, schválen *Ecocertem* jako šetrný konzervant pro přírodní kosmetiku, se složením *Glycerin*, *Aqua*, *Sodium Levulinate*, *Sodium Anisate*. *Dermosoft® 1388 ECO* je antimikrobiální směs přírodního původu, účinný proti bakteriím, kvasinkám či plísním, vhodný pro všechny druhy kosmetických přípravků. Kromě konzervačních vlastností disponuje také protizánětlivými či hydratačními účinky. Aplikační pH je doporučováno mezi 5–5,5 z důvodu nerozpustnosti či oddělení emulzí při pH<5. Jako stěžejní antioxidant byl zvolen *Quercetin* a další antioxidanty *Ubiquinone* a *Tocopherol*, jejichž vlastnosti a benefity pro pokožku byly prezentovány v kapitole 2.3. [71], [112], [113].

Vývoj modelových formulací sestával z pilotní přípravy, během které bylo na základě průběžně prováděného senzorického posuzování, přistupováno ke změnám v kvalitativním

a kvantitativním složení receptury. Složení receptury bylo modifikováno, dokud nebylo dosaženo uspokojivých organoleptických vlastností, odpovídajících formulacím pro zralou pleť. Upravovány byly především podíly ingrediencí jako *Cocos Nucifera Oil*, *Cera Alba*, *Prunus Dulcis Oil*, *Mangifera Indica Seed Butter*, *Simmondsia Chinensis Oil*, *Aloe barbadensis Leaf Extract* a emulgátoru Olivooil Avenate®.

Po emulzifikaci jednotlivých formulací bylo vždy provedeno kontrolní měření hodnot pH. Kosmetické krémové formulace určené pro styk s pokožkou by měly vykazovat hodnoty pH v rozmezí 4,5–5,5 [63]. Vzhledem k použitému emulgátoru Olivooil Avenate®, u něhož bylo pro použití deklarováno aplikační pH 5–8 a konzervantu Dermosoft® 1388 ECO s aplikačním pH 5–5,5; bylo pro krémové formulace vyžadováno pH nad hodnotu 5. Připravená formulace ZF vykazovala pH 5,41; EF 5,44 a NF 5,39.

### 6.3 Mikrobiologické testování formulací

Přírodní složky jsou náchylnější k mikrobiální kontaminaci nežli složky chemického původu. Kosmetické produkty obsahující složky jako jsou polysacharidy, proteiny, glykosidy, vitaminy, lipidy, aminokyseliny či voda, podporují přežití a růst mnoha mikroorganismů. Mikrobiální kontaminace v kosmetických produktech může pocházet z různých faktorů, včetně výrobního procesu, balení či skladování produktů, kontaminací uživateli či nedostatečné účinnosti použitých konzervačních látek. Mikrobiální kontaminace nepříznivě ovlivňuje kvalitu a bezpečnost kosmetických přípravků, z těchto důvodů jsou v kosmetickém průmyslu pro každou vyrobenou šarži povinně prováděny mikrobiologické testy [114], [115].

Mezi nejčastější ukazatele mikrobiologické kontaminace kosmetických přípravků, patří čtyři patogenní mikroorganismy, jež mohou způsobovat zdravotní problémy: i) *Pseudomonas aeruginosa*, což je gramnegativní, aerobní bakterie, způsobující infekce, zejména u lidí s oslabenou imunitou; ii) *Staphylococcus aureus*, což je grampozitivní bakterie, způsobující především kožní infekce a další zdravotní problémy; iii) *Escherichia coli*, což je gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie, jež je indikátorem fekální kontaminace kosmetických přípravků; iv) *Candida albicans*, což je kvasinka způsobující mykotické infekce.

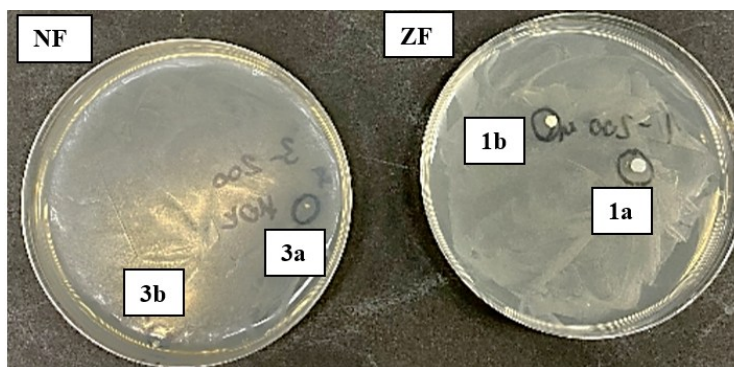
Dalšími mikroorganismy způsobující mikrobiální kontaminaci kosmetických produktů jsou například rody *Micrococcus* či *Propionibacterium* [114]. Pro zajištění bezpečnosti spotřebitelů kosmetických produktů byly normou EN ISO 1716:2014 [116] stanoveny

požadavky na mikrobiologickou kvalitu kosmetických produktů mikrobiologickými limity. Norma vyžaduje nulovou přítomnost čtyř zmiňovaných patogenních mikroorganismů (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*) v 1 g (ml) kosmetických přípravků. Přítomnost ostatních mikroorganismů norma upravuje dělením kosmetických přípravků do kategorií: i) produkty pro děti do 3 let a produkty aplikovány v okolí očí a sliznic a ii) ostatní kosmetické produkty. Mikrobiologické mezní limity pro kategorii i) jsou stanoveny hodnotou  $\leq 1 \times 10^2$  CFU/g (ml) a pro kategorii ii) je nutno dodržet hodnotu  $\leq 1 \times 10^3$  CFU/g (ml).

Hlavním účelem konzervačních látek je inhibovat růst mikroorganismů v kosmetických přípravcích, čímž prodlužují trvanlivost přípravků, zajišťují bezpečnost pro spotřebitele a zachovávají kvalitu přípravků [114].

### 6.3.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Ihned po přípravě krémových formulací bylo provedeno stanovení celkového počtu mikroorganismů. Testování jednotlivých formulací bylo provedeno na agarech PCA a ChYGA. Po inkubační době byly jednotlivé Petriho misky s příslušnými agary vyhodnoceny. Na agarech ChYGA nebyl detekován žádný nárůst mikroorganismů, čímž byla prokázána nepřítomnost kvasinek a plísní v krémových formulacích. Při vyhodnocení PCA agarů byl zjištěn nárůst kolonií na agarech u formulací ZF a NF, viz Obrázek 15. Na agary bylo očkováno 200  $\mu$ l připravené suspenze pomocí skleněné sterilní hokejky.

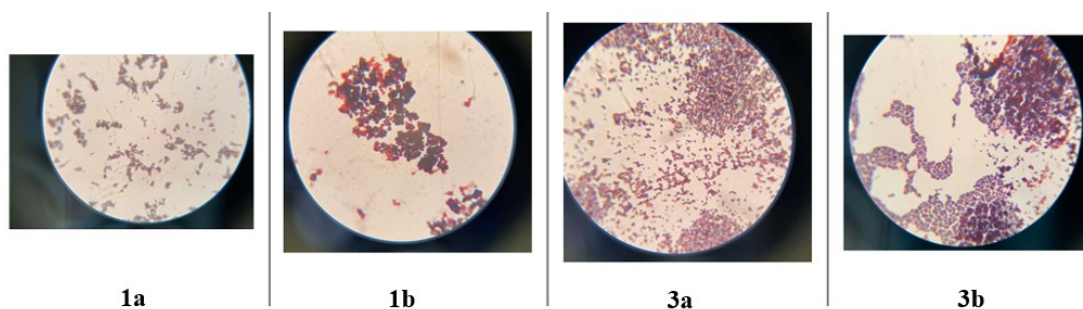


Obrázek 15 PCA agary s narostlými koloniemi  
označenými 3a, 3b, 1a, 1b  
(zdroj: vlastní)

Celkový počet mikroorganismů ve formulacích ZF i NF činil 10 CFU/g, což splňuje mezní mikrobiologické limity stanovené normou EN ISO 1716:2014 [116] pro kategorii kosmetických produktů aplikovaných v okolí očí a sliznic. Kolonie 1a, 1b, 3a, 3b byly pomocí křížového roztěru naočkovány na agarové půdy PCA. Z důvodu podezření kolonií

1b a 3b na možné kvasinky byly kolonie křížovým roztěrem naočkovány také na agarovou půdu ChYGA. Kultivační podmínky byly 30 °C po dobu 48 hodin pro agary PCA a 25 °C po dobu 5 dnů pro agary ChYGA. Po uplynutí kultivační doby byl detekován nárůst pouze na PCA agarech, tudíž byla opakovaně potvrzena nepřítomnost kvasinek a plísní v krémových formulacích.

Pro určení jednotlivých narostlých kolonií na agarech PCA v případě formulace ZF a NF bylo provedeno Gramovo barvení získaných izolátů a následné vyhodnocení pomocí mikroskopu, viz Obrázek 16. Na základě provedeného Gramova barvení byly ve vzorku detekovány grampozitivní koky. Mikroskopická morfologie buněk naznačuje, že by se mohlo jednat o zástupce rodu *Micrococcus*, jelikož se mikroorganismy v preparátu jeví jako jednotlivé koky či koky uspořádané v tetrádách (zejména 1a, 3a), nikoliv v hroznovitých shlucích typických pro rod *Staphylococcus*. Morfologické znaky byly dále podpořeny i makroskopickým vzhledem kolonií po inkubaci, kolonie izolátů vykazovaly výrazně žluté zbarvení, což je typické právě pro rod *Micrococcus*, zatímco kolonie *Staphylococcus* bývají spíše oranžové. Ačkoliv tyto znaky slouží jako důležité orientační ukazatele pro předběžné určení mikroorganismu, je nutné zdůraznit, že spolehlivé rozlišení mezi rody *Micrococcus* a *Staphylococcus* vyžaduje provedení dalších biochemických testů, jako je například oxidázový test, kde *Micrococcus* vykazuje pozitivní reakci, zatímco *Staphylococcus* je oxidázově negativní [117].



Obrázek 16 Mikroskopické vyhodnocení narostlých kolonií na agarech PCA  
(zdroj: vlastní)

Kontaminace bakteriemi rodu *Micrococcus* mohla nastat při výrobě krémových formulací či při samotném mikrobiologickém testování kosmetických formulací, jelikož bakterie rodu *Micrococcus* se vyskytují v různém prostředí včetně vody, prachu ve vzduchu či na lidské pokožce [114], [115].

### 6.3.2 Stanovení bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

V kosmetice jsou z hlediska mikrobiologické čistoty sledovány především čtyři patogenní mikroorganismy způsobující mikrobiální kontaminaci kosmetických přípravků, z nichž nejběžněji se vyskytující je *P. aeruginosa* [114]. Stanovení *P. aeruginosa* probíhalo na TYA agarrech. V žádném z testovaných vzorků nebyla detekována přítomnost bakterie *P. aeruginosa*.

### 6.3.3 Test přežívání *Pseudomonas aeruginosa* ve formulacích

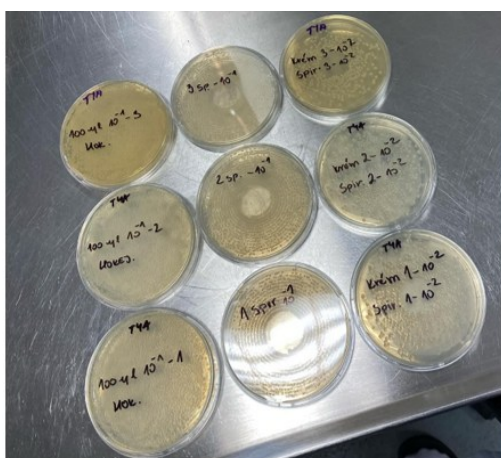
Testem přežívání *P. aeruginosa* byla testována dlouhodobá účinnost konzervantu použitého v kosmetických formulacích. Jednalo se o uměle vytvořenou kontaminaci kosmetických formulací a následně sledovanou změnu ve snížení obsahu životaschopných bakterií *P. aeruginosa*. Test byl prováděn v čase 0 a následně po 7, 14 a 28 dnech. Vyhodnocení životaschopnosti *P. aeruginosa* v krémových formulacích je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Test přežívání bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ve formulacích

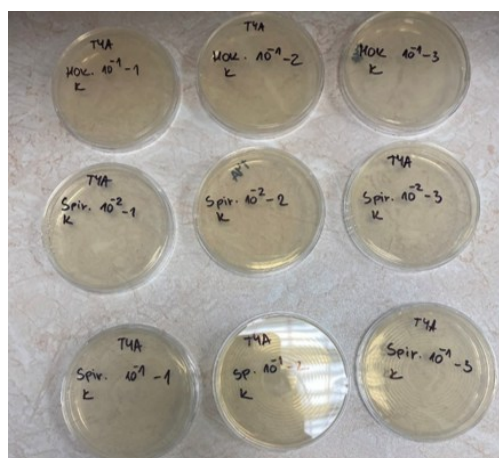
| Čas       | 0 dnů              | 7 dnů            | 14 dnů           | 28 dnů           |
|-----------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Formulace | CFU/g              |                  |                  |                  |
| ZF        | $7,92 \times 10^5$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ |
| EF        | $1,21 \times 10^6$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ |
| NF        | $9,13 \times 10^5$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ | $<2 \times 10^2$ |

V čase 0, ihned po zaočkování bakterie *P. aeruginosa*, došlo k nárůstu kolonií ve všech testovaných formulacích (Obrázek 17). Největší nárůst bakterie *P. aeruginosa* byl detekován u formulace EF, avšak počet kolonií v jednotlivých formulacích nebyl příliš rozdílný. Již po 7 dnech skladování krémových formulací došlo k inhibici růstu bakterie *P. aeruginosa* vlivem působení konzervantu (Obrázek 18). Obdobné výsledky byly zaznamenány také po 14 a 28 dnech.

Dle normy ISO 11930:2019 [95] je pro mikrobiologickou stabilitu produktu klíčové sledovat počet mikroorganismů v časovém průběhu. Pokud je v testovaných přípravcích zaznamenán pokles počtu mikroorganismů alespoň o 1 logaritmickou jednotku (90 %), je přípravek považován za mikrobiologicky stabilní. Ve všech testovaných formulacích byl zaznamenán pokles zhruba o 3,6 logaritmických jednotek, což odpovídá poklesu počtu bakterie *P. aeruginosa* o více než 99,9 %. Výsledek testu potvrzuje, že krémové formulace vykazují výbornou mikrobiologickou stabilitu a splňují požadavky normy ISO 11930:2019. Na základě získaných výsledků jsou krémové formulace hodnoceny jako bezpečné pro použití a neohrožující zdraví spotřebitelů z hlediska mikrobiální kontaminace.



Obrázek 17 Vyhodnocení testu přežívání bakterie *P. aeruginosa* v čase 0  
(1 – ZF, 2 – EF, 3 – NF)  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 18 Vyhodnocení testu přežívání bakterie *P. aeruginosa* po 7 dnech  
(1 – ZF, 2 – EF, 3 – NF)  
(zdroj: vlastní)

V rámci mikrobiologického testování krémových formulací nebyl shledán rozdíl mezi jednotlivými formulacemi v antimikrobiální účinnosti.

## 6.4 Stabilitní testy

Cílem provedení stabilitních testů krémových formulací bylo ověření jejich odolnosti vůči teplotním změnám v čase, jelikož kosmetické emulze vykazují termodynamickou nestabilitu. V rámci diplomové práce byly stabilitní testy prováděny při teplotách a čase s ohledem na doporučení uvedená v normě ISO TR 18811 [118]. Dle normy je stabilita kosmetických formulací definována jako schopnost výrobku odolávat vnitřním či vnějším změnám v čase za definovaných či předvídatelných podmínek při skladování či používání. Krémové formulace ZF, EF, NF byly po dobu 28 dnů vystavovány teplotám 4, 25, 37, 47

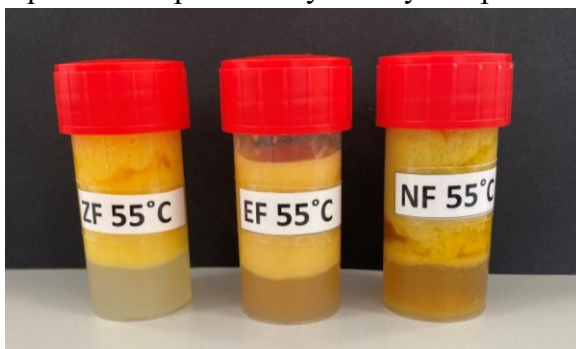
a 55 °C. Měření jednotlivých vlastností probíhalo v čase 0 a následně obdobným způsobem po 14 a 28 dnech.

#### 6.4.1 Posuzování organoleptických vlastností

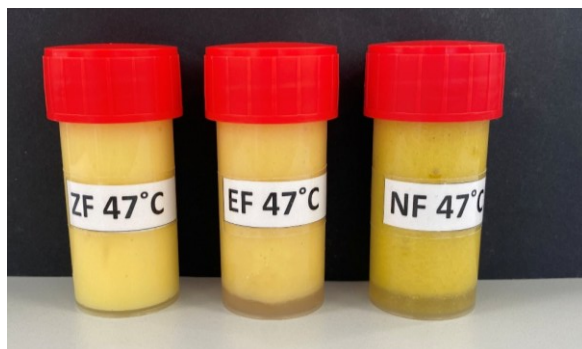
Změny organoleptických vlastností formulací byly hodnoceny vizuálně a pomocí kolorimetru.

##### Vizuální pozorování

U sad formulací uchovávaných při teplotách 4, 25 a 37 °C nebyly detekovány změny v separaci fází po dobu stabilitního testování (28 dnů). Změny v separaci fází však nastaly po 14 dnech u celé sady krémových formulací uchovávaných v 55 °C (viz Obrázek 19), a u formulací EF a NF obsahující enkapsulovaný či neenkapsulovaný kvercetin, uchovávaných při 47 °C, viz Obrázek 20. Testování a pozorování formulací bylo z důvodu separace fází při obou vystavených teplotách po 14 dnech ukončeno.



Obrázek 19 Rozpad formulací při 55 °C  
po 14 dnech  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 20 Rozpad formulací při 47 °C  
po 14 dnech  
(zdroj: vlastní)

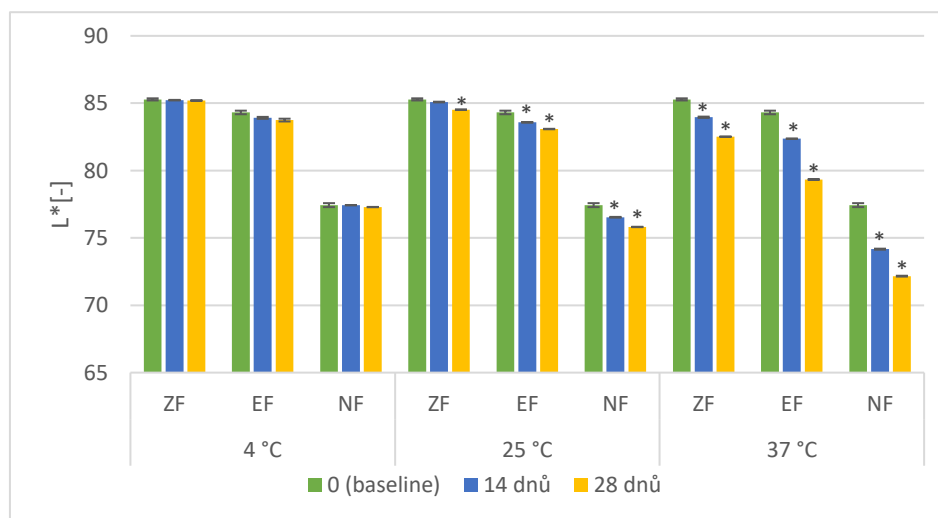
Rozpad sady formulací uchovávaných při 55 °C může být připisován vlivu emulgátoru Olivoil Avenate emulsifier®, u něhož je deklarována stabilita přípravku pro rozmezí teplot 54–68 °C [112]. Rozpad formulací EF a NF při 47 °C s vizuálně patrnou separací fází byl nejspíše způsoben inkorporací kvercetinu, jelikož změny tohoto typu nebyly pozorovatelné u ZF po celou dobu testování. Studie [119] hodnotila funkční stabilitu kvercetinu v krému obsahující neionický surfaktant a v krémovém gelu obsahující anionický surfaktant. Studie rovněž zjistila, že při teplotě skladování 45 °C, docházelo ke změnám studovaných vlastností v důsledku zakomponovaného kvercetinu. Výsledky studie také naznačily, že stabilita kvercetinu v krémech je ovlivněna nejen teplotou skladování, ale také typem formulace. Ve studii [120] byla zkoumána také stabilita mikroemulze v/o obsahující kvercetin. Formulace vykazovala pozoruhodnou fyzikální stabilitu po dobu 12 měsíců při teplotách skladování 4,

20, 30 a 40 °C. Během testování byly zjištěny změny v chemické struktuře obsaženého kvercetinu, které se projevily v jeho antioxidačních vlastnostech. Závěrem studie byly naznačeny nezbytné speciální podmínky skladování při  $4 \pm 2$  °C pro zachování funkčnosti mikroemulze obsahující kvercetin. Z uvedených důvodů v prezentovaných studiích je podobný rozpad možný i u připravených formulací EF a NF skladovaných při 47 °C.

V rámci posuzování vzhledu formulací na základě separace fází nebyl shledán rozdíl mezi zakomponováním enkapsulované či neenkapsulované formy kvercetinu do formulací, tudíž nelze prokázat zlepšení fyzikální či chemické stability kvercetinu jeho zabudováním do nosiče.

#### Instrumentální hodnocení barvy formulací

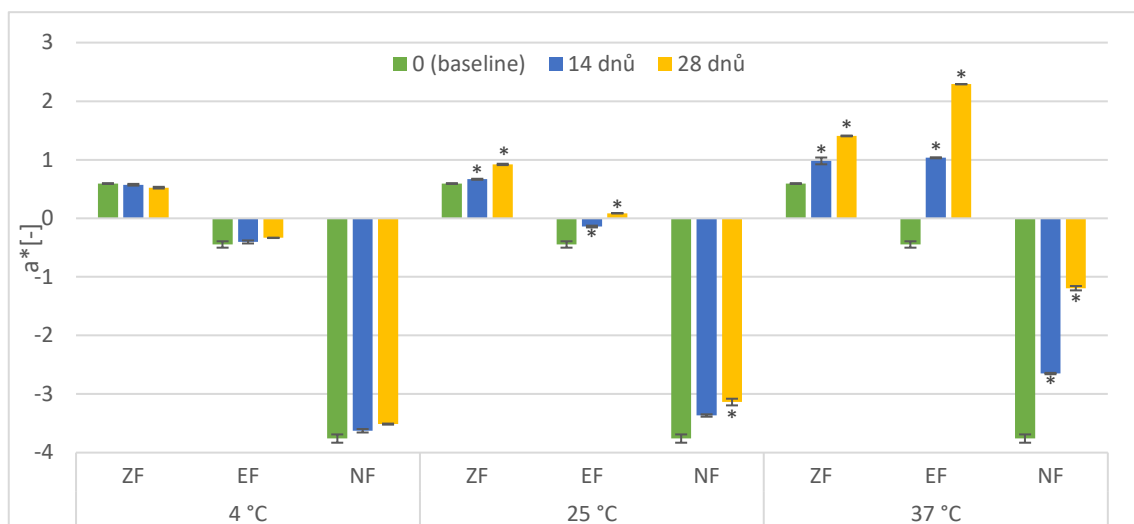
Žlutavá barva krémových formulací byla zapříčiněna zakomponováním především kvercetinu a koenzymu Q10 do formulací. Během vystavení formulací jednotlivým teplotním režimům mohlo dojít ke změně barvy. Změna barvy byla měřena na kolorimetru pomocí parametrů  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Parametrem  $L^*$  byl hodnocen jas barvy; parametrem  $a^*$  určoval přechod mezi zelenou a červenou barvou a parametrem  $b^*$  byl snímán přechod mezi barvou modrou a žlutou. Hodnoty parametrů  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  jednotlivých formulací představují Obrázky 21–23.



Obrázek 21 Časová závislost hodnot parametru  $L^*$  na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

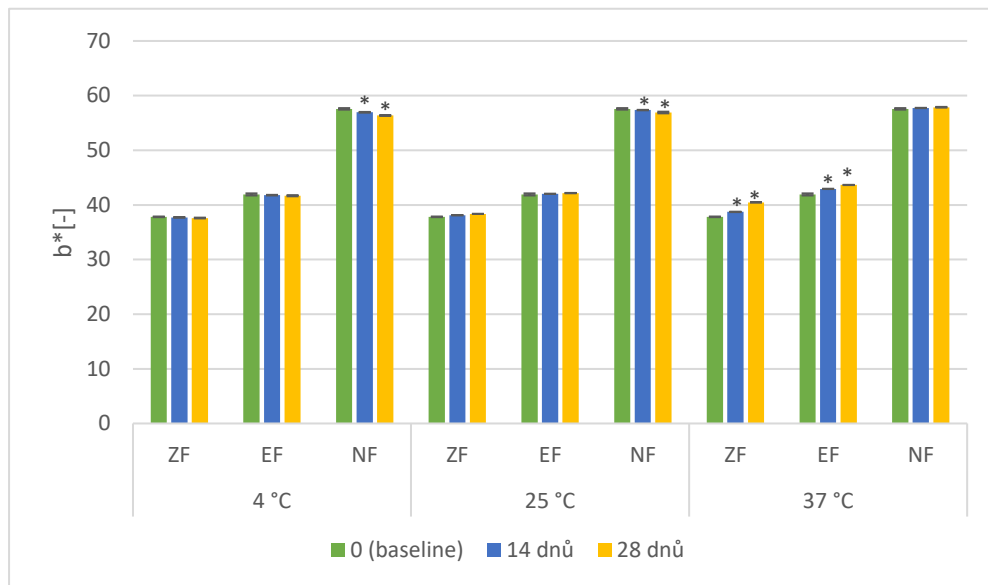
Kladné hodnoty parametru  $L^*$  znamenají bělejší (světlejší) barvu. Nejnížší hodnoty jasu byly zaznamenány u formulace NF při všech testovaných teplotách. Z grafického znázornění je patrné, že formulace skladovány ve 4 °C nevykazují změnu v jasu barvy během 28denního testování. Pouze formulace EF vykazuje mírný pokles jasu, avšak nejedná se o zásadní změnu. Z grafu je také zřejmé, že se zvyšující se teplotou a dobou skladování

se hodnoty jasu barvy u formulací EF a NF snižují. Formulace ZF vykazuje výraznější změny barvy až při teplotách skladování 37 °C, což by mohlo být ovlivněno také absencí kvercetinu ve formulacích.



Obrázek 22 Časová závislost parametru  $a^*$  na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Parametrem  $a^*$  je hodnocen přechod zelené a červené barvy. Záporné hodnoty parametru  $a^*$  vykazují silnější zelený odstín, naopak kladné hodnoty značí silnější červený odstín. Z grafického znázornění je zřejmé, že formulace NF vykazuje silný zelený odstín, jenž je však zvyšující se teplotou a dobou skladování snižován. Formulace EF vykazuje silnější zelený odstín v počátečním testování a při teplotě skladování 4 °C, avšak při vyšších teplotách 25 a 37 °C především po delší době skladování (28 dnů) dochází ke změně směrem k červenému odstínu. Tudíž lze konstatovat, že zabudování kvercetinu do formulací způsobuje zelený odstín, avšak se zvyšující se teplotou skladování je měněn.

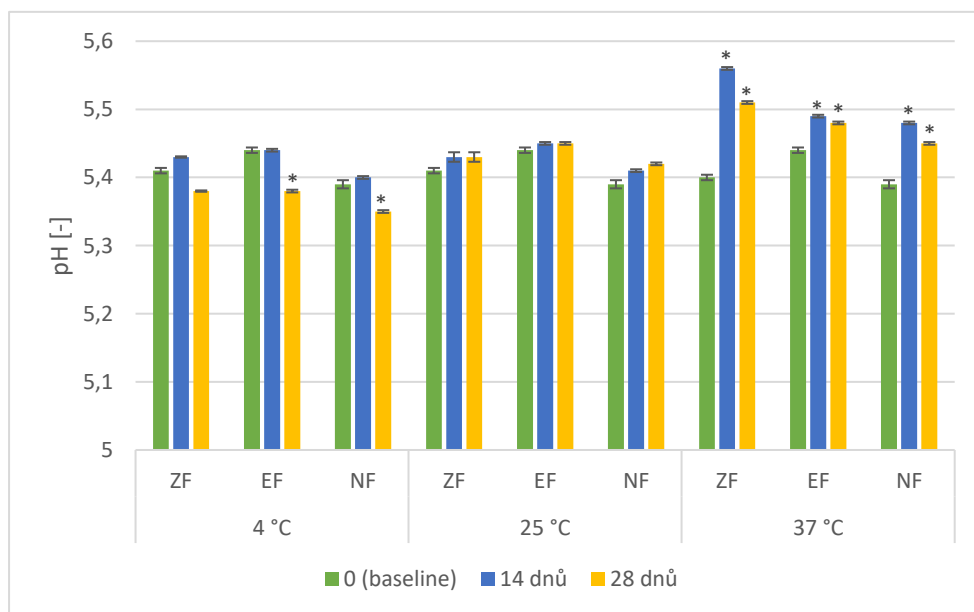


Obrázek 23 Časová závislost parametru  $b^*$  na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Kladné hodnoty parametru  $b^*$  vykazují silnější žlutý odstín vzorků, naopak záporné hodnoty silnější modrý odstín vzorků. Vzhledem ke žluté barvě formulací při měření parametru  $b^*$  nebyly zaznamenány výrazné změny v barvě formulací během stabilitního testování.

#### 6.4.2 Měření pH

Výsledky měření pH během stabilitních testů jsou graficky znázorněny na Obrázku 24. Pro viditelnost rozdílů mezi jednotlivými formulacemi je uvedeno pH v rozmezí od 5–5,6.

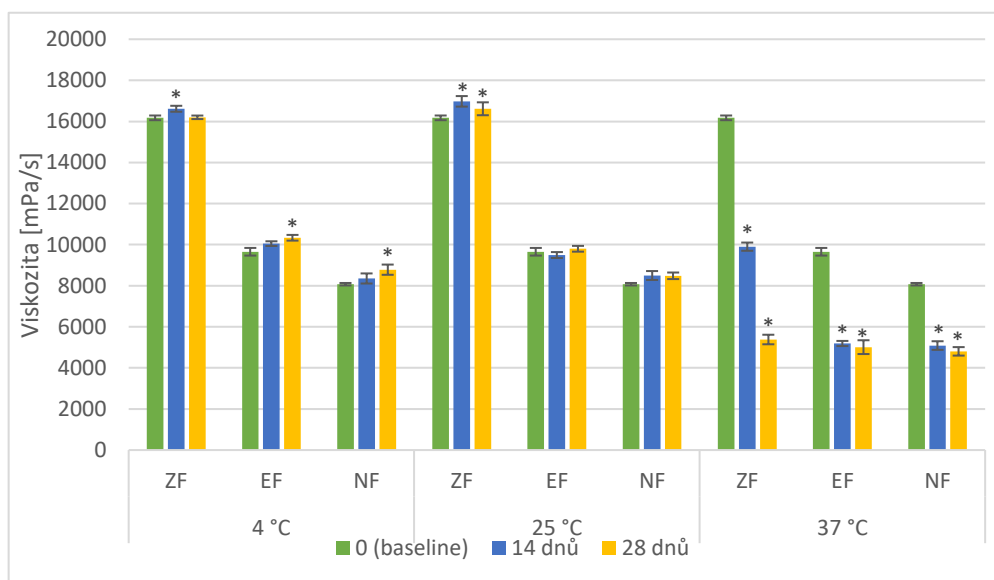


Obrázek 24 Časová závislost pH na formulacích a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Sady formulací uchovávané ve 4 a 25 °C nevykazovaly výrazné změny v hodnotách pH. Signifikantní změna pH byla detekována u formulací uchovávaných při 37 °C, kdy k největšímu nárůstu došlo po 14 dnech skladování. Z výsledků je patrné, že s rostoucí teplotou při uchovávání krémových formulací dochází k nárůstu hodnot pH. Hodnota pH v rozmezí od 4,5–5,5 byla překročena pouze v případě formulace ZF skladované při 37 °C po 14 dnech, konkrétně o 1,1 %.

### 6.4.3 Měření viskozity

K hodnocení fyzikální stability krémových formulací vystavených jednotlivým teplotám skladování byla sledována viskozita, viz Obrázek 25.



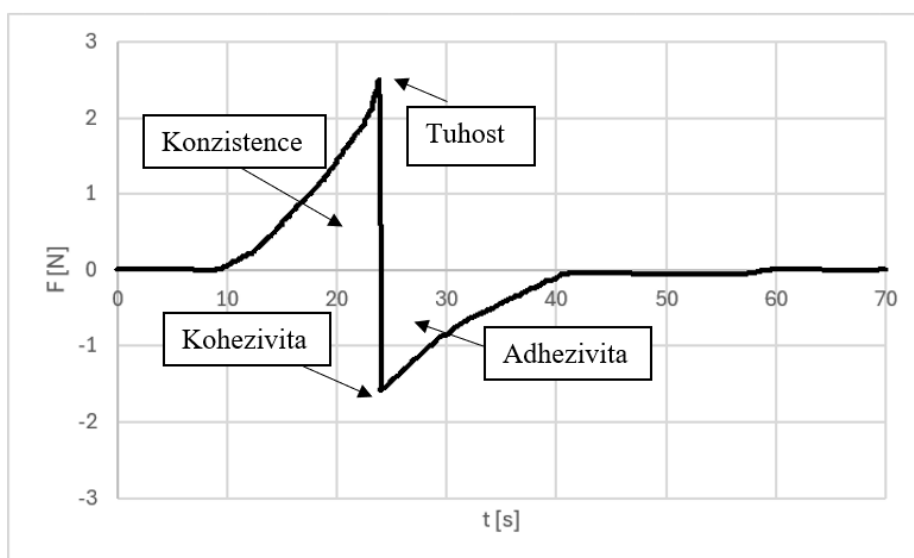
Obrázek 25 Časová závislost viskozity na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Nejvyšší viskozitu vykazovala formulace ZF, následována formulacemi EF a NF. V případě sad formulací uchovávaných při teplotách 4 a 25 °C nedošlo během 28denního testování k výrazným změnám ve viskozitě formulací. Patrnější změny jsou zaznamenány u teploty skladování 37 °C. Obecně platí, že viskozita klesá s rostoucí teplotou, což bylo potvrzeno i v tomto testování. Přesto však výsledné hodnoty jsou lehce zarážející, především u formulace ZF, při níž viskozita velmi rapidně klesla, a to o 40,5 % proti původní hodnotě, měřené v čase 0. Je možné, že kvercetin díky své teplotní odolnosti, přispívá k fyzikální stabilitě formulací. Viskozita formulací mohla být také ovlivněna například vzájemnou nekompatibilitou některých použitých ingrediencí.

#### 6.4.4 Měření texturních vlastností formulací

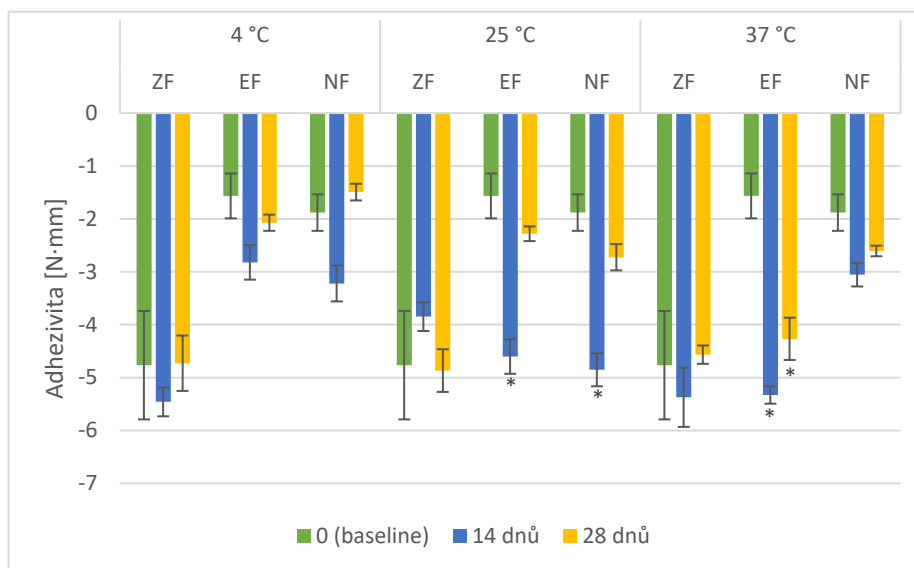
Textura je obecně definována jako vnitřní struktura či uspořádání materiálů, je vnímána především prostřednictvím hmatových či zrakových podnětů. V kontextu kosmetických přípravků představují texturní vlastnosti jeden z klíčových parametrů ovlivňující první dojem spotřebitele [121], [122]. Texturní vlastnosti připravených krémových formulací ovlivňují zejména zakomponovaný hydrokoloidní modifikátor viskozity (karbomer) či lipofilní zahušťovadla (včelí a rýžový vosk).

Testované formulace byly vystaveny jednomu cyklu deformace, ze kterého byla stanovena adhezivita, kohezivita, konzistence a tuhost formulací, viz Obrázek 26.



Obrázek 26 Modelová křivka jednoho cyklu deformace  
(zdroj: vlastní)

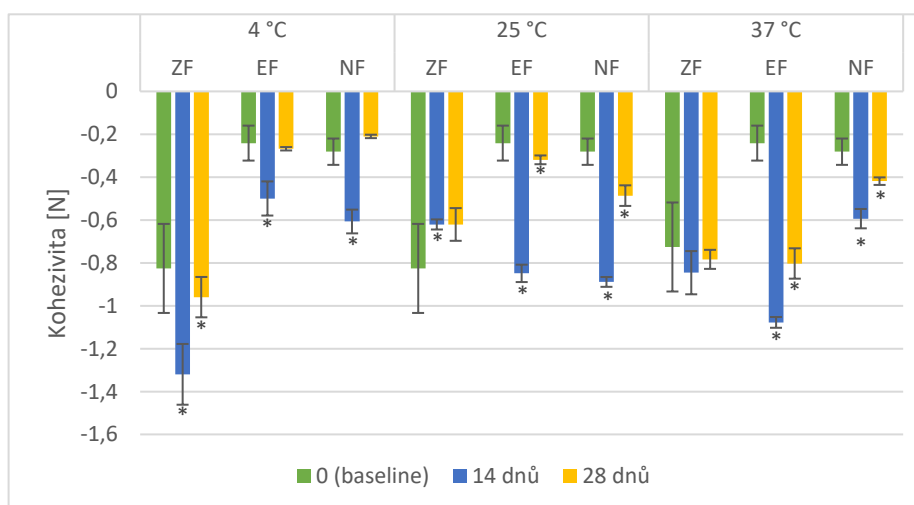
Adhezivita, známá také jako přilnavost, je síla potřebná k překonání vzájemných přitažlivých sil mezi dvěma povrchy [121], [122]. Adhezivita je graficky znázorněna na Obrázku 27.



Obrázek 27 Časová závislost adhezivita na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Z naměřených hodnot je zřejmé, že ZF bez zakomponovaného kvercetinu vykazovala vyšší adhezi při všech testovaných teplotách. Na hladině významnosti  $p \leq 0,05$  byl staticky významný nárůst v adhezivitě zaznamenán u formulace EF při teplotě skladování 25 °C po 14 dnech a při teplotě skladování 37 °C. U formulace NF byl staticky významný rozdíl zaznamenán při teplotě 25 °C po 14 dnech skladování.

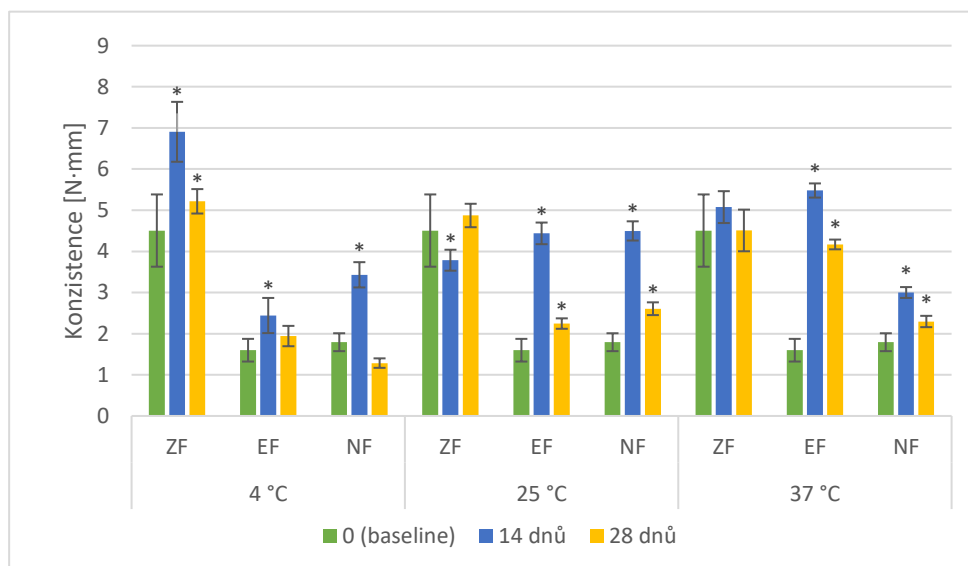
Kohezivita neboli soudržnost definuje síly držící všechny atomy či molekuly téže látky či tělesa pohromadě. Záporné hodnoty kohezivty značí větší odpor kladen vzorkem k vytlačení měřicí sondy čili větší soudržnost formulace [121], [122]. Získané naměřené hodnoty kohezivty pro jednotlivé formulace jsou graficky znázorněny na Obrázku 28.



Obrázek 28 Časová závislost kohezivty na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Z výsledků grafického znázornění je patrný trend postupného snižování hodnot kohezivity u jednotlivých formulací se zvyšující se skladovací teplotou. Formulace ZF skladovaná při 4 °C vykazovala nejnížší hodnoty kohezivity, což naznačuje nejvyšší míru vnitřní soudržnosti v porovnání s ostatními formulacemi. Nejvýraznější změny v kohezivitě byly zaznamenány u formulace EF. Po 14 dnech skladování při 25 °C došlo u této formulace k nárůstu kohezivity o 70 % ve srovnání s formulací uchovávanou při 4 °C. Při skladování v 37 °C byla zaznamenána další zvýšená hodnota kohezivity o 27 % oproti hodnotám dosaženým při 25 °C.

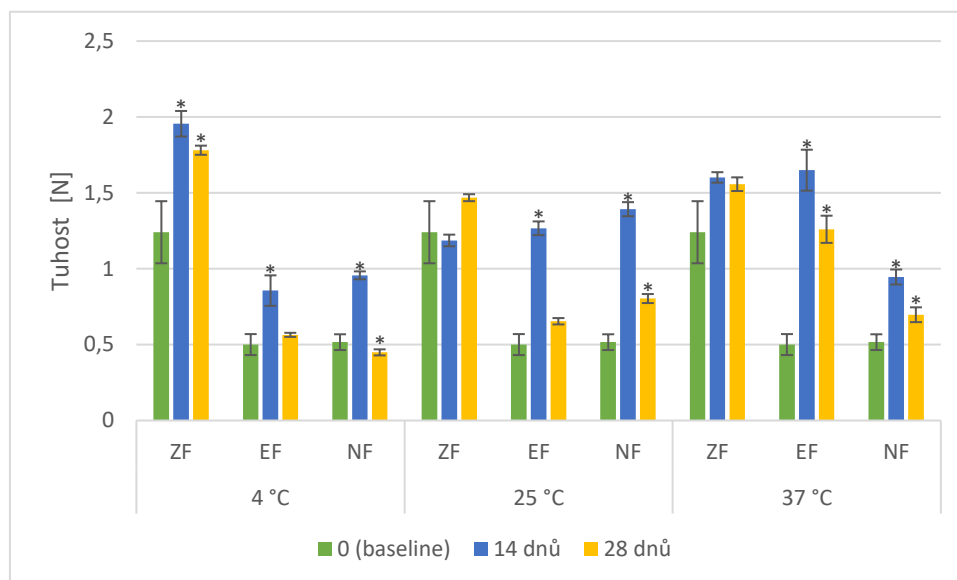
Dalším hodnoceným parametrem v rámci měření texturních vlastností formulací byla konzistence, viz Obrázek 29.



Obrázek 29 Časová závislost konzistence na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Nejvyšší hodnoty konzistence byly opakovaně zaznamenány u formulace ZF, což může poukazovat na její kompaktní a homogenní strukturu. Z výsledků je rovněž patrný trend, že s rostoucí skladovací teplotou dochází ke zvyšování hodnot konzistence, což může odrážet teplotně indukované změny v uspořádání vnitřní struktury formulací. Jako statisticky signifikantní byly vyhodnoceny hodnoty konzistence u formulace EF po 14 dnech skladování a u formulací ZF a NF napříč celým sledovaným obdobím při teplotě 4 °C. Podobný trend byl pozorován při skladování v 25 °C a 37 °C, kde byly signifikantní změny identifikovány u formulace EF a opět u formulace NF během celého měření.

V neposlední řadě byla texturním měřením hodnocena také tuhost, Obrázek 30. Tuhost formulací definuje maximální kladnou sílu potřebnou k deformaci formulace. Vyšší hodnoty značí například obtížnější roztíratelnost formulací [121].



Obrázek 30 Časová závislost tuhosti na typu formulace a teplotách skladování (\* $p \leq 0,05$ )

Při hodnocení parametru tuhosti krémových formulací byly nejvyšší naměřené hodnoty opakovaně zaznamenány u formulace ZF. Všechny testované formulace vykazovaly po 28 dnech skladování nárůst tuhosti, což indikuje časově závislé změny ve strukturním uspořádání systému, vedoucí k jeho postupnému zpevnění. Překvapivě k mírnému nárůstu tuhosti docházelo již při nižších skladovacích teplotách, konkrétně při 4 °C a 25 °C. Při teplotě 4 °C byl tento trend pozorován u formulací ZF a NF po celou dobu testování a u formulace EF po 14 dnech. Obdobný vývoj byl zaznamenán také u formulací EF a ZF skladovaných při 25 °C. Při skladování v teplotě 37 °C byl nárůst tuhosti zaznamenán u formulací EF a NF v průběhu celého měřeného období. U formulace ZF nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi hodnotami při 25 °C a 37 °C, což může poukazovat na její vyšší teplotní stabilitu z hlediska mechanických vlastností.

Formulace, s výjimkou ZF skladované při 25 °C, vykazovaly charakteristický trend změn texturních vlastností pro emulzní systémy v průběhu sledovaného období. V čase 0 byly zaznamenány nejnižší hodnoty, po 14 dnech došlo ke zvýšení a po 28 dnech následoval opětovný pokles. Tento nelineární trend je běžně popisován u emulzních systémů, který je interpretován jako počáteční stabilizace vnitřní struktury následovaná její postupnou degradací. Nízké počáteční hodnoty mohou být důsledkem neúplného ustálení mikrostruktury systému, zejména při zakomponování složek, jako jsou hydrokoloidy (karbomer) či lipofilní zahušťovadla (vosky). V prvních dnech po přípravě mohou navíc formulace podléhat mezifázovému napětí, které může být projevoováno nerovnoměrným

rozložením dispergované fáze. Nárůst hodnot po 14 dnech může být interpretován jako výsledek změny struktury a stability formulací. Naproti tomu pokles hodnot po 28 dnech lze přisuzovat zahájení degradačních procesů, mezi něž lze zařadit koalescenci dispergovaných kapek, oxidaci lipidových složek či ztrátu vody, což v konečném důsledku může ovlivňovat texturní vlastnosti formulací [123], [124].

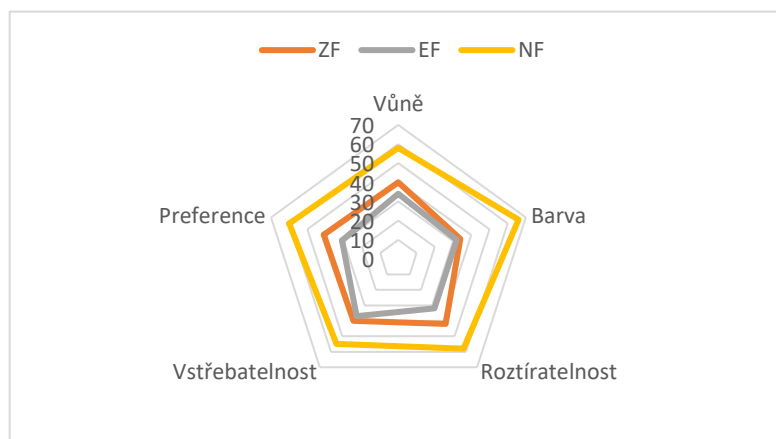
Na základě výsledků měření texturních vlastností krémových formulací lze konstatovat, že zakomponování kvercetinu do systému vedlo ke snížení hodnot ve srovnání s formulací ZF, která kvercetin neobsahovala. Při srovnání vlivu forem kvercetinu na texturní vlastnosti krémových formulací nebyly při skladovacích teplotách 4 °C a 25 °C zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi volnou či enkapsulovanou formou. Při skladovací teplotě 37 °C však formulace EF vykazovala vyšší hodnoty konzistence a tuhosti a zároveň nižší hodnoty adhezivitu a kohezivitu ve srovnání s formulací NF. Díky této skutečnosti byla potvrzena vyšší chemická a fyzikální stabilita kvercetinu enkapsulovaného v nosiči při vyšších teplotních podmínkách skladování.

## 6.5 Senzorické testy

K hodnocení organoleptických vlastností modelových formulací byly zvoleny pořadové a párové porovnávací zkoušky.

### Pořadové zkoušky

U zakódovaných vzorků krémových formulací byly pořadovými intenzitními zkouškami hodnoceny znaky jako vůně, barva, roztíratelnost a vstřebatelnost. Tyto zkoušky doplňoval test osobní preference jednotlivých hodnotitelů. Výsledky pořadových zkoušek jsou uvedeny na Obrázku 31 jako součty pořadí pro jednotlivé hodnocené parametry.



Obrázek 31 Vyhodnocení pořadových zkoušek senzorického hodnocení formulací

Mezi hodnocenými formulacemi na základě intenzity znaku vůně, barvy, roztíratelnosti, vstřebatelnosti či osobní preference hodnotitelů byly nalezeny staticky významné rozdíly na hladině významnosti  $p \leq 0,05$  pomocí Neményiho metody. Ve všech sledovaných znacích byl největší rozdíl zaznamenán mezi formulacemi ZF:NF a EF:NF.

#### Párové porovnávací zkoušky

Párovými porovnávacími zkouškami byly hodnoceny rozdíly mezi jednotlivými formulacemi v roztíratelnosti, vstřebatelnosti či osobní preferenci testovaných krémových formulací. Mezi sebou byly porovnávány dvojice formulací EF:ZF, ZF:NF, EF:NF. Párové porovnávací zkoušky byly hodnoceny na hladině významnosti  $p \leq 0,05$  jednostranným testem. Rozdíly byly shledány v roztíratelnosti, vstřebatelnosti či osobní preferenci hodnotitelů mezi formulacemi ZF:NF a EF:NF, rozdíly mezi formulacemi EF:ZF, prokázány nebyly. Výsledky párových porovnávacích zkoušek viz Tabulka 4 korelují s výsledky získanými pořadovými zkouškami.

Tabulka 4 Součty pořadí párových porovnávacích zkoušek pro senzorické hodnocení formulací

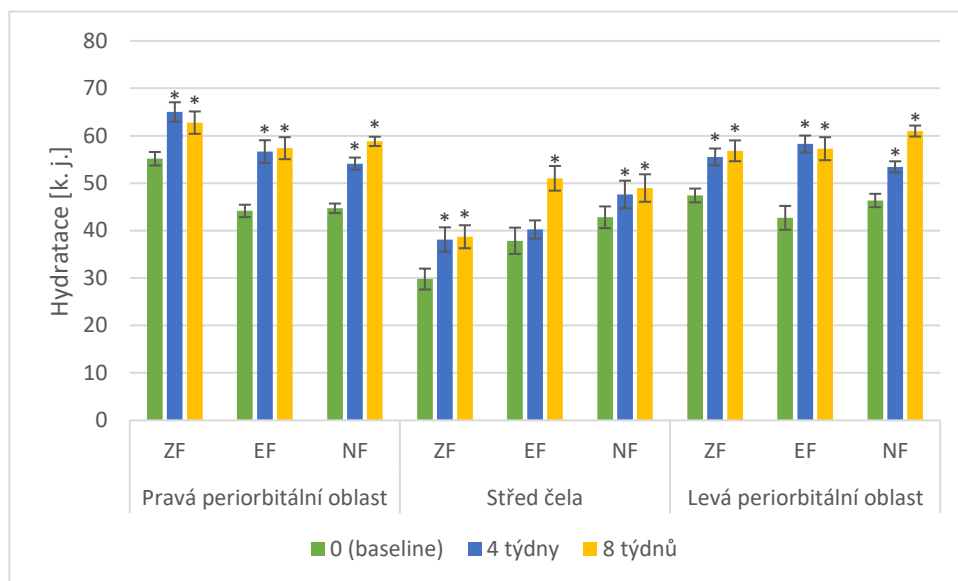
| Formulace    | Roztíratelnost | Vstřebatelnost | Preference |
|--------------|----------------|----------------|------------|
|              | Součet pořadí  |                |            |
| <b>ZF:NF</b> | 17:5           | 16:6           | 20:2       |
| <b>EF:ZF</b> | 13:9           | 14:8           | 14:8       |
| <b>EF:NF</b> | 20:2           | 17:5           | 20:2       |

## 6.6 *In vivo* testování formulací

*In vivo* testování bylo provedeno za účelem ověření účinku připravených krémových formulací. Testování bylo provedeno na 15 dobrovolnicích, ve třech časových intervalech, v čase 0 a následně po 4 a 8 týdnech pravidelného používání přidělených formulací. Účinky byly pozorovány na základě měření hydratace, TEWL a pH pokožky, v čase 0 a po 8 týdnech doplněnými také o měření elasticity, množství pórů, pigmentových skvrn a vrásek či snímání replik reliéfu pokožky.

### 6.6.1 Vyhodnocení korneometrie a tewametrie

Korneometr pracuje na principu detekce změn v dielektrických vlastnostech *SC*, které přímo souvisejí s jejím obsahem vody. Vzhledem k tomu, že voda disponuje výrazně vyšší dielektrickou konstantou (přibližně 81) ve srovnání s ostatními složkami pokožky (typicky <7), má i malé zvýšení hydratace zásadní vliv na výslednou kapacitní odezvu měřenou přístrojem [125]. Výsledné hodnoty jsou vyobrazeny na Obrázku 32.



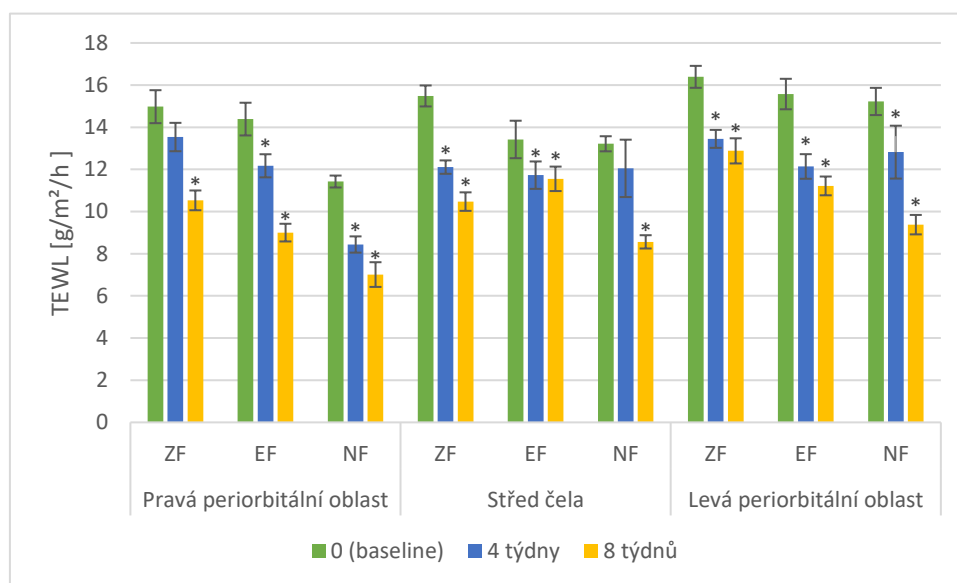
Obrázek 32 Časová závislost hydratace na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )

Na základě výchozích hodnot měření lze pokožku dobrovolnic, s výjimkou pravé periorbitální oblasti u skupiny testující formulaci ZF, klasifikovat jako suchou, v rozmezí 30–45 k. j. Po osmitýdenním pravidelném používání testovaných formulací byly ve většině sledovaných oblastí zaznamenány hodnoty odpovídající normálně hydratované pokožce (>45 jednotek) [100]. Výjimku tvořila oblast středu čela u skupiny využívající formulaci ZF, kde hodnoty i nadále odpovídaly suchému typu pokožky.

Ve všech sledovaných oblastech byl vlivem pravidelného používání připravených formulací zaznamenán nárůst hydratace. Výsledné hodnoty korelují s předpokládaným účinkem, jelikož formulace obsahovaly bohaté zastoupení hydratačních látek. Největší nárůst hydratace byl zaznamenán v periorbitálních oblastech u dobrovolnic používajících formulace EF a NF. Signifikantní změna v hydrataci byla zpozorována také u středu čela při využívání formulace EF, kde došlo ke zvýšení hydratace po 8 týdnech testování o 35 % ve srovnání s původně měřenou hodnotou. Je však nutné zohlednit, že hydratace pokožky může být ovlivněna celou řadou faktorů, včetně životního stylu, pitného režimu, psychického stresu či hormonálních změn. Dále je třeba zohlednit klimatické podmínky, neboť počáteční

měření bylo prováděno v únoru a závěrečné v dubnu, kdy dochází ke zvyšování teploty a vlhkosti vzduchu, což může přispívat ke zvýšené hydrataci pokožky [126].

Tewametrie slouží k neinvazivnímu stanovení TEWL, která představuje množství vodních par difundujících z pokožky do okolního prostředí. Tewametr pracuje na principu difuzní otevřené komory. Přístroj je vybaven dvěma senzory, jenž snímají relativní vlhkost a teplotu vodní páry ve dvou výškách nad povrchem pokožky. Z rozdílu hodnot je vyhodnocen gradient parciálního tlaku vodní páry, čímž je určena rychlost difuze [127]. Získané hodnoty pro TEWL jsou uvedeny na Obrázku 33.



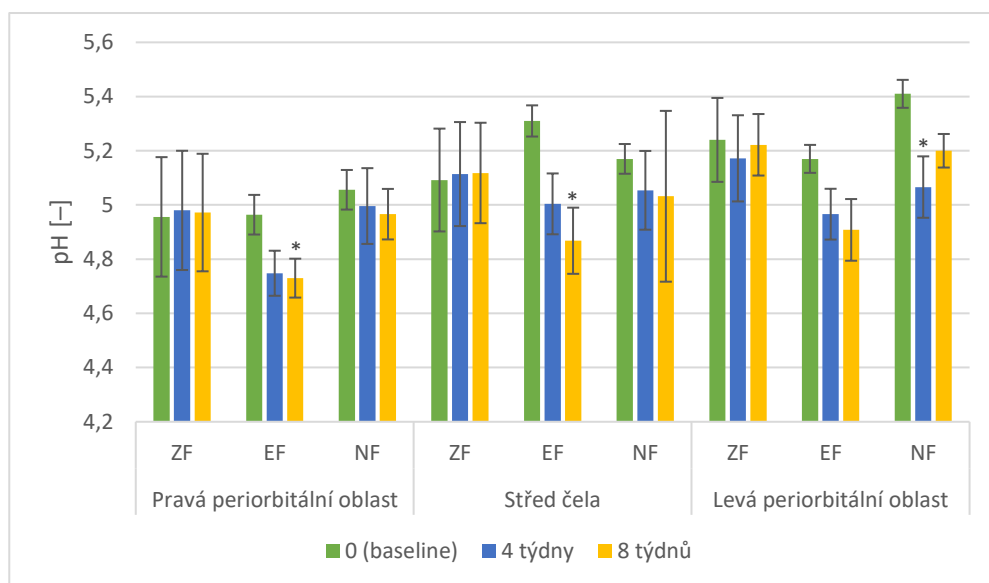
Obrázek 33 Časová závislost TEWL na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )

Na základě získaných výchozích hodnot byl stav bariérové funkce u dobrovolnic klasifikován jako dobrý či fyziologicky normální. V rámci osmi týdenní aplikace připravených formulací byla zpozorována žádoucí schopnost snížení hodnot TEWL ve všech sledovaných místech. U skupiny dobrovolnic testujících NF, došlo po osmi týdenní aplikaci ke snížení hodnot TEWL pod  $10 \text{ g/m}^2/\text{h}$ , což odpovídá optimálně fungující epidermální bariéře [100]. Z těchto důvodů je možné NF vyhodnotit jako nejúčinnější formulaci s ohledem na bariérovou účinnost. U skupiny dobrovolnic testující formulaci EF byl obdobný trend zaznamenán v pravé periorbitální oblasti.

Přímé studie monitorující hydrataci či bariérovou funkci po aplikaci topických formulací s kvercetinem jsou omezené. Dostupné výzkumy [128], [129] však naznačují, že kvercetin je schopen ovlivňovat kožní bariéru, což by mohlo vést ke zvýšení hydratace pokožky, snížení TEWL a celkovému zlepšení stavu pokožky.

### 6.6.2 Vyhodnocení pH-metrie

Měřicí sonda pH metr® 905 je tvořena skleněnou elektrodou, která reaguje na aktivitu  $H^+$  iontů a referenční elektrodou, jež zajišťuje stabilní srovnávací potenciál. Zařízení umožňuje měření na desetiny pH jednotek [130]. Za normálních podmínek odpovídá pH pokožky mírně kyselému rozmezí, přibližně mezi 4,5 a 5,5. Toto rozmezí je zásadní pro udržení homeostázy pokožky, správného fungování kožní bariéry, rovnováhy mikrobiomu a ochrany proti patogenům. Kyselé pH přispívá také k optimální aktivitě enzymů zodpovědných za diferenciaci keratinocytů a obnovu kožní bariéry. Změny pH mohou být spojeny s narušením kožní bariéry a jsou často pozorovány u dermatologických onemocnění, jako je atopická dermatitida, akné či různé formy ekzémů [131]. Získané hodnoty pH v rámci testování *in vivo* jsou uvedeny na Obrázku 34.



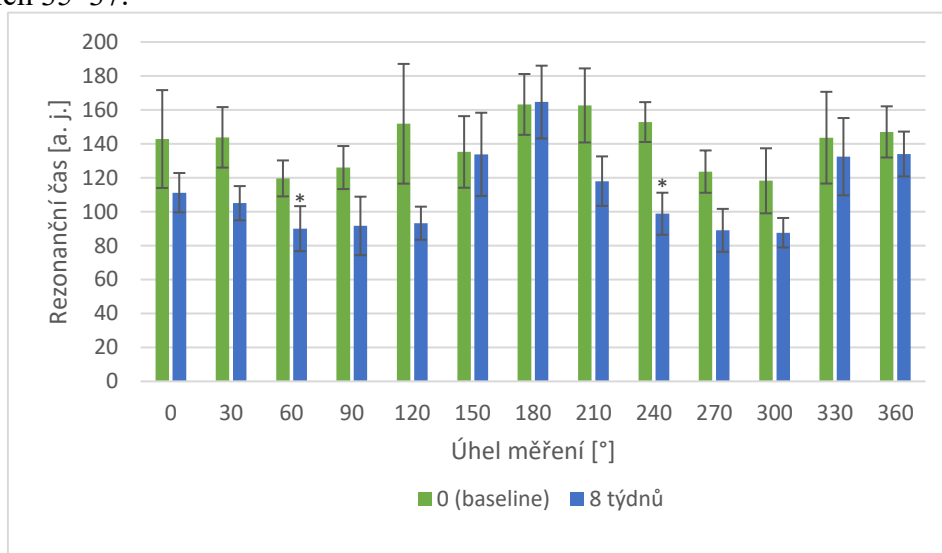
Obrázek 34 Časová závislost pH na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )

Z výsledných hodnot je zřejmý klesající trend hodnot pH u skupin dobrovolnic testujících formulace EF a NF. Významný pokles byl zaznamenán u skupiny dobrovolnic po osmi týdenní aplikaci formulace EF v pravé periorbitální oblasti a ve středu čela a po čtyř týdenní aplikaci formulace NF v levé periorbitální oblasti. Získané hodnoty pH naznačují možný biologický účinek kvercetinu.

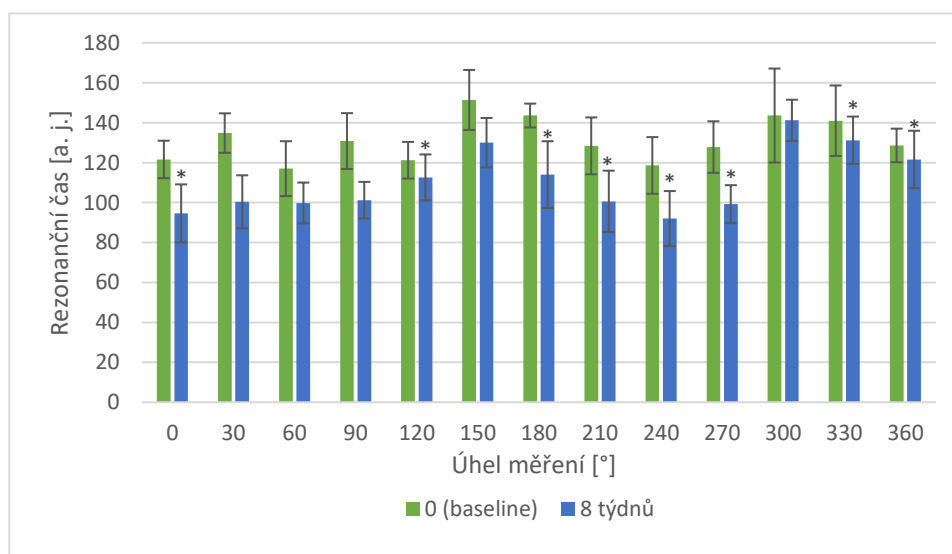
Kvercetin nevykazuje kyselé hodnoty pH, avšak jeho zakomponování do formulací a jejich následné aplikování mohlo pH pokožky ovlivnit nepřímo. Kvercetin podporuje regeneraci kožních buněk a tlumí zánět, což může zlepšit funkci pokožky. Funkční kožní bariéra je poté schopna lépe udržet přirozeně kyselé prostředí pokožky. Také díky jeho antimikrobiálním účinkům napomáhá k obnovení zdravého mikrobiomu kůže [132].

### 6.6.3 Vyhodnocení reviskometrie

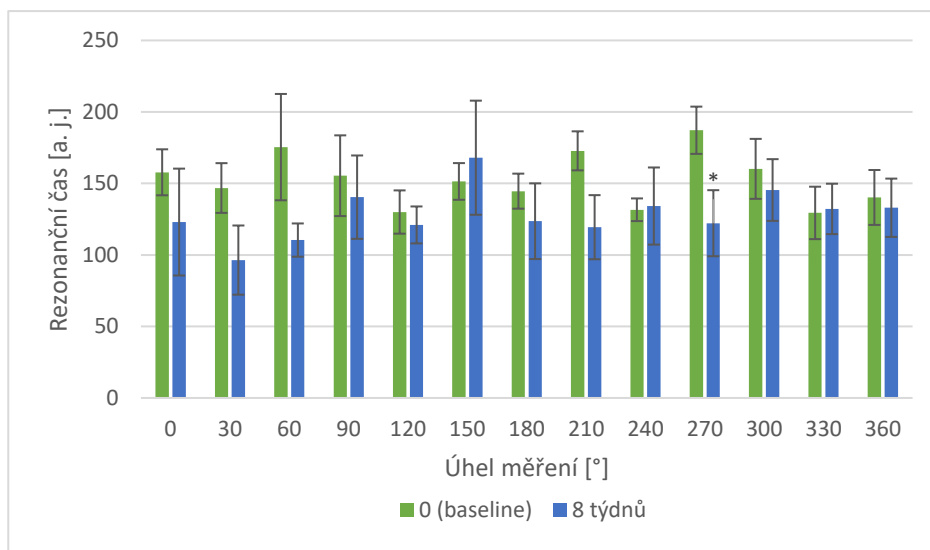
Princip reviskometrie spočívá v aplikaci krátkého mechanického impulsu na povrch kůže, jenž je následně schopen vyvolat rázovou vlnu v *epidermis* a *dermis*. Reviscometer® RVM 600, sleduje rychlost a amplitudu šíření této vlny mezi dvěma senzory vzdálenými 2 mm. Vlny jsou kůží šířeny v rezonančním čase, jenž je závislý na stavu pokožky, konkrétně na stavu elastických vláken a hydrataci. Kratší hodnoty rezonančního času vykazují vyšší elasticitu kůže [133]. Pro účely grafického vyhodnocení byla vybrána oblast středu čela, z důvodu nejvýraznějších zaznamenaných změn v elasticitě kůže před aplikací testovaných formulací a po jejím ukončení. Rezonanční časy pro sledovanou oblast jsou znázorněny na Obrázcích 35–37.



Obrázek 35 Časová závislost elasticity pokožky po aplikaci formulace ZF (\* $p \leq 0,05$ )



Obrázek 36 Časová závislost elasticity pokožky po aplikaci formulace EF (\* $p \leq 0,05$ )



Obrázek 37 Časová závislost elasticity pokožky na formulaci NF (\* $p \leq 0,05$ )

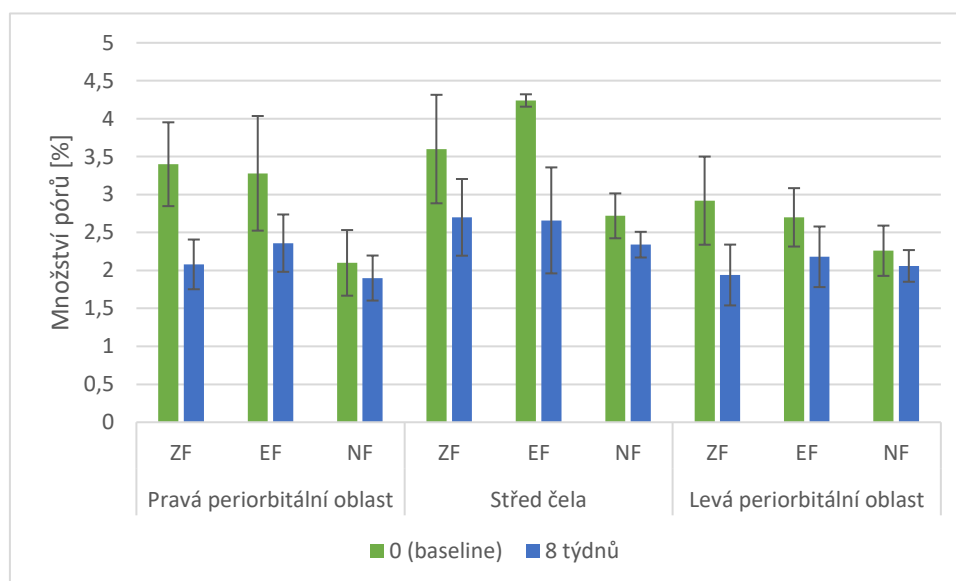
Ze získaných dat je možné pozorovat pozitivní anti-aging účinky testovaných formulací. U všech testovaných krémů došlo vlivem osmitýdenního testování k poklesu rezonančních časů, což odráží zvýšení elasticity a snížení anizotropie mechanických vlastností pokožky. Výjimkou byl mírný nárůst rezonančních časů u formulace ZF při 180° a u formulace NF při 150° a 330°, avšak tyto změny nebyly statisticky významné. Nejvíce signifikantních rozdílů vykazovala pokožka dobrovolnic aplikujících formulaci EF. Na základě získaných dat lze formulaci EF vyhodnotit jako nejúčinnější z hlediska pozitivního vlivu na elasticitu pokožky.

V klinické studii [134] byl zkoumán vliv krému obsahujícího kvercetin získaný z dubu s SPF 15. Studie zahrnovala 32 žen ve věku 45–60 let, jež aplikovaly krém 2krát denně po dobu 60 dnů. Výsledky studie naznačily výrazné zlepšení elasticity pokožky, snížení vrásek a zvýšení hladkosti pokožky již po 30 dnech testování. Více než 90 % účastnic zaznamenalo také subjektivní zlepšení pružnosti a textury pleti po 60 dnech. Získaná data jsou v souladu s výsledky provedené studie.

#### 6.6.4 Vyhodnocení visioskopie

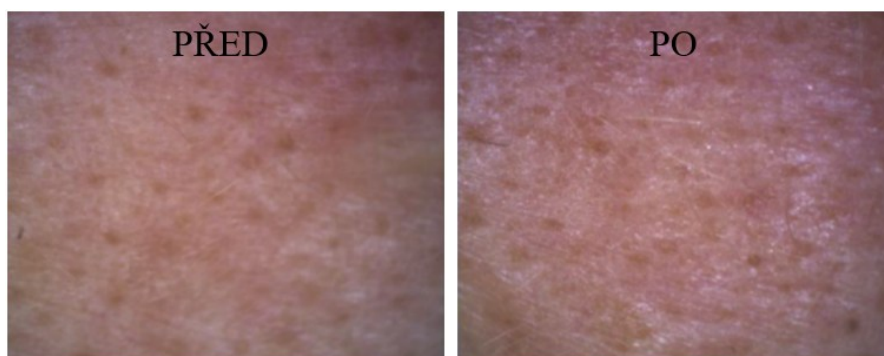
Visioskopie je v zásadě fotografická metoda používaná k hodnocení stavu pokožky. Visioscope® PC 35 je ruční digitální mikroskop umožňující analýzu povrchu pokožky při třicetinásobném zvětšení, s možností volby paralelního či křížového polarizovaného osvětlení. Jedná se o neinvazivní metodu sloužící k rychlému a detailnímu zobrazení struktury kůže [135]. Bylo hodnoceno množství pórů, pigmentových skvrn a vrásek

jednotlivých dobrovolnic. Vyhodnocení vlivu jednotlivých formulací na sledované parametry je uvedeno na Obrázcích 38–46.



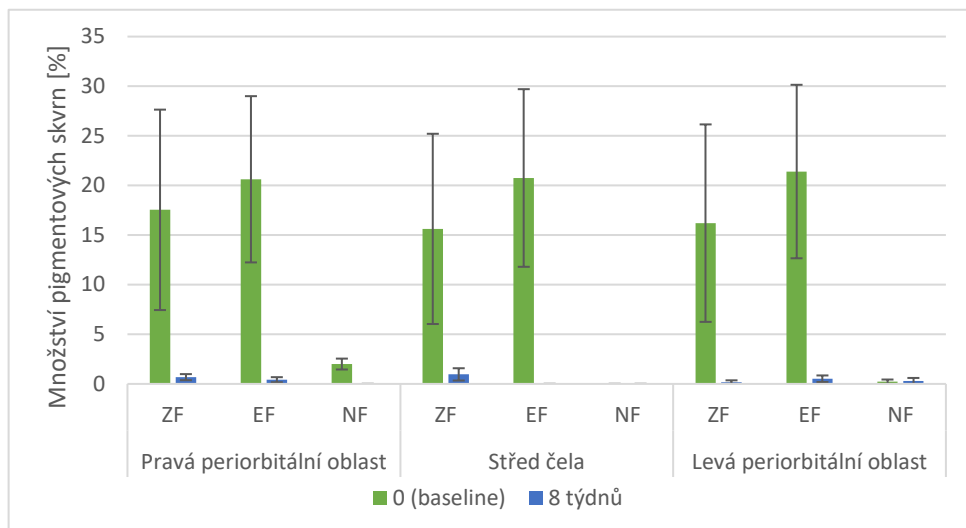
Obrázek 38 Časová závislost množství pórů na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )

Z grafu je patrné, že připravené formulace měly pozitivní vliv na redukci pórů pokožky. Nejvýraznější klesající trend byl zaznamenán u skupiny dobrovolnic testujících formulaci ZF (viz Obrázek 39), a rovněž u skupiny dobrovolnic používajících formulaci EF ve sledované oblasti středu čela. Naměřené hodnoty však nevykazují statisticky významné rozdíly.



Obrázek 39 Množství pórů před a po 8 týdnech aplikace formulace ZF ve středové části čela  
(zdroj: vlastní)

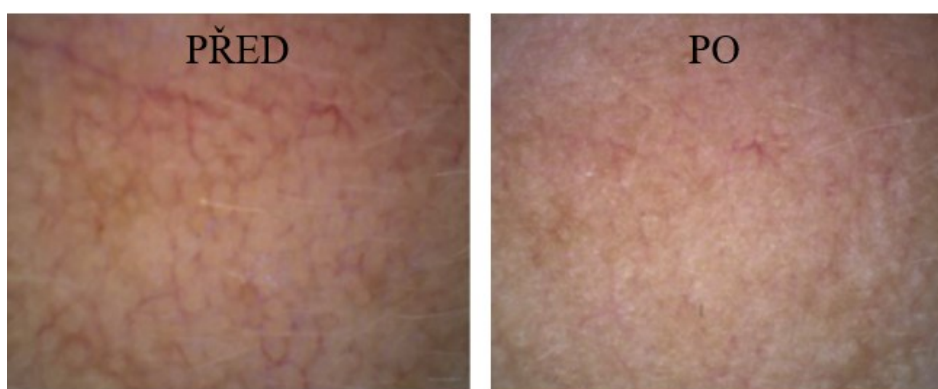
Dalším visioskopicky sledovaným parametrem bylo množství pigmentových skvrn. Z grafu je patrný výrazný pokles jejich množství, přičemž formulace EF v testované oblasti středu čela redukovala pigmentové skvrny zcela, viz Obrázek 40–42.



Obrázek 40 Časová závislost množství pigmentových skvrn na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )



Obrázek 41 Množství pigmentových skvrn před a po 8 týdnech aplikace formulace EF ve středové části čela  
(zdroj: vlastní)



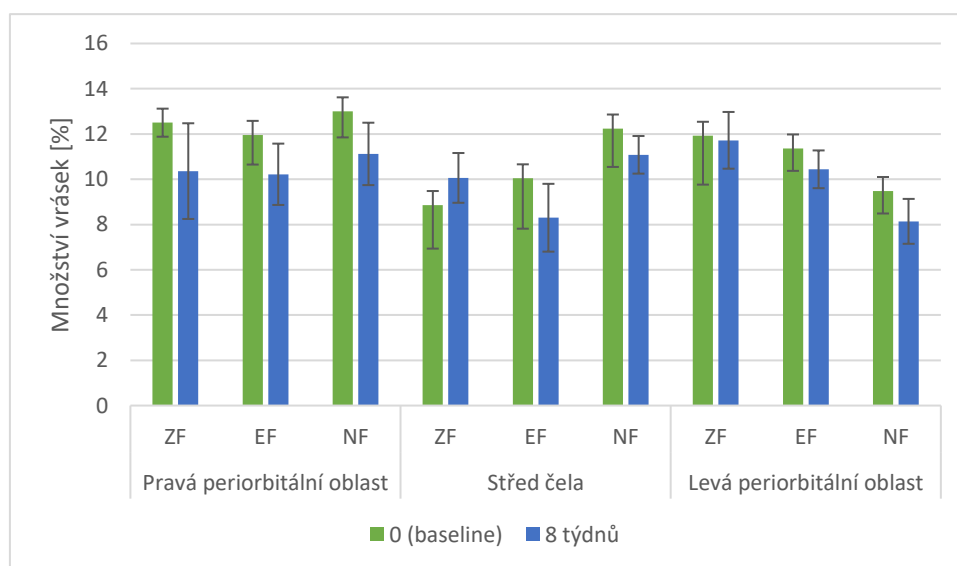
Obrázek 42 Množství pigmentových skvrn před a po 8 týdnech aplikace formulace EF ve středové části čela  
(zdroj: vlastní)

Do složení připravených formulací bylo začleněno značné množství látek s prokázanými depigmentačními účinky, konkrétně koenzym Q10, vitamin E, extrakt z aloe vera a ve formulacích EF a NF také kvercetin. Výrazná redukce pigmentových skvrn

pozorovaná v průběhu studie naznačuje možnost synergického účinku těchto aktivních látek při inhibici tvorby melaninu.

Potenciál koenzymu Q10 jako depigmentačního činidla byl prokázán například ve studii [136], kde testováním *in vivo* bylo zjištěno, že prostřednictvím inhibice aktivity tyrozinázy a snížení produkce melaninu v kožních buňkách dochází k redukci pigmentace. Účinnost vitaminu E při snižování pigmentace byla zmíněna ve výše uvedené studii [78]. Ve studii [137] byl identifikován aloesin, účinná složka extraktu z aloe vera, jako inhibitor tyrozinázy, přičemž výsledky studie potvrdily jeho potenciál jako účinné látky vedoucí ke snížení pigmentace pokožky. Formulace obsahující kvercetin mohou vykazovat výraznější účinek na redukci pigmentových skvrn, jelikož ve studii [138] byla prokázána jeho schopnost významně inhibovat aktivitu tyrozinázy – klíčového enzymu melanogeneze. Inhibice vedla ke statisticky významnému snížení obsahu melaninu, což potvrzuje potenciální využití kvercetinu jako účinné látky pro zesvětlení pokožky a redukci pigmentových skvrn.

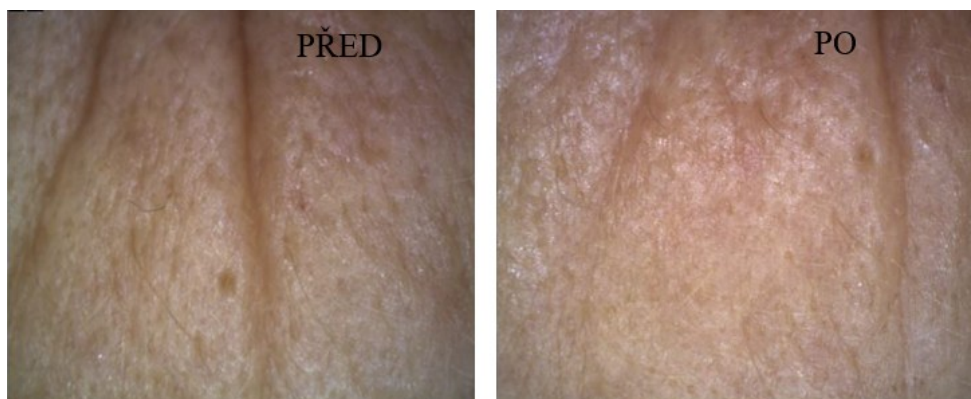
V neposlední řadě bylo za pomoci visioskopie hodnoceno také množství vrásek ve sledovaných oblastech v závislosti na používání jednotlivých formulací, uvedeno na Obrázku 43.



Obrázek 43 Časová závislost množství vrásek na typu formulace (\* $p \leq 0,05$ )

Pozitivní vliv formulace ZF na množství vrásek byl prokázán pouze v pravé periorbitální oblasti. Z grafu je patrný klesající trend u souboru dobrovolnic testujících formulace s obsahem kvercetinu, EF a NF. Z výsledků rovněž vyplývá, že formulace EF ve srovnání s formulací NF vykazuje výraznější redukci množství vrásek během osmi

týdenního období testování, a to ve sledovaných oblastech pravé periorbitální oblasti a střední části čela.



Obrázek 44 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace  
formulace NF v pravé periorbitální oblasti  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 45 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace  
formulace NF ve středu čela  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 46 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace  
formulace EF v levé periorbitální oblasti  
(zdroj: vlastní)

Do připravovaných formulací bylo začleněno široké spektrum látek vykazujících antioxidační vlastnosti, viz Tabulka 1 Složení krémových formulací. Podobně jako v případě redukce pigmentových skvrn lze předpokládat synergický účinek jednotlivých aktivních látek. V rámci testování jednotlivých formulací byl v této práci potvrzen anti-aging účinek, projevující se především ve zpomalení projevů stárnutí pleti.

### 6.6.5 Vyhodnocení visiometrie

Skin Visiometr® SV 700 je přístroj, jenž používá optické profilometrické měření pro analýzu mikrostruktury pokožky. Na testovanou oblast pokožky je nanесena silikonová replika, která kopíruje její povrch. Tato replika je poté osvětlena LED světlem, obvykle bílým či modrým, pod různými úhly v černobílé CCD kameře, která snímá odražené světlo a vytváří vysoce detailní 2D nebo 3D obraz pokožky. Software pak analyzuje tento obraz a generuje data, která popisují texturu pokožky. V diplomové práci byl pro tvorbu replik použit dvousložkový silikon s modrým pigmentem, který rychle absorbuje světlo. Množství absorbovaného světla závisí na tloušťce silikonové repliky [139]. V rámci visometrického měření byly testovány parametry drsnosti pokožky R1 definující vzdálenost mezi nejvyšším a nejnižším vrcholem, R2 udávající maximální drsnost, R3 představující drsnost průměrnou, R4 definující hladkost prohlubní reliéfu a R5 udávající aritmetický průměr drsnosti, viz Tabulka 5, či hustota a anizotropie pokožky, viz Tabulka 6. Fotografické záznamy z visioskopu hodnotící účinnost testovaných formulací na sledované vlastnosti pokožky, jsou uvedeny na Obrázcích 47–52.

Tabulka 5 Vyhodnocení změn parametrů drsnosti (\* $p \leq 0,05$ )

| Měřená oblast              | Formulace | Změna parametru drsnosti [%] |        |        |       |        |
|----------------------------|-----------|------------------------------|--------|--------|-------|--------|
|                            |           | R1                           | R2     | R3     | R4    | R5     |
| Pravá periorbitální oblast | ZF        | -9,7                         | -29,2  | -34,7  | +18,8 | 0,0    |
|                            | EF        | -31,1                        | -37,2  | -23,6  | -9,1  | -46,7  |
|                            | NF        | -29,8                        | -41,2  | -37,8  | +2,6  | -15,4  |
| Střed čela                 | ZF        | +6,4                         | +12,1  | +22,0  | -8,6  | 0,0    |
|                            | EF        | -35,9*                       | -42,0* | -31,9* | -15,8 | -46,2* |
|                            | NF        | -28,1                        | -22,2  | -19,6  | -21,4 | -40,0  |
| Levá periorbitální oblast  | ZF        | +23,4                        | +5,5   | +2,7   | +35,5 | +35,5  |
|                            | EF        | -29,9*                       | -34,7  | -28,3* | -14,0 | -20,0  |
|                            | NF        | +7,7                         | +21,8  | +19,8  | +19,4 | +20,8  |

Statisticky významné změny byly identifikovány na pokožce ošetřované formulací EF, a to ve středu čela (parametry R1, R2, R3 a R5) a v levé periorbitální oblasti u parametrů R1 a R3. Nejvýraznější pozitivní účinek byl zaznamenán ve středu čela, kde po její osmitýdenní aplikaci došlo ke snížení maximální drsnosti pokožky (R2) o 42 % a k poklesu aritmetického průměru drsnosti (R5) o 46,2 %.

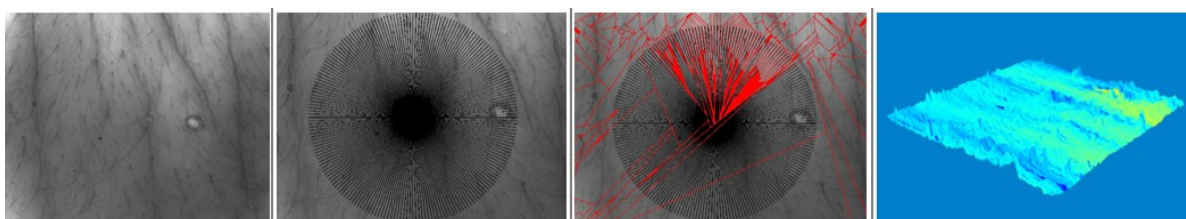
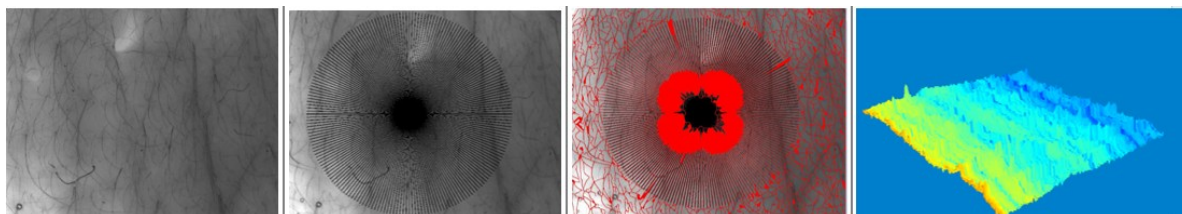
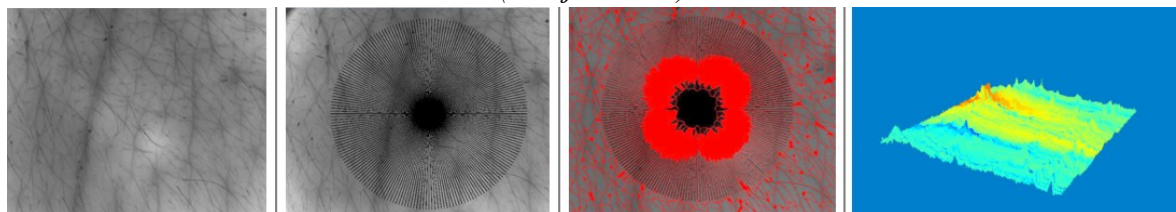
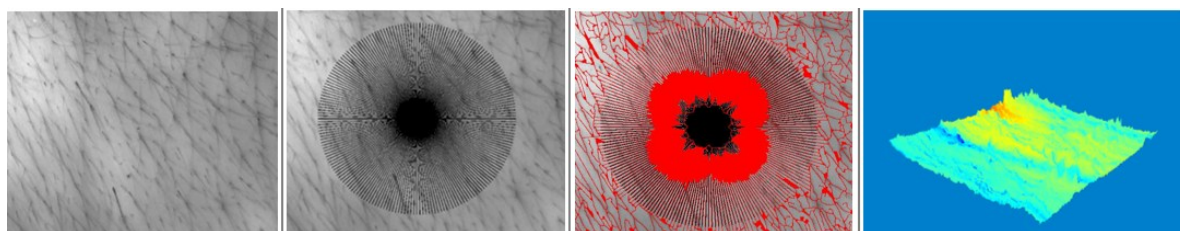
Získaná data u skupiny dobrovolnic testujících formulace ZF a NF přinesla překvapivé výsledky. Negativní vliv byl pozorován u formulace ZF na parametr R4 v pravé periorbitální oblasti, dále na parametry R1–R3 ve středu čela. Pro účinek formulace NF výjimkou nárůstu hodnoty parametru R4 v pravé periorbitální oblasti, byly v této oblasti a ve středu čela zaznamenány výrazné poklesy sledovaných parametrů drsnosti pokožky. Naproti tomu v levé periorbitální oblasti došlo ke zvýšení všech sledovaných parametrů drsnosti pokožky. Vzhledem k tomu, že na obě strany obličeje byla aplikována stejná formulace, lze tento rozdíl nejspíše přičítat vlivu spánkové polohy dobrovolnic. Jelikož dlouhodobý mechanický tlak a tření pokožky při spaní na jedné straně obličeje může vést ke strukturálním změnám v kožní tkáni, jako je zvýšená drsnost či tvorba jemných vrásek. Tento jev je označován jako "sleep wrinkles", tedy vrásky způsobené mechanickým napětím a deformací pokožky během spánku. Tyto výsledky naznačují, že spánkové návyky mohou významně ovlivnit výsledky hodnocení parametrů pokožky [140].

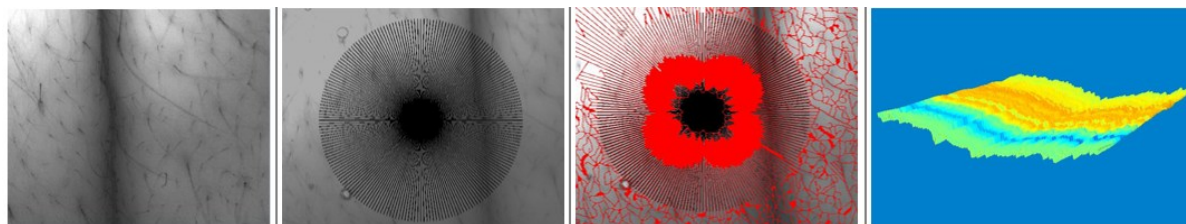
Hustota pokožky popisuje koncentraci kolagenních a elastinových vláken v *dermis*. Vyšší hustotu vykazuje pevnější, pružnější, celkově mladistvější pokožka, zatímco s přibývajícím věkem hustota *dermis* klesá, což vede ke ztenčení pokožky, snížení elasticity a zvýšené tvorbě vrásek [141]. Naopak anizotropie pokožky označuje jev, kdy mechanické vlastnosti kůže nejsou ve všech směrech stejné. Anizotropie závisí především na uspořádání kolagenních a elastinových vláken v *dermis* [142].

Dále byly shledány pozitivní účinky jednotlivých formulací na anizotropii a hustotu pokožky, viz Tabulka 6. K nevýraznějším změnám v nárůstu hustoty pokožky došlo v pravé periorbitální oblasti u všech testovaných formulací a v levé periorbitální oblasti po osmi týdenní aplikaci formulace EF. Nejvýraznější účinek na snížení anizotropie pokožky vykazovala formulace NF ve všech sledovaných oblastech, změny však nebyly shledány jako staticky významné.

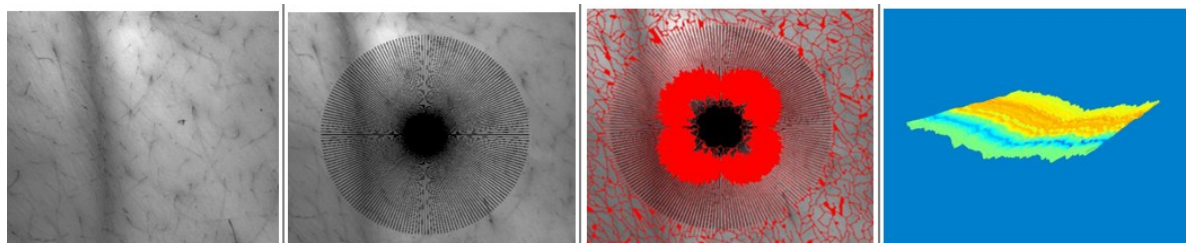
Tabulka 6 Vyhodnocení změn hustoty a anizotropie pokožky (\* $p \leq 0,05$ )

| Měřená oblast              | Formulace | Změna hustoty [%] | Změna anizotropie [%] |
|----------------------------|-----------|-------------------|-----------------------|
| Pravá periorbitální oblast | ZF        | 25,6              | -8,3                  |
|                            | EF        | 19,6              | -8,7                  |
|                            | NF        | 33,9              | -13,0                 |
| Střed čela                 | ZF        | 16,3              | -8,0                  |
|                            | EF        | 10,9              | -18,2                 |
|                            | NF        | 12,5              | -19,8                 |
| Levá periorbitální oblast  | ZF        | 13,2              | -7,8                  |
|                            | EF        | 29,1              | -10,7                 |
|                            | NF        | 7,8               | -16,7                 |

Obrázek 47 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace ZF  
(zdroj: vlastní)Obrázek 48 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikací formulace ZF  
(zdroj: vlastní)Obrázek 49 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace EF  
(zdroj: vlastní)Obrázek 50 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikace formulace EF  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 51 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace NF  
(zdroj: vlastní)



Obrázek 52 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikace formulace NF  
(zdroj: vlastní)

## 6.7 Antioxidační aktivita formulací

Metoda měření antioxidační aktivity pomocí DPPH je široce využívána k hodnocení schopnosti látek neutralizovat volné radikály. Na základě barevné změny DPPH z fialové na bezbarvou či žlutou barvu po interakci s antioxidanty dochází ke změně absorbance, jenž je následně vyhodnocována spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Antioxidační aktivita látek (AA%) je určena na základě změny absorbance v % dle matematického vztahu (1), jako úbytek absorbance proti referenci, jenž představoval 0,1 mM roztok DPPH v 96% ethanolu.

Měření antioxidační aktivity jednotlivých připravovaných formulací bylo obdobným způsobem provedeno 3krát vedle sebe. Výsledné hodnoty měření byly vyjádřeny aritmetickým průměrem, viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Antioxidační aktivita formulací

| Formulace | AA %           |
|-----------|----------------|
| ZF        | $77,6 \pm 2,3$ |
| EF        | $94,3 \pm 1,6$ |
| NF        | $90,3 \pm 0,7$ |

Na základě získaných dat je zřejmá nejnižší antioxidační aktivita připravované formulace ZF. Výsledky jsou v souladu s předpokládanou antioxidační aktivitou této formulace, jelikož se jedná o formulaci obsahující směs aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi, avšak ve formulaci není zakomponován kvercetin. Dala by se předpokládat vyšší antioxidační aktivita formulace NF, jelikož volný kvercetin může snadněji reagovat

s volnými radikály. Avšak v případě enkapsulovaných forem je třeba brát v úvahu především schopnost enkapsulace chránit kvercetin před degradací způsobenou oxidací, světlem či teplem.

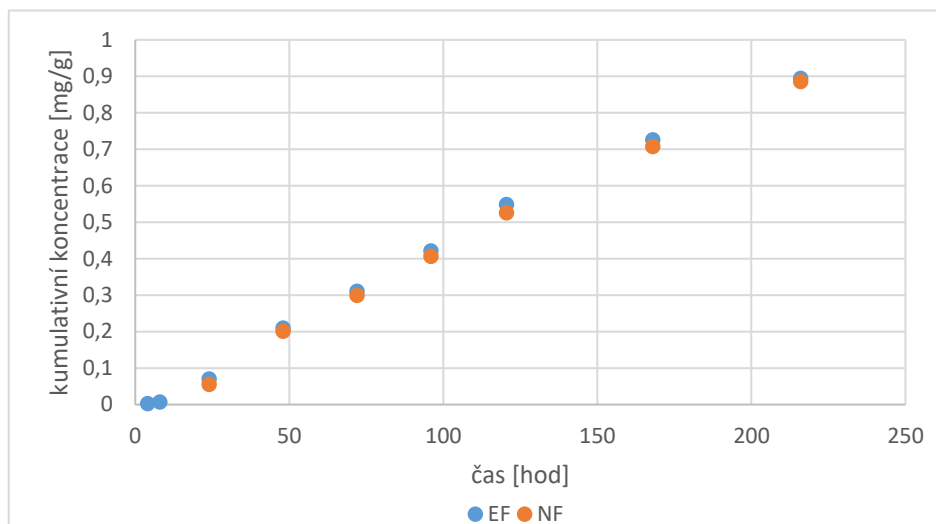
Ve studii [143] byla antioxidační aktivita lipozomálně enkapsulovaného i volného kvercetinu hodnocena obdobně pomocí DPPH metody. Test spočíval v reakci 1 ml 0,1 mM roztoku DPPH s 0,5 ml roztoku kvercetinu. Stanovení bylo provedeno při několika různých koncentracích kvercetinu, konkrétně 1, 5, 10 a 50  $\mu\text{M}$ , k porovnání účinnosti antioxidační aktivity obou forem v závislosti na dávce. Studie neshledala výrazný rozdíl v antioxidační aktivitě jednotlivých forem kvercetinu. Naopak studie [144] uvedla vyšší antioxidační aktivitu lipozomálního kvercetinu ve srovnání s volnou formou. Kvercetin byl zapouzdřen v polyoxyethylen lauryletherových micelách (Brij35®); 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholinových liposomech (DMPC) a v Brij35®/DMPC směsných micelách. Všechny enkapsulované formy kvercetinu byly hodnoceny na antioxidační aktivitu v potravinovém emulzním systému o/v a porovnávány s potravinovým emulzním systémem o/v obsahující volný kvercetin. V krátkodobých testech výsledky studie prokázaly vyšší antioxidační aktivitu lipozomálního kvercetinu v porovnání s ostatními formy. Ve studii byly výsledky připsány lepšímu synergetickému účinku lipozomální formy kvercetinu s vitaminem E přítomným v olejové fázi emulze.

Získané výsledky antioxidační aktivity formulace EF a NF korelují s výsledky uváděnými ve studiích, jelikož formulace EF vykazovala vyšší antioxidační aktivitu, avšak rozdíl nebyl zásadní. Vyšší antioxidační aktivita formulace EF může být částečně způsobena synergickým působením lipozomální formy a vitaminu E přítomným v olejové fázi krémové formulace, podobně jako bylo popsáno ve studii [144].

## 6.8 Test uvolňování aktivní látky z formulací

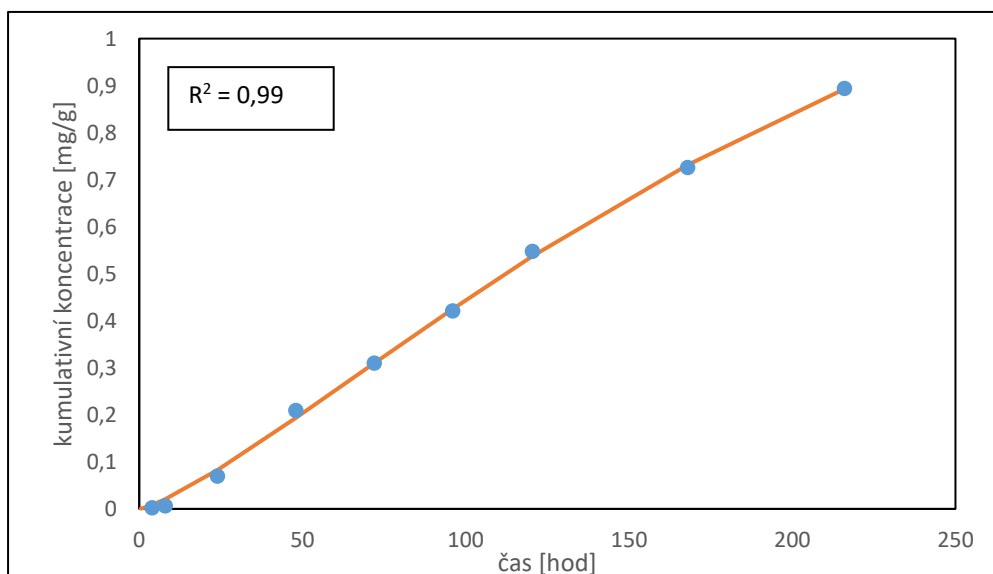
Test uvolňování neboli release test je experimentální metoda používaná k hodnocení uvolňování aktivních látek z různých formulací. Test je založen na měření koncentrace uvolněné látky v časových intervalech, což umožňuje sledovat kinetiku uvolňování a vyhodnotit účinnost formulace z hlediska její stability a doby působení [145].

Test uvolňování aktivní látky z formulací byl prováděn v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 8; 24; 48; 72; 96; 120,5; 168 a 216 hodin od začátku experimentu pro formulace EF a NF, z důvodu zakomponování kvercetinu ve formulacích. Na Obrázku 53 je znázorněna závislost množství uvolněného kvercetinu z formulací v mg/g na čase.

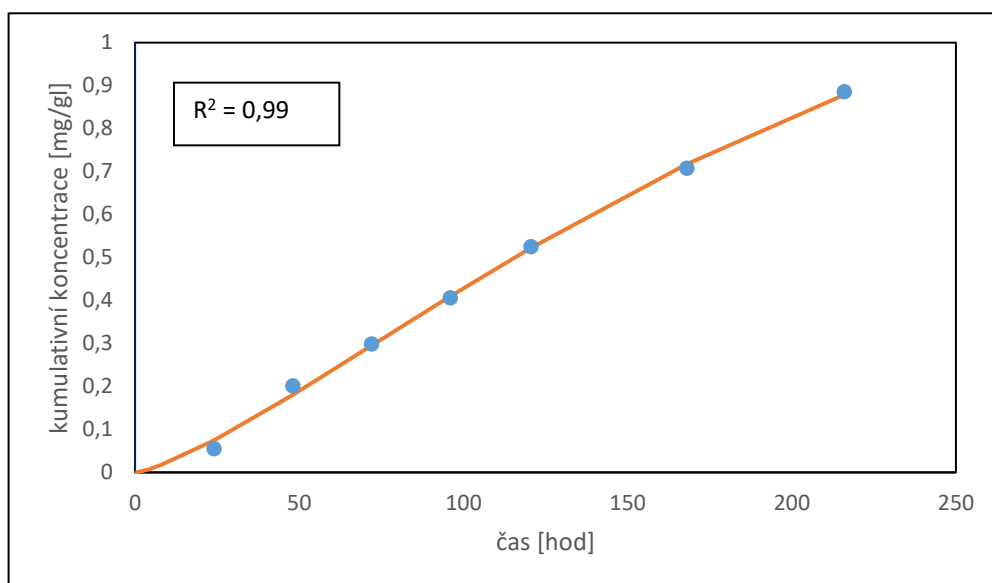


Obrázek 53 Časová závislost množství uvolněného kvercetinu

Průběh uvolňování aktivní látky z připravených krémových formulací byl hodnocen pomocí rovnice popisující kinetiku prvního řádu, viz Rovnice 2. Detekované množství uvolněného kvercetinu v jednotlivých formulacích v závislosti na čase, je uvedeno na Obrázcích 54–55. Konstanty získané pomocí matematického modelu jsou uvedeny v Tabulce 8.



Obrázek 54 Časová závislost kumulativní koncentrace uvolněného kvercetinu z formulace EF proložena fitovaným modelem dle Rovnice 2



Obrázek 55 Časová závislost kumulativní koncentrace uvolněného kvercetinu z formulace NF proložena fitovaným modelem dle Rovnice 2

Tabulka 8 Konstanty získané pomocí matematického modelu pro testované formulace

| Formulace | $c_{\max}$ [mg/g] | $r^2$ | $-k \times 10^{-3}$ [h <sup>-1</sup> ] |
|-----------|-------------------|-------|----------------------------------------|
| EF        | 1,37              | 0,99  | 1,1                                    |
| NF        | 1,31              | 0,99  | 0,8                                    |

Z grafického znázornění je patrné, že obě formulace (EF i NF) vykazují velmi podobnou rychlost uvolňování, bez výraznějších rozdílů ve tvaru či sklonu křivky. Kumulativní koncentrace uvolněného kvercetinu kontinuálně narůstala po celou dobu testu a ani po 216 hodinách nedošlo k dosažení ustáleného stavu, který by odpovídal rovnováze mezi uvolňováním a difuzí přes membránu.

Předpokládalo se, že enkapsulovaná formulace (EF) bude vykazovat pomalejší a postupné uvolňování účinné látky, především díky ochranně kvercetinu směsným lipozomálním nosičem, jak bylo popsáno například ve studii [70]. Překvapivě však byly výsledky u obou formulací téměř identické a neprokázaly výrazné rozdíly v rychlosti uvolňování. Tato skutečnost může být vysvětlena několika faktory, jednou z možností je nestabilita lipozomů během dlouhodobého testování. Vzhledem k délce testu (až 216 hodin) mohlo dojít k rozkladu lipozomálních struktur, což vedlo k náhlému uvolnění účinné látky. Také pH 7,3 u PBS pufru mohlo přispět k narušení lipozomálních stěn a k destabilizaci formulace [146]. Studie [144] rovněž zaznamenala chemickou degradaci kvercetinu

enkapsulovaného v lipozomech během dlouhodobého skladování v potravinové emulzi typu o/v, což podporuje možnou omezenou stabilitu lipozomální formy kvercetinu.

Zároveň je třeba zohlednit i chemickou stabilitu samotného kvercetinu. Je známo, že kvercetin je stabilní v kyselém prostředí o pH 1–6, zatímco při pH 7 a vyšším dochází k autooxidaci, která vede ke změně barvy a degradaci molekuly [147]. Tato degradace mohla ovlivnit jak výsledek měření, tak i celkové chování účinné látky ve formulaci.

Vzhledem k těmto poznatkům lze diskutovat i o vhodnosti metody dialyzačních membrán pro hodnocení krémových formulací. Viskózní charakter krémů může zpomalit či narušit přirozený difuzní proces. Dále může docházet k interakcím složek krému s membránou. Pro budoucí studie se jeví jako vhodnější vyzkoušet jinou metodu. Rovněž by bylo vhodné ověřit stabilitu samotného enkapsulovaného kvercetinu za různých pH a podmínek skladování, aby bylo možné výsledky lépe interpretovat.

## ZÁVĚR

Cílem teoretické části diplomové práce bylo poskytnout ucelený přehled o antioxidantech, jejich vlastnostech, biologické dostupnosti, charakterizaci či možnostech aplikace. Zvláštní pozornost byla věnována antioxidantům běžně využívaným v kosmetickém průmyslu a jejich účinkům na pokožku. Přehled rovněž zahrnoval faktory přispívající ke stárnutí pokožky a mechanismy, jimiž antioxidanty na pokožku působí. Teoretická část byla dále rozšířena o kapitolu zaměřenou na enkapsulaci, a to s ohledem na zvýšení stability, rozpustnosti, účinnosti či řízeného uvolňování antioxidantů.

V praktické části byl jako klíčová účinná látka zvolen antioxidant kvercetin, známý svými výraznými protizánětlivými a anti-aging účinky. Pro zvýšení jeho stability, zlepšení rozpustnosti a efektivního pronikání do pokožky byl enkapsulován do lipozomálního nosiče. Následně byly navrženy krémové formulace typu emulze o/v, obohacené o další aktivní látky vykazující pozitivní účinky na pokožku. Záměrem bylo vytvořit formulace určené pro péči o zralou pleť, které by zajišťovaly dostatečnou hydrataci, usnadnily vstřebávání účinných látek, nezanechávaly na pokožce mastný film a vykazovaly anti-aging účinky. Formulace byly hodnoceny z hlediska mikrobiologické čistoty a účinnosti konzervačního systému, tepelné stability, senzorických vlastností, antioxidační aktivity a schopnosti uvolňovat aktivní látku. Účinnost navržených formulací byla ověřena především *in vivo* měřením vybraných biofyzikálních parametrů pokožky pomocí neinvazivních metod.

V rámci mikrobiologického hodnocení byl proveden test přežívání bakterie *P. aeruginosa* v krémových formulacích. Výsledky testování potvrdily schopnost použitého konzervantu inhibovat růst bakterií.

Testování tepelné stability formulací ukázalo negativní vliv teplotních podmínek nad 47 °C, kdy došlo k úplnému rozpadu formulací, pravděpodobně v důsledku nestability použitého emulgátoru. Vyšší teploty vedly ke změnám barvy, zvýšení pH a poklesu viskozity u všech formulací. Texturní vlastnosti jednotlivých formulací, s výjimkou formulace ZF skladované při pokojové teplotě, vykazovaly charakteristický trend změn texturních vlastností emulzí během sledovaného období. Celkově se formulace s enkapsulovaným kvercetinem jevila jako stabilnější při vyšších teplotách, v porovnání s formulací obsahující volný kvercetin.

Senzorické posuzování organoleptických vlastností prokázalo v pořadových i párových porovnávacích zkouškách odlišnost formulace NF od formulací EF a ZF.

*In vivo* testování potvrdilo hydratační účinek všech formulací i jejich schopnost snižovat TEWL. Obě formulace s kvercetinem navíc vedly ke snížení pH pokožky. Nejvýraznější zlepšení elasticity pokožky bylo zaznamenáno u formulace EF. Základní formulace se ukázala jako neúčinnější v poklesu počtu pórů. Díky obsahu depigmentačních složek měly formulace pozitivní vliv na snížení pigmentových skvrn přítomných na pokožce, přičemž díky aplikaci EF bylo dosaženo u některých dobrovolnic jejich úplné redukce. Rozdíly mezi formulacemi se nejvíce projevily při sledování vrásek, kdy pokožka dobrovolnic ošetřovaná krémem EF vykazovala nejvýraznější úbytek během osmitýdenní aplikace. Zároveň byla tato formulace také nejefektivnější při zlepšení parametrů drsnosti pokožky. Všechny testované formulace pozitivně působily na hustotu a anizotropii pokožky. Získané výsledky jednoznačně potvrdily pozitivní přínos enkapsulovaného kvercetinu na účinnost kosmetických formulací.

Nejnižší antioxidační aktivitu vykazovala základní formulace bez kvercetinu, zatímco nejvyšší aktivita byla zaznamenána u formulace s enkapsulovaným kvercetinem. Zapouzdření kvercetinu synergicky podpořené jeho lipozomální formou a vitamínem E přítomným v olejové fázi podpořilo ochranu formulace před oxidací.

Testem uvolňování aktivních látek se nepodařilo prokázat rozdíl mezi formulacemi EF a NF. Ačkoliv se očekávalo pomalejší a řízené uvolňování z formulace EF díky enkapsulaci, výsledky tomu neodpovídaly. Tento výsledek může souviset s nestabilitou lipozomů, nevhodným pH prostředí, nízkou stabilitou samotného kvercetinu či nevhodnou použitou metodou.

Na závěr lze shrnout, že se podařilo vyvinout mikrobiologicky čisté, tepelně stabilní a antioxidačně aktivní krémové formulace s příznivým účinkem na všechny sledované biofyzikální parametry pokožky. Enkapsulace kvercetinu se projevila jako účinná technologie, která ovlivnila jak vlastnosti připravených kosmetických formulací, tak jejich účinky na pokožku. Byly splněny stanovené cíle práce a získané výsledky práce byly ve prospěch formulovaných hypotéz.

Ze získaných poznatků a řešených úskalí spojených s vlastnostmi kvercetinu a jeho inkorporací do kosmetických matric by bylo do budoucna přínosné zaměřit se na jeho stabilitní vlastnosti a monitorování antioxidační aktivity za různých podmínek skladování.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] HALLIWELL, Barry. How to Characterize a Biological Antioxidant. Online. *Free Radical Research Communications*. 2009, roč. 9, č. 1, s. 1-32. ISSN 8755-0199. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>.
- [2] HALLIWELL, Barry a GUTTERIDGE, John M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, roč. 18, č. 1, s. 125-126. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3).
- [3] LAITONJAM, Warjeet S. Natural Antioxidants (NAO) of Plants Acting as Scavengers of Free Radicals: Pioneer Types, Advantages, Limitations, and Future Insights. Online. *Studies in Natural Products Chemistry Volume 37*. Studies in Natural Products Chemistry. 2012, roč. 26, č. 22, s. 259-275. ISBN 9780444595140. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00009-2>.
- [4] GRANT, M.M. a CHAPPLE, I.L.C. Antioxidants and periodontal disease: Pioneer Types, Advantages, Limitations, and Future Insights. Online. *Food Constituents and Oral Health*. Studies in Natural Products Chemistry. 2009, roč. 26, č. 22, s. 225-239. ISBN 9781845694180. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9781845696290.2.225>.
- [5] LÜ, Jian-Ming; LIN, Peter H.; YAO, Qizhi a CHEN, Changyi. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Online. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Studies in Natural Products Chemistry. 2009, roč. 14, č. 4, s. 840-860. ISBN 9781845694180. ISSN 1582-1838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>.
- [6] FLIEGER, Jolanta; FLIEGER, Wojciech; BAJ, Jacek a MACIEJEWSKI, Ryszard. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. Online. *Materials*. Studies in Natural Products Chemistry. 2009, roč. 14, č. 15, s. 840-860. ISBN 9781845694180. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14154135>.

- [7] STOIA, Mihaela a OANCEA, Simona. Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. Online. *Antioxidants*. Studies in Natural Products Chemistry. 2009, roč. 11, č. 4, s. 840-860. ISBN 9781845694180. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11040638>.
- [8] KOVAL, V. P., et al. Chemical, Biological and Biomedical Aspects of Bioantioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5), 1234. DOI: 10.3390/ijms24051234.
- [9] KANCHEVA, V. a KASAIKINA, O. Bio-Antioxidants – A Chemical Base of Their Antioxidant Activity and Beneficial Effect on Human Health. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, roč. 20, č. 37, s. 4784-4805. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/09298673113209990161>.
- [10] KORCZOWSKA-ŁĄCKA, Izabela; SŁOWIKOWSKI, Bartosz; PIEKUT, Thomas; HURŁA, Mikołaj; BANASZEK, Natalia et al. Disorders of Endogenous and Exogenous Antioxidants in Neurological Diseases. Online. *Antioxidants*. 2023, roč. 12, č. 10, s. 4784-4805. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox12101811>.
- [11] SHARPE, Erica; ANDREESCU, Daniel a ANDREESCU, Silvana. Artificial Nanoparticle Antioxidants. Online. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. ACS Symposium Series. 2011, roč. 12, č. 10, s. 235-253. ISBN 9780841226838. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1083.ch008>.
- [12] OMRAN, Basma a BAEK, Kwang-Hyun. Nanoantioxidants: Pioneer Types, Advantages, Limitations, and Future Insights. Online. *Molecules*. ACS Symposium Series. 2011, roč. 26, č. 22, s. 235-253. ISBN 9780841226838. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26227031>.
- [13] RAHAMAN, Md. Mizanur; HOSSAIN, Rajib; HERRERA-BRAVO, Jesús; ISLAM, Mohammad Torequl; ATOLANI, Olubunmi et al. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. Online. *Molecules*. ACS Symposium Series. 2011, roč. 11, č. 4, s. 1657-1670. ISBN 9780841226838. ISSN 2048-7177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fsn3.3217>.

- [14] Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: An update. Online. *Molecules*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 11, č. 4, s. 1657-1670. ISBN 9780841226838. ISSN 2048-7177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/14356007>.
- [15] LOURENÇO, Sofia C.; MOLDÃO-MARTINS, Margarida a ALVES, Vítor D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Molecules*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 24, č. 22, s. 1657-1670. ISBN 9780841226838. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- [16] FERNANDES, Pedro A.R.; LE BOURVELLEC, Carine; RENARD, Catherine M.G.C.; NUNES, Fernando M.; BASTOS, Rita et al. Revisiting the chemistry of apple pomace polyphenols: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Food Chemistry*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 294, č. 22, s. 9-18. ISBN 9780841226838. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.006>.
- [17] GARCÍA-VILLEGAS, Abigail; ROJAS-GARCÍA, Alejandro; VILLEGAS-AGUILAR, María del Carmen; FERNÁNDEZ-MORENO, Patricia; FERNÁNDEZ-OCHOA, Álvaro et al. Cosmeceutical Potential of Major Tropical and Subtropical Fruit By-Products for a Sustainable Revalorization: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Antioxidants*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 11, č. 2, s. 9-18. ISBN 9780841226838. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11020203>.
- [18] DIAMANTI, Amalia C.; IGOUMENIDIS, Panagiotis E.; MOURTZINOS, Ioannis; YANNAKOPOULOU, Konstantina a KARATHANOS, Vaios T. Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Food Chemistry*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 214, č. 2, s. 61-66. ISBN 9780841226838. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.072>.

- [19] GORINSTEIN, Shela; MARTÍN-BELLOSO, Olga; PARK, Yong-Seo; HARUENKIT, Ratiporn; LOJEK, Antonin et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Food Chemistry*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 74, č. 3, s. 309-315. ISBN 9780841226838. ISSN 03088146. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00157-1).
- [20] FREITAS, Ana; MOLDÃO-MARTINS, Margarida; COSTA, Helena S; ALBUQUERQUE, Tânia G; VALENTE, Ana et al. Effect of UV-C radiation on bioactive compounds of pineapple ( *Ananas comosus* L. Merr.) by-products: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 95, č. 1, s. 44-52. ISBN 9780841226838. ISSN 00225142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6751>.
- [21] GEORGE, Binoy; KAUR, Charanjit; KHURDIYA, D.S. a KAPOOR, H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype: From Sources to Food Industry Applications. Online. *Food Chemistry*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 84, č. 1, s. 45-51. ISBN 9780841226838. ISSN 03088146. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00165-1).
- [22] *ThoughtCo*. Online. Dostupné také z: <https://www.thoughtco.com/>.
- [23] *Btsa*. Online. Dostupné také z: <https://www.btsa.com>.
- [24] VAN ESCH, G.J. Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ): From Sources to Food Industry Applications. Online. *Food and Chemical Toxicology*. ACS Symposium Series. 2003, roč. 24, č. 10-11, s. 1063-1065. ISBN 9780841226838. ISSN 02786915. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90289-9](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90289-9).
- [25] LOBO, V; PATIL, A; PHATAK, A a CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Online. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, roč. 4, č. 8. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- [26] COLLIN, Fabrice. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases: Impact on human health. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 10. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>.

- [27] ASHOK, Badithe T a ALI, Rashid. The aging paradox: free radical theory of aging. Online. *Experimental Gerontology*. 1999, roč. 34, č. 3, s. 293-303. ISSN 05315565. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(99\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00005-4).
- [28] LIGUORI, Ilaria; RUSSO, Gennaro; CURCIO, Francesco; BULLI, Giulia; ARAN, Luisa et al. Oxidative stress, aging, and diseases: free radical theory of aging. Online. *Clinical Interventions in Aging*. 2018, roč. 13, č. 3, s. 757-772. ISSN 1178-1998. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- [29] AZAB, Khaled Sh.; MEKY, Nefissa H.; EL-DEGHIDY, Eglal A. M. a AZOZ, Ghada. Response of COX2/PGE2 Inflammatory Pathway to Brown Seaweed Extract in Rats Exposed to Gamma Radiation. Online. *World Journal of Nuclear Science and Technology*. 2017, roč. 07, č. 03, s. 189-205. ISSN 2161-6795. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/wjnst.2017.73016>.
- [30] SINGH, Anju; KUKRETI, Ritushree; SASO, Luciano a KUKRETI, Shrikant. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 8, s. 189-205. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
- [31] CANTUTI-CASTELVETRI, Ippolita; SHUKITT-HALE, Barbara a JOSEPH, James A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2000, roč. 18, č. 4-5, s. 367-381. ISSN 0736-5748. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00008-3).
- [32] THORAT, Indrajit D.; JAGTAP, Dipali D.; MOHAPATRA, Debabandya; JOSHI, D. C.; SUTAR, R. F. et al. Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *International Journal of Food Studies*. 2013, roč. 2, č. 1, s. 367-381. ISSN 2182-1054. Dostupné z: <https://doi.org/10.7455/ijfs/2.1.2013.a7>.
- [33] ZHANG, Y., ZHANG, H., WANG, L., GUO, X. *Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice*. Food and Nutrition Sciences [online]. 2013, 4(6), 483–490. DOI: [10.4236/fns.2013.4608](https://doi.org/10.4236/fns.2013.4608).

- [34] MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; WITKOWSKA, Anna Maria a ZUJKO, Małgorzata Elżbieta. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Advances in Medical Sciences*. 2018, roč. 63, č. 1, s. 68-78. ISSN 18961126.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- [35] TSAO, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Nutrients*. 2010, roč. 2, č. 12, s. 1231-1246. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
- [36] SAEWAN, Nisakorn a JIMTAISONG, Ampa. Natural products as photoprotection: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2015, roč. 14, č. 1, s. 47-63. ISSN 1473-2130.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12123>.
- [37] HEMMATI, AliAsghar; HOUSHMAND, Gholamreza; GHORBANZADEH, Behnam; NEMATI, Mohammad a BEHMANESH, MohammadAmin. Topical vitamin K 1 promotes repair of full thickness wound in rat: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Indian Journal of Pharmacology*. 2014, roč. 46, č. 4, s. 47-63. ISSN 0253-7613.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.135953>.
- [38] PANDEY, Kanti Bhooshan a RIZVI, Syed Ibrahim. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009, roč. 2, č. 5, s. 270-278. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.
- [39] LIGA, Sergio; PAUL, Cristina a PÉTER, Francisc. Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. Online. *Plants*. 2023, roč. 12, č. 14. ISSN 2223-7747.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants12142732>.
- [40] OLUBUKOLA SINBAD, Olorunnisola; FOLORUNSHO, Ajayi Ayodeji; OLABISI, Okeleji Lateef; ABIMBOLA AYOOLA, Oladipo a JOHNSON TEMITOPE, Emorioloye. Vitamins as Antioxidants: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. Online. *Journal of Food Science and Nutrition Research*. 2019, roč. 02, č. 03. ISSN 26421100. Dostupné z: <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000021>.

- [41] AKHTAR, Sultan a SALAMA, Khaled F. Characterization and analysis of trace elements of facial beauty powders collected from Saudi markets: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. Online. *Journal of King Saud University - Science*. 2024, roč. 36, č. 6. ISSN 10183647. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103208>.
- [42] LEUNG, Fred Y. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition  
11This paper was delivered at the January 18, 1998, workshop “Frontiers in Antioxidant Research: 14th Annual A.S.P.E.N. Workshop,” which was held the day before the official start of the 22nd A.S.P.E.N. Clinical Congress in Orlando, FL. Online. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1998, roč. 9, č. 6, s. 304-307. ISSN 09552863. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(98\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(98)00018-7).
- [43] BUFKA, Jiří; VAŇKOVÁ, Lenka; SÝKORA, Josef a KŘÍŽKOVÁ, Věra. Exploring carotenoids: Metabolism, antioxidants, and impacts on human health. Online. *Journal of Functional Foods*. 2024, roč. 118, č. 6, s. 304-307. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106284>.
- [44] BARAN, Marzena Teresa; MIZIAK, Paulina a BONIO, Katarzyna. Characteristics of carotenoids and their use in the cosmetics industry: Metabolism, antioxidants, and impacts on human health. Online. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020, roč. 10, č. 7, s. 192-196. ISSN 2391-8306. Dostupné z: <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.07.020>.
- [45] NAM, Nguyen Nhat; TRAN, Nguyen Khoi Song; NGUYEN, Tan Tai; TRAI, Nguyen Ngoc; THUY, Nguyen Phuong et al. Classification and application of metal-based nanoantioxidants in medicine and healthcare: Metabolism, antioxidants, and impacts on human health. Online. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2024, roč. 15, č. 7, s. 396-415. ISSN 2190-4286. Dostupné z: <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.36>.
- [46] XU, Xiaoqing; LIU, Aimei; HU, Siyi; ARES, Irma; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, María-Rosa et al. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. Online. *Food Chemistry*. 2021, roč. 353, č. 7, s. 396-415. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129488>.

- [47] KEBEDE, Muluken a ADMASSU, Shimelis. Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. Online. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences – Open Journal*. 2019, roč. 5, č. 2, s. 38-49. ISSN 23778350. Dostupné z: <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-5-155>.
- [48] PETCU, Carmen Daniela; TĂPĂLOAGĂ, Dana; MIHAI, Oana Diana; GHEORGHE-IRIMIA, Raluca-Aniela; NEGOIȚĂ, Carmen et al. Harnessing Natural Antioxidants for Enhancing Food Shelf Life: Exploring Sources and Applications in the Food Industry. Online. *Foods*. 2023, roč. 12, č. 17, s. 38-49. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12173176>.
- [49] GARCÍA-LOMILLO, Javier; GONZALEZ-SANJOSE, Maria L.; DEL PINO-GARCÍA, Raquel; ORTEGA-HERAS, Miriam a MUÑIZ-RODRÍGUEZ, Pilar. Antioxidant effect of seasonings derived from wine pomace on lipid oxidation in refrigerated and frozen beef patties: Exploring Sources and Applications in the Food Industry. Online. *LWT*. 2017, roč. 77, č. 17, s. 85-91. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.038>.
- [50] MUNEKATA, Paulo Eduardo Sichetti; PASETO FERNANDES, Rafaella de Paula; DE MELO, Mariza Pires; TRINDADE, Marco Antonio a LORENZO, José Manuel. Influence of peanut skin extract on shelf-life of sheep patties: Exploring Sources and Applications in the Food Industry. Online. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016, roč. 6, č. 7, s. 586-596. ISSN 22211691. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.05.002>.
- [51] ALENISAN, Modi A.; ALQATTAN, Hanan H.; TOLBAH, Lojayn S. a SHORI, Amal B. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. Online. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*. 2018, roč. 24, č. 1, s. 101-106. ISSN 1815-3852. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2017.05.001>.
- [52] SINDHI, Vinita; GUPTA, Vartika; SHARMA, Kameshwar; BHATNAGAR, Sonal; KUMARI, Reeta et al. Potential applications of antioxidants – A review: A review. Online. *Journal of Pharmacy Research*. 2013, roč. 7, č. 9, s. 828-835. ISSN 09746943. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.

- [53] ABIODUN, Olufunmilola Adunni; ABIODUN, Shalom Olamide a ARISE, Abimbola Kemisola. Antioxidant packaging: A review. Online. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. 2023, roč. 7, č. 9, s. 1-23. ISBN 9780323956444. ISSN 09746943.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95644-4.00005-X>.
- [54] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3. Kapitola Integumentum commune – Kůže a kožní orgány, s. 627–647.
- [55] DINI, Irene a LANERI, Sonia. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 13. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>.
- [56] MD JAFFRI, Juliana. Reactive Oxygen Species and Antioxidant System in Selected Skin Disorders: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2023, roč. 30, č. 1, s. 7-20. ISSN 1394195X. Dostupné z: <https://doi.org/10.21315/mjms2023.30.1.2>.
- [57] HELLEMANS, Lieveke; CORSTJENS, Hugo; NEVEN, Ann; DECLERCQ, Lieve a MAES, Daniel. Antioxidant Enzyme Activity in Human Stratum Corneum Shows Seasonal Variation with an Age-Dependent Recovery: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003, roč. 120, č. 3, s. 434-439. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12056.x>.
- [58] EL HADIDIA, Heba H.; MASHALY, Heba M.; MOHAMED, Gamila S.; EMAM, Hanaa a EL FAWY, Shaimaa. Comparison between serum level of superoxide dismutase, malondialdehyde, and DNA damage in acne vulgaris and vitiligo patients: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society*. 2016, roč. 13, č. 3, s. 173-179. ISSN 1687-1537. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/01.EWX.0000482792.76474.f3>.
- [59] EMMERT, Hila; FONFARA, Melina; RODRIGUEZ, Elke a WEIDINGER, Stephan. NADPH oxidase inhibition rescues keratinocytes from elevated oxidative stress in a 2D atopic dermatitis and psoriasis model: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Experimental Dermatology*. 2020, roč. 29, č. 8, s. 749-758. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/exd.14148>.

- [60] GANCEVICIENE, Ruta; LIAKOU, Aikaterini I.; THEODORIDIS, Athanasios; MAKRANTONAKI, Evgenia a ZOUBOULIS, Christos C. Skin anti-aging strategies: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Dermato-Endocrinology*. 2012, roč. 4, č. 3, s. 308-319. ISSN 1938-1980. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/derm.22804>.
- [61] AGRAWAL, Rashi; HU, Anne a BOLLAG, Wendy B. The Skin and Inflamm-Aging: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. Online. *Biology*. 2023, roč. 12, č. 11, s. 308-319. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology12111396>.
- [62] CHAUDHARY, Manupriya; KHAN, Azmi a GUPTA, Madhu. Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. Online. *Current Aging Science*. 2020, roč. 13, č. 1, s. 22-30. ISSN 18746098. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>.
- [63] DAYAN, Nava. *Handbook of Formulating Dermal Applications. A Definitive Practical Guide*. Canada: Srivener Publishing Wiley, 2017. ISBN 978-1-119-36362-0.
- [64] YANG, S.; LIU, L.; HAN, J. a TANG, Y. Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: an updated review of delivery systems and characterization techniques. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020, roč. 42, č. 1, s. 16-28. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12592>.
- [65] MUNTEANU, Irina Georgiana a APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 7, s. 16-28. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [66] MIRZA, Mohd Aamir; MAHMOOD, Syed; HILLES, Ayah Rebhi; ALI, Abuzer; KHAN, Mohammed Zaafar et al. Quercetin as a Therapeutic Product: Evaluation of Its Pharmacological Action and Clinical Applications-A Review. Online. *Pharmaceuticals*. 2023, roč. 16, č. 11, s. 16-28. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph16111631>.

- [67] ZOICO, Elena; NORI, Nicole; DARRA, Elena; TEBON, Maela; RIZZATTI, Vanni et al. Senolytic effects of quercetin in an in vitro model of pre-adipocytes and adipocytes induced senescence: Evaluation of Its Pharmacological Action and Clinical Applications—A Review. Online. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1, s. 16-28. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02544-0>.
- [68] LIM, Hyeon-Ji; KANG, Sa-Haeng; SONG, Young-Jae; JEON, Yong-Deok a JIN, Jong-Sik. Inhibitory Effect of Quercetin on Propionibacterium acnes-induced Skin Inflammation: Evaluation of Its Pharmacological Action and Clinical Applications—A Review. Online. *International Immunopharmacology*. 2021, roč. 96, č. 1, s. 16-28. ISSN 15675769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107557>.
- [69] MARAMALDI, Giada; TOGNI, Stefano; PAGIN, Ivan; GIACOMELLI, Luca; CATTANEO, Roberta et al. Soothing and anti-itch effect of quercetin phytosome in human subjects: a single-blind study. Online. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2021, roč. 96, č. 1, s. 16-28. ISSN 1178-7015. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CCID.S98890>.
- [70] WADHWA, Karan; KADIAN, Varsha; PURI, Vivek; BHARDWAJ, Bigul Yogeshvar; SHARMA, Ameya et al. New insights into quercetin nanoformulations for topical delivery: a single-blind study. Online. *Phytomedicine Plus*. 2022, roč. 2, č. 2, s. 16-28. ISSN 26670313. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100257>.
- [71] BiOOO.cz [online]. Topolová 2963/12, 106 00 Praha, 2007-2023 [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.biooo.cz/>.
- [72] BASWAN, Sudhir M.; KLOSNER, Allison E.; WEIR, Cathy; SALTER-VENZON, Dawna; GELLENBECK, Kevin W. et al. Role of ingestible carotenoids in skin protection: A review of clinical evidence. Online. 2021, roč. 37, č. 6, s. 490-504. ISSN 0905-4383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/phpp.12690>
- [73] STAHL, W. a KRUTMANN, J. Systemische Photoprotektion durch Karotinoide. Online. *Der Hautarzt*. 2006, roč. 57, č. 4, s. 281-285. ISSN 0017-8470. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00105-006-1095-x>.

- [74] WANG, Ying; OXER, Daniella a HEKIMI, Siegfried. Mitochondrial function and lifespan of mice with controlled ubiquinone biosynthesis. Online. *Nature Communications*. 2015, roč. 6, č. 1, s. 281-285. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms7393>.
- [75] KNOTT, Anja; ACHTERBERG, Volker; SMUDA, Christoph; MIELKE, Heiko; SPERLING, Gabi et al. Topical treatment with coenzyme Q 10 - containing formulas improves skin's Q 10 level and provides antioxidative effects. Online. *BioFactors*. 2015, roč. 41, č. 6, s. 383-390. ISSN 0951-6433. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/biof.1239>.
- [76] TSOURELI-NIKITA, Evridiki; HERCOGOVA, Jana; LOTTI, Torello a MENCHINI, Giovanni. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. Online. *International Journal of Dermatology*. 2002, roč. 41, č. 3, s. 146-150. ISSN 0011-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01423.x>.
- [77] APARECIDA SALES DE OLIVEIRA PINTO, Claudineia; ELYAN AZEVEDO MARTINS, Tércio; MILIANI MARTINEZ, Renata; BATELLO FREIRE, Thamires; VALÉRIA ROBLES VELASCO, Maria et al. Vitamin E in Human Skin: Functionality and Topical Products. Online. *Vitamin E in Health and Disease – Interactions, Diseases and Health Aspects*. Biochemistry. 2021, roč. 41, č. 3, s. 146-150. ISBN 978-1-83968-837-9. ISSN 0011-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.98336>.
- [78] PARK, Kyungho. Role of Micronutrients in Skin Health and Function: Functionality and Topical Products. Online. *Vitamin E in Health and Disease - Interactions, Diseases and Health Aspects*. Biochemistry. 2021, roč. 23, č. 3, s. 207-217. ISBN 978-1-83968-837-9. ISSN 2005-4483. Dostupné z: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.003>.
- [79] LORENTE PRIETO, Enrique. Cosmetic Topical Use of Vitamin C: Functionality and Topical Products. Online. *Ascorbic Acid – Biochemistry and Functions*. Biochemistry. 2024, roč. 23, č. 3, s. 207-217. ISBN 978-1-83768-562-2. ISSN 2005-4483. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.109644>.

- [80] SIES, HELMUT; STAHL, WILHELM a SUNDQUIST, ALFRED R. Antioxidant Functions of Vitamins: Functionality and Topical Products. Online. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Biochemistry. 2024, roč. 669, č. 1, s. 7-20. ISBN 978-1-83768-562-2. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x>.
- [81] MALIVINDI, Rocco; RAGO, Vittoria; DE ROSE, Daniela; GERVASI, Maria Clelia; CIONE, Erika et al. Influence of all – trans retinoic acid on sperm metabolism and oxidative stress: Its involvement in the physiopathology of varicocele-associated male infertility. Online. *Journal of Cellular Physiology*. Biochemistry. 2024, roč. 233, č. 12, s. 9526-9537. ISBN 978-1-83768-562-2. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcp.26872>.
- [82] EU. Nařízení Komise (EU) 2024/996 ze dne 4. dubna 2024, kterým se stanoví požadavky na návrh, konstrukci a uvádění výtahů a bezpečnostních komponent pro výtahy na trh. Úřední věstník Evropské unie, L 2024/996, 5. 4. 2024. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32024R0996>.
- [83] JUNCAN, Anca Maria; MORGOVAN, Claudiu; RUS, Luca-Liviu a LOGHIN, Felicia. Development and Evaluation of a Novel Anti-Ageing Cream Based on Hyaluronic Acid and Other Innovative Cosmetic Actives. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 20. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15204134>.
- [84] SALEHI, Bahare; MACHIN, Laura; MONZOTE, Lianet; SHARIFI-RAD, Javad; EZZAT, Shahira M. et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. Online. *ACS Omega*. 2020, roč. 5, č. 20, s. 11849-11872. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>.
- [85] ADAMCZAK, Artur; OŻAROWSKI, Marcin a KARPÍŃSKI, Tomasz M. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants: New Insights and Perspectives for Human Health. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, roč. 9, č. 1, s. 11849-11872. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm9010109>.

- [86] MÜLLER, R.H.; RADTKE, M. a WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations: New Insights and Perspectives for Human Health. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, roč. 54, č. 1, s. S131-S155. ISSN 0169409X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7).
- [87] TOMOU, Ekaterina-Michaela; PAPAKYRIAKOPOULOU, Paraskevi; SAITANI, Elmina-Marina; VALSAMI, Georgia; PIPPA, Natassa et al. Recent Advances in Nanoformulations for Quercetin Delivery: New Insights and Perspectives for Human Health. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 6, s. S131-S155. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061656>.
- [88] MILANEZI, Felipe Guzansky; MEIRELES, Leandra Martins; DE CHRISTO SCHERER, Marcella Malavazi; DE OLIVEIRA, Jairo P.; DA SILVA, André Romero et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. Online. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019, roč. 27, č. 7, s. 968-974. ISSN 13190164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.07.005>.
- [89] AMER, Sandra Sherif; NASR, Maha; ABDEL-AZIZ, Rasha T.A.; MOFTAH, Noha H.; EL SHAER, Amr et al. Cosm-nutraceutical nanovesicles for acne treatment: Physicochemical characterization and exploratory clinical experimentation. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, roč. 577, č. 7, s. 968-974. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119092>.
- [90] CHOUDHARY, Abhinav; KANT, Vinay; JANGIR, Babu Lal a JOSHI, V.G. Quercetin loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in Wistar rats: Physicochemical characterization and exploratory clinical experimentation. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2020, roč. 880, č. 7, s. 968-974. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173172>.
- [91] NAKAI, Shiro; NAKAI, Akito a MICHIDA, Takashi. Microencapsulation of Ascorbic Acid for Cosmetic by Utilizing Self-assembly of Phase Separated Polymer: Physicochemical characterization and exploratory clinical experimentation. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2016, roč. 64, č. 10, s. 1514-1518. ISSN 0009-2363. Dostupné z: <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00384>.

- [92] ALZAHABI, Sham; SAKR, Omar S. a RAMADAN, Adham A. Nanostructured lipid carriers incorporating prickly pear seed oil for the encapsulation of vitamin A: Physicochemical characterization and exploratory clinical experimentation. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019, roč. 18, č. 6, s. 1875-1884. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12891>.
- [93] CAMPANI, Virginia; BIONDI, Marco; MAYOL, Laura; CILURZO, Francesco; PITARO, Michele et al. Development of nanoemulsions for topical delivery of vitamin K1: Physicochemical characterization and exploratory clinical experimentation. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, roč. 511, č. 1, s. 170-177. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.004>.
- [94] MATOŠKOVÁ, Lucie. *Možnosti solubilizace antioxidačních látek* [online]. Zlín, 2024. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce: Jana Sedlaříková. Dostupné z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/54820>.
- [95] ISO 11930:2019; Cosmetics—Microbiology—Evaluation of the Antimicrobial Protection of a Cosmetic Product. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2019.
- [96] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN EN ISO 8586. Senzorická analýza - Výběr a výcvik senzorických posuzovatelů. 2023.
- [97] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN ISO 6658. Senzorická analýza - Metodologie - Obecný návod. Česká agentura pro standardizaci, 2022.
- [98] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN EN ISO 8589. Senzorická analýza - Obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště. Český normalizační institut, 2008.
- [99] LOHAKITSATIAN, Pongsak; TUNLAYADECHANONT, Padcha a TANTITHAM, Thiti. Decoding Periorbital Aging: A Multilayered Analysis of Anatomical Changes. Online. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2025, roč. 49, č. 3, s. 664–671. ISSN 0364-216X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00266-024-04590-1>.

- [100] PROKOPOVÁ, Aneta; PAVLAČKOVÁ, Jana; MOKREJŠ, Pavel a GÁL, Robert. Collagen Hydrolysate Prepared from Chicken By-Product as a Functional Polymer in Cosmetic Formulation. *Online. Molecules*. 2021, roč. 26, č. 7, s. 2021. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26072021>.
- [101] BALLESTEROS, Lina Fernanda; RAMIREZ, Maria Juliana; ORREGO, Carlos Enrique; TEIXEIRA, José António a MUSSATTO, Solange I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Online. Food Chemistry*. 2017, roč. 237, s. 623–631. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>.
- [102] FONSECA, Ana Paula; DAL PIZZOL, Carine; VANZO, Antonio Carlos; DA SILVA, Gustavo Henrique; FACCHINI, Gustavo; PINHEIRO, Ana Lúcia Tabarini Alves; EBERLIN, Samara a CAMPOS, Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia. Antiaging effects of a skin care formulation containing nanoencapsulated antioxidants: A clinical, in vitro, and ex vivo study. *Online. Journal of Cosmetic Dermatology*. 2024, roč. 23, č. 2, s. 510–524. ISSN 1473-2165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.15976>.
- [103] AHMADI ASHTIANI, Hamid Reza; BISHE, Parisa; LASHGARI, Naser-Aldin; NILFOROUSHZADEH, Mohammad Ali a ZARE, Sona. Liposomes in Cosmetics. *Online. Journal of Skin and Stem Cell*. 2016, roč. 3, č. 3, e65815. ISSN 2423-7086. Dostupné z: <https://doi.org/10.5812/jssc.65815>.
- [104] HATAHET, T.; MORILLE, M.; HOMMOSS, A.; DEVOISSELLE, J. M.; MÜLLER, R. H.; BÉGU, S. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *Online. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016, roč. 108, s. 41–53. ISSN 0939-6411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.011>.
- [105] TSAKIRI, Maria; PERAKI, Aikaterini; CHOUNTOULESI, Maria a DEMETZOS, Costas. Chimeric liposomes decorated with P407: an alternative biomaterial for producing stealth nano-therapeutics. *Online. Journal of Liposome Research*. 2022, roč. 32, č. 1, s. 83–91. ISSN 0898-2104. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/08982104.2021.1978486>.

- [106] LIU, Dan; HU, Haiyang; LIN, Zhixiu; CHEN, Dawei; ZHU, Yongyuan; HOU, Shengtao a SHI, Xiaojun. Quercetin deformable liposome: Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. *Online. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013, roč. 127, s. 8–17. ISSN 1011-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.014>.
- [107] LIU, Chang; CHENG, Xiaoman; WU, Yifang; XU, Weifang; XIA, Hongmei; JIA, Ruoyang; LIU, Yinyin; SHEN, Si; XU, Yinxiang a CHENG, Zhiqing. Antioxidant Activity of Quercetin-Containing Liposomes-in-Gel and Its Effect on Prevention and Treatment of Cutaneous Eczema. *Online. Pharmaceuticals*. 2023, roč. 16, č. 8, čl. 1184. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph16081184>.
- [108] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana; JANALÍKOVÁ, Magda; RUDOLF, Ondřej; PAVLAČKOVÁ, Jana; EGNER, Pavlína et al. Chitosan/Thyme Oil Systems as Affected by Stabilizing Agent: Physical and Antimicrobial Properties. *Online. Coatings*. 2019, vol. 9, no. 3, s. 1–18. ISSN 2079-6412.
- [109] AERTS, Olivier; PYL, Jeroen; MANGODT, Evelyne a DENDOOVEN, Ella. Severe contact cheilitis from cera alba and other cosmetic oils, fats and waxes in lip balms. *Online. Contact Dermatitis*. 2023, roč. 88, č. 4, s. 322–323. ISSN 0105-1873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cod.14272>.
- [110] BURNETT, Christina L.; FIUME, Monice M.; BERGFELD, Wilma F.; BELSITO, Donald V.; HILL, Ronald A.; KLAASSEN, Curtis D.; LIEBLER, Daniel; MARKS, James G. Jr; SHANK, Ronald C.; SLAGA, Thomas J.; SNYDER, Paul W. a ANDERSEN, F. Alan. Safety Assessment of Plant-Derived Fatty Acid Oils. *Online. International Journal of Toxicology*. 2017, roč. 36, č. 3\_suppl, s. 51S–129S. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1091581817740569>.
- [111] PURAVANKARA, D.; BOGHRA, V. a SHARMA, R. S. Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Online. Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, roč. 80, č. 4, s. 522–526. ISSN 0022-5142. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10970010\(200003\)80:4<522::AIDJSFA560>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)10970010(200003)80:4<522::AIDJSFA560>3.0.CO;2-R)

- [112] KALICHEM S.R.L. Olivoil Avenate Emulsifier – technický list. *Online*. Kalichem, 2021. Dostupné z: <https://www.kalichem.it/wp-content/uploads/2021/07/OLIVOIL-AVENATE-EMULSIFIER-Short.pdf>
- [113] EVONIK Dr. Straetmans GmbH. Dermosoft® 1388 ECO – technický list. *Online*. Evonik, 2019. Dostupné z: <https://glenncorp.com/wpcontent/uploads/2020/03/Dermosoft-1388-ECO.-Product-Info.-04.01.19.pdf>
- [114] ALSHEHREI, Fatimah M. Microbiological Quality Assessment of Skin and Body Care Cosmetics by Using Challenge Test. *Online*. Saudi Journal of Biological Sciences. 2024, roč. 31, č. 4, čl. 103965. ISSN 1319-562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103965>.
- [115] HALLA, Nouredine; FERNANDES, Isabel P.; HELENO, Sandrina A.; COSTA, Patrícia; BOUCHERIT-OTMANI, Zahia; BOUCHERIT, Kebir; RODRIGUES, Alírio E.; FERREIRA, Isabel C. F. R. a BARREIRO, Maria Filomena. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Online*. Molecules. 2018, roč. 23, č. 7, čl. 1571. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>. EBSCOhost+5
- [116] ČESKÁ AGENTURA PRO STANDARDIZACI. ČSN EN ISO 17516:2014. Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity. Praha: Česká agentura pro standardizaci, 2014.
- [117] BAKER, J S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *Online*. Journal of Clinical Microbiology. 1984, roč. 19, č. 6, s. 875-879. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jcm.19.6.875-879.1984>.
- [118] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TR 18811:2018. Guidelines on the stability testing of cosmetic products. Geneva: ISO, 2018.

- [119] CASAGRANDE, Rúbia; GEORGETTI, Sandra R.; VERRI, Waldiceu A. Jr.; JABOR, José R.; SANTOS, Antonio C. a FONSECA, Maria J. V. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *Online*. AAPS PharmSciTech. 2006, roč. 7, čl. 10. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/pt070110>.
- [120] VICENTINI, Fernanda T. M. C.; VAZ, Maria M. O. L. L.; FONSECA, Yara M.; BENTLEY, Michelle V. L. B. a FONSECA, Maria J. V. Characterization and stability study of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin. *Online*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2011, roč. 37, č. 1, s. 47–55. ISSN 0363-9045. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.491078>.
- [121] TAI, A., BIANCHINI, R. a JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *Online*. International Journal of Cosmetic Science. 2014, roč. 36, č. 4, s. 291–304. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12125>.
- [122] STOLIĆ-JOVANOVIĆ, Aleksandra; MARTINOVIĆ, Milica a NEŠIĆ, Ivana. The influence of selected thickeners on the textural properties of oil-in-water emulsions. *Online*. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2022, vol. 30, no. 1, s. 57–65. ISSN 0351-6083. Dostupné z: <https://doi.org/10.5937/afmnai39-31064>.
- [123] TADROS, Tharwat F., ed. *Emulsion Formation and Stability*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. 272 s. ISBN 978-3-527-31991-6.
- [124] ECCLESTON, Gillian M. Formulation studies on o/w emulsions: structural reorganization during storage. *International Journal of Cosmetic Science*. 1985, roč. 7, č. 3, s. 151–164. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1985.tb00414.x>.
- [125] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Corneometer® CM 825: The World's Most Used Skin Hydration Instrument*. *Online*. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2024. Dostupné z: [https://www.couragekhazaka.com/images/Downloads/Brochures/Wissenschaftlich/Brochure\\_Corneometer.pdf](https://www.couragekhazaka.com/images/Downloads/Brochures/Wissenschaftlich/Brochure_Corneometer.pdf)
- [126] THORNTON, M. Julie. Estrogens and aging skin. *Online*. *Dermato-Endocrinology*. 2013, roč. 5, č. 2, s. 264–270. ISSN 1938-1972. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/derm.23872>.

- [127] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Tewameter® TM 300: Skin Barrier Function and Transepidermal Waterloss*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2020. Dostupné z: <https://www.couragekhazaka.de/en/downloads/category/scientific-devices>.
- [128] GALLELLI, Giuseppe; CIONE, Erika; SERRA, Raffaele; LEO, Antonio; CITRARO, Rita; MATRICARDI, Pietro; DI MEO, Chiara; BISCEGLIA, Francesco; CAROLEO, Maria C.; BASILE, Sonia a GALLELLI, Luca. Nano-hydrogel embedded with quercetin and oleic acid as a new formulation in the treatment of diabetic foot ulcer: A pilot study. *Online*. International Wound Journal. 2020, roč. 17, č. 2, s. 485–490. ISSN 1742-4801. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/iwj.13299>.
- [129] JANGDE, Rajendra; SRIVASTAVA, Shikha; SINGH, Manju R. a SINGH, Deependra. In vitro and In vivo characterization of quercetin loaded multiphase hydrogel for wound healing application. *Online*. International Journal of Biological Macromolecules. 2018, roč. 115, s. 1211–1217. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.010>.
- [130] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Skin pH Meter PH 905: pH Measurement on Skin and Scalp*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2024. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>.
- [131] CHOI, Eung Ho a KANG, Hyun. Importance of Stratum Corneum Acidification to Restore Skin Barrier Function in Eczematous Diseases. *Online*. Annals of Dermatology. 2024, roč. 36, č. 1, s. 1–8. ISSN 1013-9087. Dostupné z: <https://doi.org/10.5021/ad.23.078>.
- [132] BO, Yang a LI, Yiming. Multi-target mechanisms and potential applications of quercetin in the treatment of acne vulgaris. *Online*. *Frontiers in Pharmacology*. 2025, roč. 16. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1523905>.
- [133] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Reviscometer® RVM 600: Interesting Aspects of Skin Aging*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>.

- [134] NEBUS, Judith; VASSILATOU, Katerina; PHILIPPOU, Lena a WALLO, Warren. Clinical improvements in facial photoaged skin using a novel oak quercetin topical preparation. *Online*. Journal of the American Academy of Dermatology. 2011, roč. 64, č. 2, Suppl. 1, s. AB73. ISSN 0190-9622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.09.324>.
- [135] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Visioscope® PC 35: Take a Close Look at Skin, Hair and Scalp*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>
- [136] YOUSIF, Hawazin Arkan; AL-ANI, Israa; ABU HAJLEH, Maha N.; MATALQAH, Sina; ABU DAYYIH, Wael a AL-DUJAILI, Emad A. Preparation and evaluation of complexed ubiquinone (coenzyme Q10) antiaging hyaluronic acid–vitamin C serum for skin care. *Online*. Journal of Cosmetic Dermatology. 2025, roč. 24, č. 1, e16706. ISSN 1473-2165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.16706>.
- [137] JONES, Ken; HUGHES, Jennifer; HONG, Mei; JIA, Qi a ORNDORFF, Steve. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Online*. Pigment Cell Research. 2002, roč. 15, č. 5, s. 335–340. ISSN 0893-5785. Dostupné z: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02014.x>.
- [138] CHOI, Moon-Hee a SHIN, Hyun-Jae. Anti-Melanogenesis Effect of Quercetin. *Online*. Cosmetics. 2016, roč. 3, č. 2, článek 18. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics3020018>.
- [139] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Skin Visiometer® SV 700: Assessing the Skin Microrelief*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>.
- [140] PONGSRIHADULCHAI, Napatthaorn; CHALERMCHAI, Thep; OPHASWONG SE, Suwirakorn; PONGSAWAT, Suriya a UDOMPATAIKUL, Montree. An efficacy and safety of nanofractional radiofrequency for the treatment of striae alba. *Online*. Journal of Cosmetic Dermatology. 2017, roč. 16, č. 1, s. 84–90. ISSN 1473-2165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12292>.

- [141] WOESSNER, Alan E.; JONES, Jake D.; WITT, Nathan J.; SANDER, Edward A. a QUINN, Kyle P. Three-Dimensional Quantification of Collagen Microstructure During Tensile Mechanical Loading of Skin. *Online*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021, roč. 9, článek 642866. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.642866>.
- [142] PEZZINI, C.; MANDEL, V. D.; PERSECHINO, F.; CIARDO, S.; KALECI, S.; CHESTER, J.; DE CARVALHO, N.; PERSECHINO, S.; PELLACANI, G. a FARNETANI, F. Seborrheic keratoses mimicking melanoma unveiled by in vivo reflectance confocal microscopy. *Online*. Skin Research and Technology. 2018, roč. 24, č. 2, s. 285–293. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/srt.12427>.
- [143] REZAEI-SADABADY, Rogaie; EIDI, Akram; ZARGHAMI, Nosratollah a BARZEGAR, Abolfazl. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes. *Online*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2016, roč. 44, č. 1, s. 128–134. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.926456>.
- [144] SIMON, Laurianne; DURAND, Erwann; DORANDEU, Christophe; BARÉA, Bruno; SANCHEZ-BALLESTER, Noelia M.; BEGU, Sylvie a VILLENEUVE, Pierre. Evaluation of antioxidant efficacy of quercetin encapsulated in micelles, mixed micelles, or liposomes in oil-in-water emulsions. *Online*. Food Chemistry. 2025, roč. 478, článek 143650. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143650>.
- [145] RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Alexander; PIMENTEL-VERA, Luisa N.; ESPEJOMOJICA, Angela J.; VAN HECKE, Annelies; TIELS, Petra; TOMATSU, Shunji; CALLEWAERT, Nico a ALMÉCIGA-DÍAZ, Carlos J. Characterization of human recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Pichia pastoris* as potential enzyme for Mucopolysaccharidosis IVA treatment. *Online*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019, roč. 108, č. 8, s. 2534–2541. ISSN 0022-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.03.034>.

- [146] KIRPOTIN, Dmitri B.; HAYES, Mark E.; NOBLE, Charles O.; HUANG, Zhaohua Richard; WANI, Kshitija; MOORE, Doug; KESPER, Kevin; O'BRIEN, Drew a DRUMMOND, Daryl C. Drug Stability and Minimized Acid-/Drug-Catalyzed Phospholipid Degradation in Liposomal Irinotecan. *Online*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2023, roč. 112, č. 2, s. 416–434. ISSN 0022-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.025>.
- [147] MOMIĆ, Tatjana; SAVIĆ, Jovana Z.; ČERNEGOV, Uroš a TREBŠE, Polonca. Protolytic Equilibria and Photodegradation of Quercetin in Aqueous Solution. *Online*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications. 2007, roč. 72, č. 10, s. 1447–1460. ISSN 0010-0765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1135/cccc20071447>.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 1 Základní klasifikace antioxidantů ( <i>zdroj: upraveno dle [6]</i> ) .....                                                     | 12 |
| Obrázek 2 Porušení redoxní rovnováhy pokožky u <i>acne vulgaris</i> ( <i>zdroj: upraveno dle [56]</i> ) .....                            | 28 |
| Obrázek 3 Porušení redoxní rovnováhy pokožky u atopické dermatitidy ( <i>zdroj: upraveno dle [56]</i> ) .....                            | 29 |
| Obrázek 4 Změny kůže během stárnutí ( <i>zdroj: [61]</i> ) .....                                                                         | 29 |
| Obrázek 5 Faktory ovlivňující stárnutí kůže ( <i>zdroj: upraveno dle [62]</i> ) .....                                                    | 30 |
| Obrázek 6 Zabudování kvercetinu do nanoformulací ( <i>zdroj: upraveno dle [70]</i> ) .....                                               | 35 |
| Obrázek 7 Vakuová odparka se vzorkem ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                                     | 50 |
| Obrázek 8 Vytvořený tenký film ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                                           | 50 |
| Obrázek 9 Připravené vzorky enkapsulovaného kvercetinu ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                   | 50 |
| Obrázek 10 Schéma přípravy krémových formulací ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                           | 53 |
| Obrázek 11 Vortex ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                                                        | 54 |
| Obrázek 12 Spiral Plater ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                                                 | 54 |
| Obrázek 13 Automatické počítadlo kolonií ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                                 | 54 |
| Obrázek 14 Stanice MPA s příslušnými sondami a Visioskop® PC 35 ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                          | 59 |
| Obrázek 15 PCA agary s narostlými koloniemi označenými 3a, 3b, 1a, 1b ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                    | 69 |
| Obrázek 16 Mikroskopické vyhodnocení narostlých kolonií na agarech PCA ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                   | 70 |
| Obrázek 17 Vyhodnocení testu přežívání bakterie <i>P. aeruginosa</i> v čase 0 (1 – ZF, 2 – EF, 3 – NF) ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....   | 72 |
| Obrázek 18 Vyhodnocení testu přežívání bakterie <i>P. aeruginosa</i> po 7 dnech (1 – ZF, 2 – EF, 3 – NF) ( <i>zdroj: vlastní</i> ) ..... | 72 |
| Obrázek 19 Rozpad formulací při 55 °C po 14 dnech ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                        | 73 |
| Obrázek 20 Rozpad formulací při 47 °C po 14 dnech ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                        | 73 |
| Obrázek 21 Časová závislost hodnot parametru L* na typu formulace a teplotách skladování (*p≤0,05) .....                                 | 74 |
| Obrázek 22 Časová závislost parametru a* na typu formulace a teplotách skladování (*p≤0,05) .....                                        | 75 |
| Obrázek 23 Časová závislost parametru b* na typu formulace a teplotách skladování (*p≤0,05) .....                                        | 76 |
| Obrázek 24 Časová závislost pH na formulacích a teplotách skladování (*p≤0,05) .....                                                     | 76 |
| Obrázek 25 Časová závislost viskozity na typu formulace a teplotách skladování (*p≤0,05) .....                                           | 77 |
| Obrázek 26 Modelová křivka jednoho cyklu deformace ( <i>zdroj: vlastní</i> ) .....                                                       | 78 |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 27 Časová závislost adhezivity na typu formulace a teplotách skladování (* $p \leq 0,05$ ) .....                       | 79 |
| Obrázek 28 Časová závislost kohezivity na typu formulace a teplotách skladování (* $p \leq 0,05$ ) .....                       | 79 |
| Obrázek 29 Časová závislost konzistence na typu formulace a teplotách skladování (* $p \leq 0,05$ ).....                       | 80 |
| Obrázek 30 Časová závislost tuhosti na typu formulace a teplotách skladování (* $p \leq 0,05$ )                                | 81 |
| Obrázek 31 Vyhodnocení pořadových zkoušek senzorického hodnocení formulací .....                                               | 82 |
| Obrázek 32 Časová závislost hydratace na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ).....                                                | 84 |
| Obrázek 33 Časová závislost TEWL na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ) .....                                                    | 85 |
| Obrázek 34 Časová závislost pH na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ) .....                                                      | 86 |
| Obrázek 35 Časová závislost elasticity pokožky po aplikaci formulace ZF (* $p \leq 0,05$ ) .....                               | 87 |
| Obrázek 36 Časová závislost elasticity pokožky po aplikaci formulace EF (* $p \leq 0,05$ ) .....                               | 87 |
| Obrázek 37 Časová závislost elasticity pokožky na formulaci NF (* $p \leq 0,05$ ).....                                         | 88 |
| Obrázek 38 Časová závislost množství pórů na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ) .....                                           | 89 |
| Obrázek 39 Množství pórů před a po 8 týdnech aplikace formulace ZF ve středové části čela (zdroj: vlastní).....                | 89 |
| Obrázek 40 Časová závislost množství pigmentových skvrn na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ) .....                             | 90 |
| Obrázek 41 Množství pigmentových skvrn před a po 8 týdnech aplikace formulace EF ve středové části čela (zdroj: vlastní) ..... | 90 |
| Obrázek 42 Množství pigmentových skvrn před a po 8 týdnech aplikace formulace EF ve středové části čela (zdroj: vlastní) ..... | 90 |
| Obrázek 43 Časová závislost množství vrásek na typu formulace (* $p \leq 0,05$ ) .....                                         | 91 |
| Obrázek 44 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace formulace NF v pravé periorbitální oblasti (zdroj: vlastní) .....      | 92 |
| Obrázek 45 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace formulace NF ve středu čela (zdroj: vlastní).....                      | 92 |
| Obrázek 46 Množství vrásek před a po 8 týdnech aplikace formulace EF v levé periorbitální oblasti (zdroj: vlastní) .....       | 92 |
| Obrázek 47 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace ZF (zdroj: vlastní) .....                                | 95 |
| Obrázek 48 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikací formulace ZF (zdroj: vlastní).....                         | 95 |
| Obrázek 49 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace EF (zdroj: vlastní) .....                                | 95 |
| Obrázek 50 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikace formulace EF (zdroj: vlastní).....                         | 95 |
| Obrázek 51 Snímky replik a 3D povrchu pokožky před aplikací formulace NF (zdroj: vlastní).....                                 | 96 |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 52 Snímky replik a 3D povrchu pokožky po 8 týdnech aplikace formulace NF<br>(zdroj: vlastní).....                                   | 96 |
| Obrázek 53 Časová závislost množství uvolněného kvercetinu .....                                                                            | 98 |
| Obrázek 54 Časová závislost kumulativní koncentrace uvolněného kvercetinu z formulace<br>EF proložena fitovaným modelem dle Rovnice 2.....  | 98 |
| Obrázek 55 Časová závislost kumulativní koncentrace uvolněného kvercetinu z formulace<br>NF proložena fitovaným modelem dle Rovnice 2 ..... | 99 |

**SEZNAM TABULEK**

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1 Složení krémových formulací.....                                                     | 52 |
| Tabulka 2 Charakterizace nosiče .....                                                          | 65 |
| Tabulka 3 Test přežívání bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve formulacích .....           | 71 |
| Tabulka 4 Součty pořadí párových porovnávacích zkoušek pro senzorické hodnocení formulací..... | 83 |
| Tabulka 5 Vyhodnocení změn parametrů drsnosti (* $p \leq 0,05$ ) .....                         | 93 |
| Tabulka 6 Vyhodnocení změn hustoty a anizotropie pokožky (* $p \leq 0,05$ ) .....              | 95 |
| Tabulka 7 Antioxidační aktivita formulací .....                                                | 96 |
| Tabulka 8 Konstanty získané pomocí matematického modelu pro testované formulace....            | 99 |

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|                         |                                                     |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|
| $^1[\text{O}_2]$        | Singletový kyslík                                   |
| AA                      | Antioxidační aktivita                               |
| AGE                     | Konečné produkty pokročilé glykace                  |
| BHA                     | Butylhydroxyanisol                                  |
| BHT                     | Butylhydroxytoluen                                  |
| Brij35®                 | Polyoxyethylen lauryletherové micely                |
| CAT                     | Kataláza                                            |
| CFU                     | Colony Forming Units                                |
| ChYGA                   | Chloramphenicol Yeast Glucose Agar                  |
| cm                      | Centimetr                                           |
| Cu                      | Měď                                                 |
| DNA                     | Deoxyribonukleová kyselina                          |
| DMPC                    | 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fofocholinové lipozomy |
| DPPH                    | Difenyl-1-pikrylhydrazyl                            |
| EF                      | Enkapsulovaná formulace                             |
| ES                      | Evropská společenství                               |
| EU                      | Evropská unie                                       |
| FDA                     | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv                  |
| GPx                     | Glutathion peroxidáza                               |
| GR                      | Glutathionreduktáza                                 |
| $\text{g/m}^2/\text{h}$ | Jednotky TEWL                                       |
| $\text{H}_2\text{O}_2$  | Peroxid vodíku                                      |
| HPLC                    | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie              |
| $\text{HO}_2\bullet$    | Hydroperoxylový radikál                             |
| IL                      | Prozánětlivé interleukiny                           |
| IgE                     | Imunoglobulin E                                     |
| INCI                    | International Nomenclature of Cosmetic Ingredients  |
| k. j.                   | Korneometrické jednotky                             |
| kDA                     | Kilodalton                                          |
| LDL                     | Low density lipoprotein                             |
| mg                      | Miligram                                            |
| mPa/s                   | Milipascal za sekundu                               |

|                      |                                               |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| Mn                   | Mangan                                        |
| mm                   | Milimetr                                      |
| mV                   | Milivolt                                      |
| N                    | Newton                                        |
| NADPH (NOX)          | Nikotinamid adenin dinukleotid fostát oxidáza |
| NaCl                 | Chlorid sodný                                 |
| NF                   | Neenkapsulovaná formulace                     |
| NLC                  | Nanostrukturované lipidové nosiče             |
| o/v                  | Emulze olej ve vodě                           |
| OH•                  | Hydroxylový radikál                           |
| <i>P. acnes</i>      | <i>Propionibacterium acnes</i>                |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| P407                 | Pluronic 407                                  |
| PBS                  | Fosfátový pufr                                |
| PCA                  | Plate Count Agar                              |
| PC                   | Fosfatidylcholin                              |
| PEG                  | Polyethylenglykol                             |
| RNS                  | Reaktivní formy dusíku                        |
| ROS                  | Reaktivní formy kyslíku                       |
| rpm                  | Otáčky za minutu                              |
| RSS                  | Reaktivní formy síry                          |
| RRT                  | Rezonanční čas                                |
| SC                   | <i>Stratum corneum</i>                        |
| SOD                  | Superoxid dismutáza                           |
| SLN                  | Pevné lipidové nanočástice                    |
| SPF                  | Sun protection factor                         |
| TBHQ                 | Terciální butylhydrochinon                    |
| TEWL                 | Transepidermální ztráta vody                  |
| TNF-α                | Tumor nekrotizující faktor                    |
| UVA                  | Ultrafialové záření typu A                    |
| UVB                  | Ultrafialové záření typu B                    |
| UV                   | Ultrafialové záření                           |
| v/o                  | Emulze voda v oleji                           |

---

|                              |                                           |
|------------------------------|-------------------------------------------|
| VVBS                         | Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele |
| WHO                          | Světová zdravotnická organizace           |
| Zn                           | Zinek                                     |
| ZF                           | Základní formulace                        |
| °                            | Stupeň                                    |
| °C                           | Stupeň Celsia                             |
| •O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superoxidový aniont                       |
| μl                           | Mikrolitr                                 |

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI: Dotazník pro senzorické hodnocení krémových formulací

Příloha PII: Kritéria pro zařazení do souboru účastníků studie

Příloha PIII: Dotazník účastníka *in vivo* studie

Příloha PIV: Podrobná metodika studie

Příloha PV: Prohlášení účastníka studie

# PŘÍLOHA PI: DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ KRÉMOVÝCH FORMULACÍ

## DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ KRÉMOVÝCH FORMULACÍ

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

Jméno a příjmení:

Hodina:

Podpis:

Datum:

Pořadový test dle intenzity znaku:

**Úkol č. 1: Seřaďte předložené vzorky krémů dle vůně (1 – nejvíce příjemná, 3 – nejméně příjemná)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmějí mít stejné pořadí.

|                   |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|
| <b>Kód vzorku</b> | 333 | 555 | 777 |
| <b>Pořadí</b>     |     |     |     |

**Úkol č. 2: Seřaďte předložené vzorky krémů dle barvy (1 – nejsvětlejší, 3 – nejtmavší)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmějí mít stejné pořadí.

|                   |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|
| <b>Kód vzorku</b> | 333 | 555 | 777 |
| <b>Pořadí</b>     |     |     |     |

**Úkol č. 3: Seřaďte předložené vzorky krémů dle roztíratelnosti (1 – nejlépe roztíratelný, 3 – nejhůře roztíratelný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmějí mít stejné pořadí.

Provedení: Špachtlí nanášejte vždy stejné množství hodnoceného vzorku krému na volární stranu levého (či pravého) předloktí a prstem roztírejte do plochy o velikosti 2×4 cm. Prst za každým vzorkem očistěte přiloženou papírovou utěrkou.

Hodnocená místa po aplikaci rozetřením vzorku krému, po uplynutí 3–5 minut, vizuálně vyhodnoťte na vstřebatelnost uvedenou v úkolu č. 4.

|                   |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|
| <b>Kód vzorku</b> | 333 | 555 | 777 |
| <b>Pořadí</b>     |     |     |     |

**Úkol č. 4: Seřaďte předložené vzorky krémů dle vstřebatelnosti (1 – nejlépe vstřebatelný, 3 – nejhůře vstřebatelný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmějí mít stejné pořadí.

|                   |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|
| <b>Kód vzorku</b> | 333 | 555 | 777 |
| <b>Pořadí</b>     |     |     |     |

Pořadový test dle preference

**Úkol č. 5: Seřad'te předložené vzorky krémů dle vlastní preference (1 – nejvíce preferovaný, 3 – nejméně preferovaný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmějí mít stejné pořadí.

| Kód vzorku | 333 | 555 | 777 |
|------------|-----|-----|-----|
| Pořadí     |     |     |     |

Párová porovnávací zkouška

**Úkol č. 6: Který z předložených vzorků krémů je lépe roztíratelný?**

| Kód vzorku |     | Odpověď | Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|------------|-----|---------|
| 555        | 777 |         | 333        | 777 |         |

| Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|
| 333        | 555 |         |

**Úkol č. 7: Který z předložených vzorků krémů je lépe vstřebatelný?**

| Kód vzorku |     | Odpověď | Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|------------|-----|---------|
| 555        | 777 |         | 333        | 777 |         |

| Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|
| 333        | 555 |         |

**Úkol č. 8: Který z předložených vzorků krémů více preferujete?**

| Kód vzorku |     | Odpověď | Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|------------|-----|---------|
| 555        | 777 |         | 333        | 777 |         |

| Kód vzorku |     | Odpověď |
|------------|-----|---------|
| 333        | 555 |         |

## PŘÍLOHA PII: KRITÉRIA PRO ZAŘAZENÍ DO SOUBORU ÚČASTNÍKŮ STUDIE

### Kritéria pro zařazení do souboru účastníků studie

Předpokladem pro zařazení do souboru pokusných osob pro epikutánní testy jsou následující kritéria:

- nepřítomnost jakéhokoliv onemocnění (i nachlazení) minimálně 1 týden před zahájením testu
- nepřítomnost jakéhokoliv kožního onemocnění (např. *psoriasis*, ekzém, rakovina kůže, jiné dermatitidy)
- nepřítomnost kožních abnormalit v místě testu (např. jizvy, mateřská znaménka, zarudnutí kůže po slunění)
- osoba nesmí mít astma, ani jiné chronické respirační choroby
- osoba nesmí mít *diabetes*, který je léčený inzulínem
- osoba nesmí být léčena pro imunodeficienci nebo autoimunitní onemocnění a neužívá léky s vlivem na imunitní systém
- osoba nesmí mít v anamnéze transplantaci orgánů a léčbu zhoubných onemocnění
- osoba nesmí užívat pravidelně léky s lokálním i celkovým protizánětlivým účinkem (např. aspirin, ibuprofen, kortikoidy)
- osoba musí být bez alergologické anamnézy
- vyloučeny jsou ženy těhotné nebo v laktaci
- vyloučena je osoba, která se současně zúčastňuje jakékoli jiné klinické studie nebo tato studie byla ukončena v době kratší než 14 dní před zahájením testu

### Kritéria pro vyřazení ze souboru účastníků studie

Ze souboru pokusných osob pro testování je vyřazena osoba, pokud:

- nedodržuje podmínky práce
- na vlastní žádost ukončí svou účast v testu
- změnil se její zdravotní stav natolik, že by tím mohl být ovlivněn výsledek testu
- dojde u ní k navození takové situace a podmínek, které mohou ovlivnit výsledek experimentu

# PŘÍLOHA PIII: DOTAZNÍK ÚČASTNÍKA *IN VIVO* STUDIE

## Dotazník účastníka *in vivo* studie

Věk:  
Pohlaví:

### Současný zdravotní stav:

| Vyskytuje se u Vás nyní:                                     | ano | ne | jaké  |
|--------------------------------------------------------------|-----|----|-------|
| lupénka                                                      |     |    | ----- |
| ekzém                                                        |     |    | ----- |
| rakovina kůže                                                |     |    | ----- |
| jiné kožní problémy a onemocnění                             |     |    | ----- |
| jizvy, mateřská znamínka, jiné vady kůže v místě testu       |     |    | ----- |
| zarudnutí kůže po slunění nebo z jiného důvodu v místě testu |     |    | ----- |
| astma vyžadující denní příjem léků                           |     |    | ----- |
| jiné chronické respirační onemocnění                         |     |    | ----- |
| diabetes vyžadující léčbu inzulínem                          |     |    | ----- |
| onemocnění imunitního systému                                |     |    | ----- |

### Zdravotní stav v minulosti

| Prodělal(a) jste:                              | ano | ne |
|------------------------------------------------|-----|----|
| transplantaci orgánů                           |     |    |
| léčbu maligního nádoru v posledních 6 měsících |     |    |

### Užívání léků

| Berate či používáte pravidelně:                                                   | ano | ne | jaké |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|----|------|
| protizánětlivé léky (např. aspirin, ibuprofen, hydrokortizon, nebo jiné steroidy) |     |    |      |
| imunosupresivní léky (např. cyklosporin A)                                        |     |    |      |
| jiné léky                                                                         |     |    |      |

### Alergologická léčba

| Probíhá u vás v současné době:                   | ano | ne | jaká |
|--------------------------------------------------|-----|----|------|
| alergologická léčba (kapky, injekce apod.)       |     |    |      |
| dostali jste poslední dávku během minulého týdne |     |    |      |
| očekáváte další dávky v průběhu studie           |     |    |      |

### Pouze pro ženy

| Jste:               | ano | ne |
|---------------------|-----|----|
| těhotná nebo kojící |     |    |

### Alergie

| Projevila se u vás někdy alergie na:           | specifikujte: |
|------------------------------------------------|---------------|
| detergenty a čisticí prostředky                |               |
| kosmetické přípravky a vůně parfémů            |               |
| přípravky do koupele a na mytí (šampón, mýdlo) |               |
| pleťové krémy a mléka, lotiony                 |               |
| antiperspiranty a deodoranty                   |               |
| léky                                           |               |
| jiné materiály                                 |               |

### Doplňující údaje

| Zdravotní stav:                                                       | specifikujte: |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------|
| používáte pravidelně jakýkoliv přípravek pro léčbu kůže               |               |
| používáte pravidelně jakékoliv léčivo (na předpis, či volně prodejné) |               |
| navštěvujete v současné době lékaře kvůli:                            |               |
| alergiím                                                              |               |
| kožním problémům                                                      |               |
| z jiného důvodu                                                       |               |
| máte nějaké jiné zdravotní potíže                                     |               |

### Účast v dalších studiích

| Studie:                                                    | Typ studie: | Datum poslední studie: |
|------------------------------------------------------------|-------------|------------------------|
| účastnil(a) jste se někdy kožního testu                    | -----       |                        |
| účastníte se v současné době jiné studie jakéhokoliv druhu |             |                        |

Datum:

### Pouze pro účely organizátora měření

Na základě zjištěných údajů je účastník a) přijat  
b) nepřijat

Zdůvodnění:

Datum:

Podpis organizátora studie:

## PŘÍLOHA PIV: PODROBNÁ METODIKA STUDIE

### Podrobná metodika studie

|                             |                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zkušební zařízení:          | stanice MPA 5/10 se sondami korneometr, tewametr, reviskometr, pH metr, visiometr a visioskop (výrobce zkušebních zařízení fa Courage & Khazaka electronic, Německo) |
| Pomůcky:                    | laboratorní sklo, buničina, pinzeta                                                                                                                                  |
| Počet aplikací:             | opakovaná                                                                                                                                                            |
| Místo aplikace              | periorbitální oblast a čelo nebo volární strana předloktí                                                                                                            |
| Množství aplikované emulze: | 0,1 ml nebo 0,1 g, plocha 8 cm <sup>2</sup>                                                                                                                          |
| Trvání testu:               | dlouhodobé (týdny)                                                                                                                                                   |
| Odstranění testované látky: | není relevantní                                                                                                                                                      |
| Intervaly odečtu:           | po předúpravě micelární vodou po 4 a 8 týdnech                                                                                                                       |
| Typ reakce:                 | změna biofyzikálních hodnot povrchu kůže                                                                                                                             |
| Stupeň reakce:              | vyjádření hodnotou měřené veličiny                                                                                                                                   |
| Vyhodnocení:                | časová změna hodnot měřených veličin                                                                                                                                 |

### Systém klasifikace kožní reakce

Kožní reakce bude hodnocena změnou číselných hodnot naměřených pomocí zařízení stanice MPA 5/10 se sondami korneometr (hydratace), tewametr (transepidermální ztráta vody) a pH metr (pH pokožky), reviskometr (elasticita), visiometr a visiosken (snímání kožního reliéfu).

## **PŘÍLOHA PV: PROHLÁŠENÍ ÚČASTNÍKA STUDIE**

### **Prohlášení účastníka studie**

Já, níže podepsaný/á souhlasím se svou účastí ve výše specifikované studii, která mi byla popsána a dostatečně vysvětlena, a která bude vedena kvalifikovanými pracovníky Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky UTB. Beru na vědomí, že experiment může zahrnovat riziko nežádoucích účinků na kůži. Toto riziko mi bylo detailně objasněno a mohl(a) jsem se informovat o všech podrobnostech experimentu.

Vím, že mohu kdykoliv odvolat svůj souhlas s účastí v experimentu a mohu kdykoliv odstoupit od své účasti v dané studii.

Mohu si vyžádat další informace o experimentu a oznámit nežádoucí účinky u hlavního řešitele studie, a to kdykoliv na určeném telefonním čísle.

Souhlasím, že data získaná během studie mohou být statisticky zpracována. Veškeré údaje o průběhu a výsledcích studie, které mne mohou identifikovat, zůstanou přísně důvěrné.

**Prohlašuji, že toto poučení plně chápu a podepisuji ho při plném vědomí.**

.....  
Jméno a příjmení:

.....  
podpis účastníka studie

Tel. kontakt účastníka studie:

Ve Zlíně dne .....