

Stabilitní studie hydrogelů s obsahem syrovátkových bílkovin

Bc. Pavlína Holčapková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavlína Holčapková**
Osobní číslo: **T12407**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stabilitní studie hydrogelů s obsahem
syrovátkových bílkovin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Klasifikujte hydrogely, popište jejich vlastnosti a využití v kosmetickém průmyslu a zdravotnictví.
2. Charakterizujte syrovátkové proteiny a jejich využití.
3. Popište vybrané složky kosmetických přípravků.
4. Uvedte náležitosti stabilitní studie.

II. Praktická část

1. Vytvořte gelový balzám na vlasy s přídavkem syrovátkových bílkovin jakožto aktivní látky.
2. Zaměřte se na výběr vhodného konzervačního systému.
3. Provedte stabilitní studii vyrobeného gelu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] OTTENBRITE, R.M. **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. New York: Springer Science+Business Media, 2010. ISBN 978-1-4419-5918-8

[2] BRANNAN, D.K. **Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook**. Florida: CRC Press, 1997. ISBN 0-8493-3713-5

[3] MARSHALL, K. **Therapeutic applications of whey protein**. *Alternative Medicine Review*. 2004, Vol. 9, No. 2, 136 - 156

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zuzana Kolářová Rašková, Ph.D.**

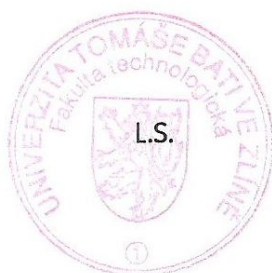
Konzultant: **Ing. Věra Halabalová, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **26. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Holčápková Pavlína

Obor: TEVTDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 25.5.2014

Holčápková Pavlína

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá hydrogely a syrovátkovými proteiny a popisuje jejich vlastnosti, klasifikaci a možnosti využití. V praktické části byla prováděna stabilitní studie hydrogelů na bázi kyseliny polyakrylové, které obsahují syrovátkové bílkoviny, vitaminy a další aktivní látky. Vyrobené hydrogely byly podrobeny zrychlenému zátěžovému testu, během kterého bylo měřeno pH a viskozita (pomocí vibračního viskozimetru SV-10). Také byly prováděny mikrobiologické testy a hodnocení klientského komfortu.

Klíčová slova: hydrogel, syrovátkové bílkoviny, stabilitní studie, zátěžové testy, viskozita

ABSTRACT

This thesis deals with hydrogels and whey proteins, and describes their characteristics, classification and fields of application. In the experimental part the stability study of hydrogels based on polyacrylic acid containing whey proteins, vitamins and other active ingredients was carried out. Prepared hydrogels were subjected to accelerated stress test, during which the pH and the viscosity (by Vibro viscometer SV-10) was measured. The microbiological tests were carried out as well as evaluation of the client's comfort.

Keywords: hydrogel, whey proteins, stability study, stress tests, viscosity

Chtěla bych zde tímto poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Zuzaně Kolářové Raškové, Ph.D. a konzultantce Ing. Věře Halabalové, Ph.D. za jejich vedení, čas, cenné rady, připomínky a pomoc, které mi byly poskytnuty během vypracovávání této práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Daniele Veselé za cenné rady a pomoc při práci v mikrobiologické laboratoři.

Také děkuji své rodině a příteli za poskytnuté podmínky k napsání této práce a podporu při studiu na vysoké škole.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HYDROGELY	12
1.1 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ.....	12
1.2 KLASIFIKACE HYDROGELŮ.....	13
1.2.1 Dělení podle původu gelotvorné látky.....	13
1.2.2 Dělení podle elektrického náboje	14
1.3 VYUŽITÍ HYDROGELŮ	15
1.3.1 Biomedicínské a farmaceutické aplikace.....	16
1.3.2 Využití v dermatologii a kosmetice.....	18
2 SYROVÁTKOVÉ BÍLKOVINY	21
2.1 PŘEHLED A VLASTNOSTI SYROVÁTKOVÝCH BÍLKOVIN	21
2.1.1 β -laktoglobulin	22
2.1.2 α -laktalbumin	23
2.1.3 Imunoglobuliny	23
2.1.4 Glykomakropeptid	23
2.1.5 Bovinní sérum albumin.....	24
2.1.6 Laktoferin.....	24
2.1.7 Laktoperoxidáza	24
2.2 FORMY SYROVÁTKOVÝCH BÍLKOVIN.....	25
2.2.1 Sušená syrovátka	25
2.2.2 Syrovátkový koncentrát (WPC)	25
2.2.3 Syrovátkový izolát (WPI)	26
2.3 VÝROBA PRODUKTŮ SYROVÁTKOVÝCH BÍLKOVIN	26
2.3.1 Membránová filtrace.....	26
2.3.2 Iontově výměnná chromatografie.....	27
2.4 VYUŽITÍ SYROVÁTKOVÝCH BÍLKOVIN	27
2.4.1 Využití v potravinářství	28
2.4.2 Terapeutické aplikace	28
2.4.3 Využití v kosmetice	29
3 DALŠÍ SLOŽKY POUŽÍVANÉ V KOSMETICE	31
3.1 LÁTKY ZVYŠUJÍCÍ STABILITU KP.....	33
3.1.1 Antioxidanty.....	33
3.1.2 Konzervační látky.....	33
3.2 VYBRANÉ BIOAKTIVNÍ LÁTKY	36
3.2.1 Glycerol.....	36
3.2.2 Panthenol.....	36
3.2.3 Kyselina hyaluronová a její soli	37
3.2.4 Ichtamol	37
3.2.5 Vitaminy	38
3.2.6 Rostlinné silice	39

4	STABILITNÍ STUDIE	40
4.1	NÁLEŽITOSTI STABILITNÍ STUDIE	41
4.1.1	Zrychlené a zátěžové testy	41
4.1.2	Testování změn vlastností KP	41
4.1.2.1	Hodnota pH	42
4.1.2.2	Viskozita	42
4.2	STABILITNÍ STUDIE HYDROGELŮ	44
5	CÍLE PRÁCE	46
II	PRAKTICKÁ ČÁST	47
6	CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ	48
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	48
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	49
6.3	POUŽITÉ POMŮCKY	49
7	POSTUPY MĚŘENÍ	50
7.1	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	50
7.2	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	50
7.3	STANOVENÍ VIZKOZITY A HODNOTY pH	52
7.4	HODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÉ STABILITY	52
7.4.1	Zkouška účinnosti protimikrobních konzervačních látek	52
7.4.2	Difuzní agarový test	54
7.5	HODNOCENÍ KLIENTSKÉHO KOMFORTU	54
7.6	RÁMCOVÉ SLOŽENÍ HYDROGELŮ	55
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
8.1	STANOVENÍ VIZKOZITY A pH	56
8.2	HODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÉ STABILITY	69
8.3	HODNOCENÍ KLIENTSKÉHO KOMFORTU	72
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	82
	SEZNAM TABULEK	83

ÚVOD

Hydrogely jako zesítené hydrofilní polymery poskytují ve svém hydratovaném stavu vynikající fyzikální, chemické i environmentální vlastnosti. Tyto vlastnosti činí hydrogely neocenitelné v mnoha oborech, zahrnujících zemědělství, zdravotnický a farmaceutický průmysl, včetně kosmetiky, hygieny aj. V kosmetice a dermatologii jsou potom hydrogelové základy využívány především díky jejich rychlému vstřebávání do povrchových struktur pokožky a tím rychlejšímu účinku aktivních látek, které se z gelových forem uvolňují a vstřebávají rychleji než například z mastí. V kosmetických přípravcích jsou často využívány hydrogely na bázi kopolymerů kyseliny akrylové (karbomery).

Syrovátka jako vedlejší produkt výroby sýrů a kaseinu obsahuje mimo řady hodnotných bílkovin také laktózu, lipidy, vitamíny a minerální látky pocházející z mléka. Z mnoha studií vyplývá, že právě zmiňované syrovátkové bílkoviny mají jednu i více biologických aktivit, což je potenciální výhodou z hlediska výživy a zdraví. Mimo potravinářství nacházejí uplatnění také ve zdravotnickém, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu.

Vzhledem k poměrně nízké stabilitě hydrogelových matric v přítomnosti vitamínů, bílkovin a dalších aktivních látek, není snadné připravit výrobek, který by splňoval požadavky všech angažovaných skupin (spotřebitelů, mikrobiologů, dermatologů, atd.).

Cílem diplomové práce je vyrobit gelový balzám na vlasy s obsahem syrovátkových bílkovin jako aktivní složky, pokusit se nalézt pro tento výrobek vhodný konzervační systém a provést jeho stabilitní studii. Jedním z požadavků bylo, aby gel obsahoval co nejvíce vitamínů (především skupiny B) a další aktivní látky vhodné pro daný typ výrobku. Tyto látky jsou spolu s charakteristikami a využitím hydrogelů a syrovátkových bílkovin popsány v teoretické části práce.

Praktická část je v podstatě stabilitní studii připravovaného výrobku pomocí zrychleného zátěžového testu. Zahrnuje měření pH a viskozity (pomocí vibračního viskozimetru) a také hodnocení klientského komfortu. Mikrobiologická stabilita je pak hodnocena zkouškou účinnosti protimikrobních konzervačních látek a pomocí difuzního agarového testu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HYDROGELY

Gely obecně jsou rosolovité disperzní systémy složené z kapalné fáze (disperzní prostředí) a bobtnající neboli gelotvorné látky (dispergovaná fáze). Jedná se o přechodovou soustavu mezi koloidní a hrubou disperzí, pro kterou je charakteristická spojitost nejen disperzního prostředí, ale také dispergované fáze [1, s. 130][2, s. 114]. Souvislou strukturu dispergované fáze představuje trojrozměrná síť, která je tvořena spojováním částic vlivem chemických a fyzikálních sil. Přestože je disperzní prostředí kapalné, mají gely v důsledku existence povrchové sítě mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav [3, s. 48].

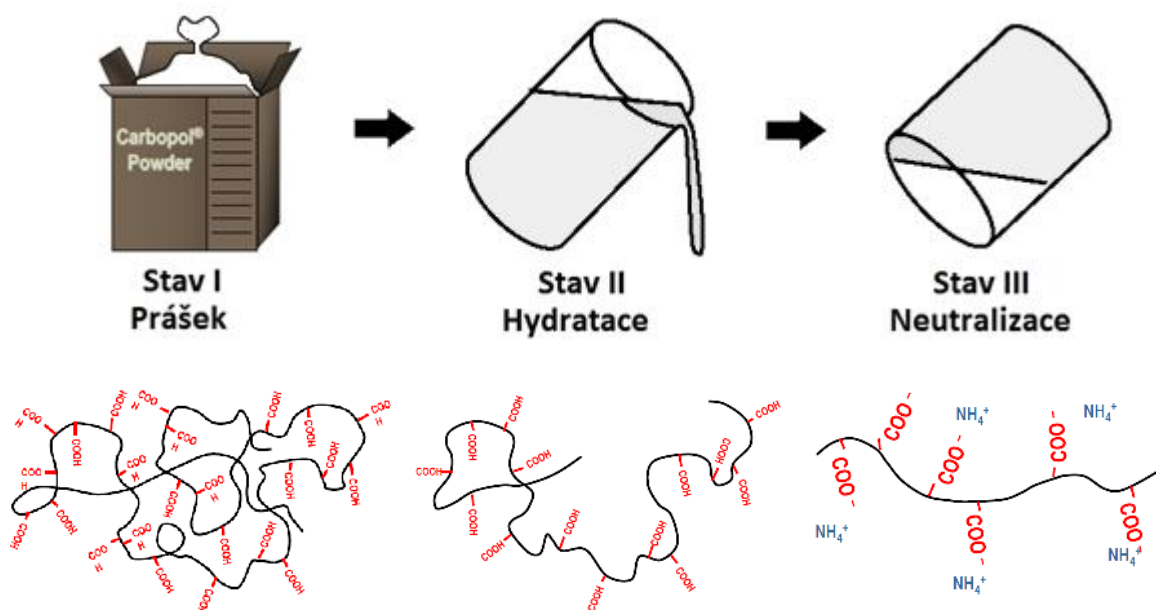
Podle typu disperzního prostředí se gely rozdělují na hydrogely a lipogely. Hydrogely jsou tvořeny hydrofilním rozpouštědlem (nejčastěji vodou) a gelotvornou látkou, kterou může být například škrob, deriváty celulózy, polyakryly, hydratovaný oxid křemičitý aj. Oproti tomu lipogely jsou tvořeny rozpouštědlem hydrofobním, tedy látkami tukové povahy (např. mastnými oleji, různými vosky, parafinovými uhlovodíky či vazelínou) a gelotvornou látkou je nejčastěji koloidní oxid křemičitý [2, s. 114, 118] [4, s. 67].

Jednou z definic hydrogelů může být například, že jsou to trojrozměrné sítě složené z hydrofilních homopolymerů nebo kopolymerů, schopných bobtnat ve vodě a zároveň absorbovat a zadržovat její velké množství. Přirozeně se vyskytující látky s těmito vlastnostmi hrají velmi důležitou roli ve všech formách života. Vzhledem k vysokému obsahu vody v hydrogelech, jejich konzistenci a mechanickým vlastnostem (měkkost a poddajnost) jsou kompatibilní s většinou živých tkání. Díky tomu jsou hydrogely na bázi přírodních i syntetických materiálů široce využívány v klinické a experimentální medicíně pro řadu biomedicínských aplikací, včetně tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny, i v mnoha dalších průmyslových odvětvích [5, s. vii][6, s. ix].

1.1 Příprava hydrogelů

Hydrogely mohou být připravovány různými způsoby v závislosti na povaze gelotvorné látky. Jedním ze způsobů je rozpouštění gelotvorných látek na dostatečně koncentrovaný roztok, kdy želatizace (rosolovatění) nastává po následném ochlazení. Další možností je nabobtnání gelotvorné látky v rozpouštědle. Speciálním případem jsou pak tzv. karbopolové gely (karbomery), u kterých želatizace nastává po úpravě pH karbomerového roztoku na neutrální hodnotu [1, s. 130]. Karbomery (vysokomolekulární zesíťené polymery kyseliny akrylové) jsou bílé hygroskopické prášky a postup přípravy

karbomerového gelu je znázorněn na *Obr. 1*. Před kontaktem s vodou (v práškové formě) je zesíťovaný řetězec polyakrylové kyseliny pevně stočený. Po rozpuštění ve vodě vzniká polymerní disperze ($\text{pH} \cong 3$) a řetězec polyakrylové kyseliny se začíná rozplétat. Posledním krokem je pak neutralizace zásaditou látkou (např. NaOH, KOH, NH_4OH či trietanolaminem), kdy dochází k vytvoření záporného náboje podél hlavního řetězce a tyto odpudivé síly zcela rozpletou řetězec polymeru, čímž vzniká polymerní gel [7].



Obr. 1. Postup přípravy karbomerového gelu a znázornění struktury řetězce [7]

1.2 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely mohou být klasifikovány z mnoha různých hledisek. Například podle původu gelotvorné látky, elektrického náboje, způsobu přípravy, struktury a fyzikálních vlastností, způsobu síťování, atd., z nichž pozornost bude dále věnována prvním dvěma dělením.

1.2.1 Dělení podle původu gelotvorné látky

Podle původu gelotvorné látky se rozlišují hydrogely přírodní a syntetické.

Přírodní hydrogely jsou tvořeny přírodními polymery na bázi proteinů (např. kolagen, želatina) nebo polysacharidů (škrob, algináty a agaróza). Syntetické polymery používané k výrobě hydrogelů jsou vyráběny chemickou syntézou. Během posledních dvou desetiletí byly přírodní hydrogely postupně nahrazeny syntetickými, které mají dlouhou životnost, vysokou schopnost absorpce vody a vysokou pevnost gelu. Syntetické polymery mají navíc

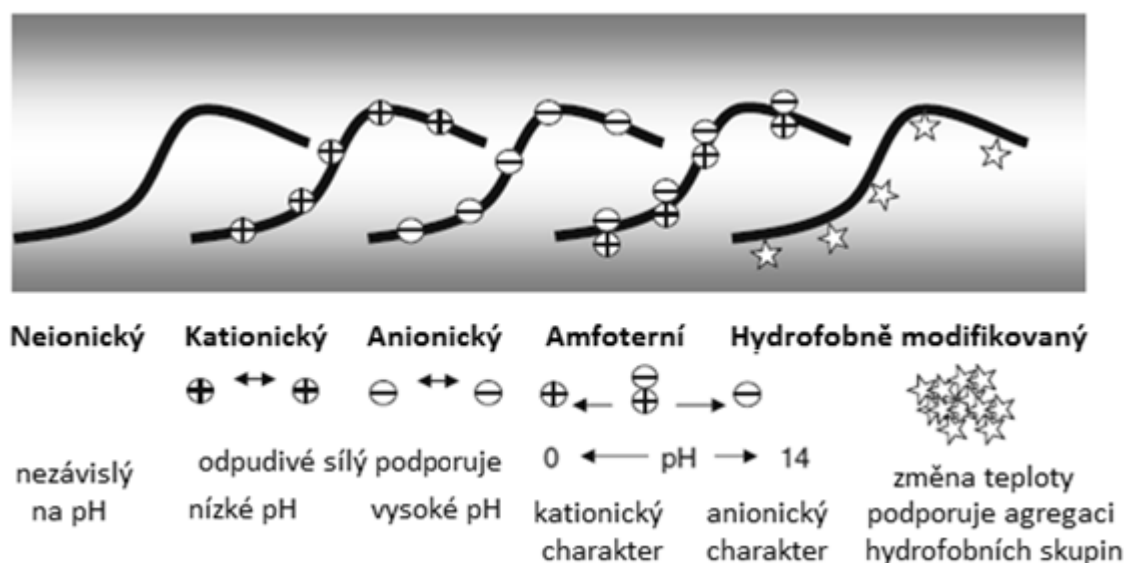
obvykle dobře definované struktury, které mohou být upravovány k získání požadovaných vlastností, funkčnosti, rozložitelnosti, odolnosti vůči změnám teploty atd. [8]. Mezi typické zástupce syntetických hydrogelů patří gely kyseliny akrylové a karbomery.

V literatuře se můžeme setkat také s pojmem polosyntetické hydrogely, mezi které lze zařadit deriváty celulózy, nejčastěji její ethery (methylcelulóza, hydroxyethylcelulóza (HEC), hydroxypropylcelulóza (HPC), karboxymethylcelulóza (CMC), aj.) [2, s. 116].

1.2.2 Dělení podle elektrického náboje

Na základě přítomnosti či nepřítomnosti elektrického náboje polymerního řetězce se hydrogely rozdělují na neionické a ionické, a ty dále na anionické, kationické a amfoterní. Zvláštním skupinou jsou pak hydrogely s hydrofilní strukturou, která současně obsahuje hydrofobní skupiny [5, s. 5][8].

Zmiňované typy hydrogelů vyžadují pro bobtnání různé podmínky a jejich struktury jsou znázorněny na *Obr. 2*.



Obr. 2. Rozdílné struktury hydrogelů [5, s. 5]

Neionické polymery tvořící hydrogely, jako jsou např. polyvinylpyrolidon (PVP), polyvinylalkohol (PVA) a polyethylenoxid (PEO, též polyethylenglykol PEG), bobtnají ve vodném prostředí díky interakci polymeru s vodou a nejsou závislé na změnách pH. Oproti tomu ionické hydrogely jsou na změnách pH závislé a pH prostředí určuje stupeň disociace polymerních řetězců. Kationické polymery nesou kladný náboj a lépe bobtnají v kyselém prostředí, protože disociace jejich řetězců nastává při nízkých hodnotách pH. Naopak

anionické polymery nesou záporný náboj a disociují při vyšším pH, tedy lépe bobtnají v neutrálních až zásaditých roztocích. Typickými zástupci anionických hydrogelů jsou karbomery. Amfolytické polymery nesou jak pozitivní tak negativní náboj a v závislosti na pH prostředí mají kationický nebo anionický charakter. Základním stavem amfolytických hydrogelů je izoelektrický bod představující hodnotu pH, při kterém nese řetězec stejné množství záporně a kladně nabitých skupin. Typickým zástupcem této skupiny je například želatina [5, s. 5].

Hydrofobně modifikované hydrogely jsou tvořeny, jak již bylo řečeno, hydrofilním řetězcem s navázanými hydrofobními skupinami. Rovnováha mezi hydrofilními a hydrofobními interakcemi se ve vodném roztoku mění v závislosti na teplotě. Při určité teplotě dochází ke shlukování hydrofobních skupin, což je příčinou vzniku gelové struktury [5, s. 5].

1.3 Využití hydrogelů

Hydrogely jako zesítené hydrofilní polymery poskytují ve svém hydratovaném stavu vynikající fyzikální, chemické i environmentální vlastnosti. Tyto vlastnosti činí hydrogely neocenitelné v mnoha oborech, zahrnujících zemědělství, zdravotnický a farmaceutický průmysl, včetně kosmetiky, hygieny atd. [5, s. 15].



Obr. 3. Využití hydrogelů [5, s. 13]

Jak je znázorněno na Obr. 3, hydrogely mohou být použity jako bobtnací (absorbční) činidla nebo jako nosiče aktivních látek. Hydrogely s vyšší bobtnací kapacitou jsou většinou používány jako součást hygienických prostředků (dětské pleny, menstruační vložky) či v zemědělských oblastech, díky schopnosti zadržovat vodu či jiné vodné roztoky. Oproti tomu hydrogely s nižší bobtnací kapacitou jsou obecně využívány jako

nosiče aktivních látek, konkrétně léčiv, pesticidů, bílkovin, barviv aj. Používané hydrogely jsou však většinou vždy speciálně navrženy a vyrobeny tak, aby bylo dosaženo požadovaných vlastností pro konkrétní použití v téměř jakémkoliv oboru [5, s. 12 – 13].

1.3.1 Biomedicínské a farmaceutické aplikace

Přírodní i syntetické hydrogely jsou používány v klinické a experimentální medicíně pro velkou škálu aplikací, zahrnující především tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu (např. chirurgické stehy, umělé orgány, protézy měkkých tkání a měkké kontaktní čočky). Dále také nacházejí uplatnění jako membrány pro biosenzory, jako bariérové materiály k regulaci biologických srůstů, využívají se k separaci biomolekul a buněk, k buněčné imobilizaci a v neposlední řadě také jako nosiče léčiv [6, s. 141 – 142].

Cílem regenerativní medicíny je nahradit, obnovit nebo doplnit nemocné či poškozené tkáně. Hydrogely jsou v tomto ohledu vhodnými materiály, díky vlastnostem podobným přírodnímu mimobuněčnému prostředí. Vysoký obsah vody a měkká konzistence hydrogelů přispívá k jejich podobnosti s přírodní živou tkání, více než kterákoli jiná třída syntetických biomateriálů. Další výhodou ve využití v tomto odvětví je také jejich vysoká biokompatibilita [6, s. 1, 141]. Využití biokompatibilních hydrogelů ve tkáňovém inženýrství je oblastí intenzivní výzkumné činnosti a používané materiály zahrnují jednak přírodní (např. fibrin, kolagen a želatina) i syntetické polymery [9, s. 619].

Hydrogelové matrice jsou využívány k opravám a regeneraci široké škály tkání a orgánů, např. tkáně chrupavky, kostní a nervové tkáně, ledvin, jater apod.

Tkáňové inženýrství kloubní chrupavky využívá hydrogely (na bázi přírodních proteinů či polysacharidů), které napodobují kolagenové síť mezibuněčné hmoty chrupavky. Ty se používají k léčbě defektů chrupavky nejen k dočasnému zmírnění bolesti, ale také k podpoře proliferace (obnově růstu) chondrocytů a regeneraci [10].

Pro použití v tkáňovém inženýrství centrální nervové soustavy (CNS) jsou velmi vhodné biomimetické gely, tzv. biogely, které představují novou třídu biologických materiálů s výjimečnými vlastnostmi. Použití biogelů pro zapouzdření nervových buněk má za následek, oproti tradičním technikám náhrady nervové tkáně, výrazné zvýšení integrace a dlouhodobé přežití implantované nervové tkáně. Vývoj nervových buněk na bázi biogelů bude mít v budoucnosti zásadní dopad v prevenci nebo ke zmírnění účinků neurologických poruch prostřednictvím doplnění nebo nahrazení nervové tkáně [6, s. 505].

Jako umělé orgány jsou využívány například hydrogely polyhydroxyethylmetakrylátu (PHEMA) a jeho kopolymerů, které fungují jako hemodialyzační membrány umělých ledvin. Umělá ledvina funguje jako hemodialyzační stroj, který čistí krev lidí se selháním ledvin (mimo tělo). Umělé ledviny, které mají ve své struktuře zabudované živé ledvinné buňky, mohou produkovat důležité hormony, zpracovávat metabolity, a zajistit imunitní funkce, což samotná dialýza neumí. Hydrogel má také velmi příznivé vlastnosti pro zapouzdření hepatocytů (jaterních buněk), je s nimi biokompatibilní a má schopnost tyto buňky udržovat ve funkčním stavu po delší dobu. Umělý hybridní systém podporující játra byl vyvinut jako hydrogel alginátu vápenatého se zabudovanými hepatocyty. Výsledky experimentu prokrvení *ex vivo* u kočky s akutní jaterní nedostatečností ukázaly, že tento systém má schopnost nahradit funkci jater [10, s. 619].

Výhodou některých hydrogelů určených k biomedicínským aplikacím je, že nejsou trombogenní, takže mohou být použity v kontaktu s krví a jsou tedy vhodné k léčbě ran, např. jako součást obvazových výrobků [5, s. 15]. Hydrogelové obvazy mají výhodné vlastnosti, které zahrnují např. okamžitou kontrolu bolesti, snadnou výměnu a manipulaci, transparentnost, jež umožňuje sledovat léčbu, absorpci a prevenci ztráty tělesných tekutin, dobrou přilnavost, propustnost kyslíku, kontrolu uvolňování léčiva a v neposlední řadě také slouží jako bariéra proti bakteriím [9, s. 620]. Mohou být použity ve dvou podobách, buďto jako amorfní gel nebo jako pružné pevné pláty (listy) či fólie. Při aplikaci na ránu ve formě gelu vyžadují obvykle hydrogelové obvazy sekundární krytí, například gázou a je třeba jejich častá výměna. Oproti tomu u hydrogelových plátů/fólií, jako polopropustných membrán je řízen přenos vodní páry skrz tuto vrstvu automaticky, a tedy sekundární krytí nevyžadují [11]. Jako obvazové materiály byly již zkoumány hydrogely na bázi kolagenu, PVA, PVP, PVA/PVP a PEO/PVA. Kolagenové hydrogely mají vysokou pevnost, nízkou roztažnost, kontrolovatelné zesítnění a nízkou antigenitu. *In vivo* studie ukázaly, že použití hydrogelů na bázi kolagenu dovozuje buněčnou migraci, potlačuje koncentraci rány a celkově tak urychluje hojení ran. PVA/PVP hydrogely jsou pak slibné pro použití jako obvazové krytí popálenin [9, s. 621].

Poslední zmiňovanou skupinou je rozsáhlé využití hydrogelů jako systémů pro přenos a řízené uvolňování léčiv. Jedním z příkladů může být chirurgická implantace léčiva v hydrogelu do těla, kde se přímo v postiženém místě lék uvolňuje difuzí nebo rozpadem hydrogelové matrice. Polymery používané jako nosiče léčiv musí být biokompatibilní, rozložitelné a jejich degradační produkty musí být netoxické a neměly by vytvářet žádnou

zánětlivou reakci [9, s. 617]. K těmto aplikacím jsou vhodné hydrogely reagující na určitý podnět nebo tzv. „chytré“ hydrogely, které procházejí velkými konformačními změnami při nepatrných změnách prostředí, jako je např. změna pH, teploty, iontové síly, tlaku, složení rozpouštědla, složení pufru, magnetického nebo elektrického pole či jejich kombinace. Tyto změny mají za následek fázové oddělení z vodného roztoku, které způsobí uvolnění léčiva obsaženého v hydrogelu. Během několika posledních desetiletí došlo k obrovským pokrokům v systémech podávání léčiv s řízeným uvolňováním na bázi hydrogelů a jejich vývoj se dále zabývá zkoumáním oblastí, kterými jsou např.:

- umožnění *in vivo* aplikací léčiv uvolňujících se z hydrogelů,
- prodloužení doby trvání uvolňování léčiva, buď rozšířením interakce léčiva s hydrogelem nebo změnou gelové mikrostruktury (hromadné či povrchové),
- rozvoj aktivovaného podávání léků v reakci na biologické podněty,
- a rozšíření nabídky moderních účinných látek, například zabudováním hydrofobních míst [6, str. 141 – 142].

Pro farmaceutické účely jsou využívány na pomoc správného rozpadu tablet a kapslí lékových forem např. CMC, PVP a sůl karboxymethylškrobu. Zástupcem přenašečů bioaktivních látek s řízeným uvolňováním je např. želatina zesíťovaná genipinem [5, s. 15]. Mezi léčiva dodávané v současné době do těla pomocí hydrogelů jako polymerních přenašečů, patří např. nitroglycerin a hormony progesteron či inzulin [9, s. 618].

Rychlost uvolňování léčiva se snižuje s nárůstem molární hmotnosti léčiva. Obecně platí, že hydrogely jsou vhodné pro řízené uvolňování většiny látek s nízkou molekulovou hmotností, tj. vodorozpustných léčiv. Kinetika uvolňování antimikrobiálních činidel jako je lysozym, nisin a benzoan sodný, byla studována u síťovaných PVA hydrogelů [5, s. 15][9, s. 617].

1.3.2 Využití v dermatologii a kosmetice

V dermatologické terapii jsou hydrogely široce používány. Hovoří se zde o tzv. hydrogelových základech, které jsou využívány jako nosiče aktivních látek a léčiv. Tyto látky se do povrchových struktur pokožky uvolňují a resorbují rychleji než z mastí, ale jejich účinnost více povrchová. Při kontaktu s kůží se hydrogely transformují do tekuté podoby a rychle se vstřebávají, podobně jako vodné roztoky. Samy o sobě působí chladivě a výhodou je také snadná smývateľnost vodou. Opakované nanášení na kůži však vede k odmaštění kožního povrchu a k přesušení kůže, a tedy hydrogely nejsou vhodné pro delší

aplikaci na primárně suchou pokožku. Vhodná je jejich aplikace do vlasaté části hlavy a na sliznice, kde obecně prodlužují čas kontaktu léčiva s daným místem [4, s. 67][2, s. 114].

Jako zevní léčiva s chladivým účinkem se hydrogely používají u svědivých a mírně zánětlivých kožních afekcí (vyrážek), jako je např. solární dermatitida (kožní reakce na slunce), urtikariální exantém (kopřivka) či reakce po bodnutí hmyzem. Léčebná aplikace gelových základů je závislá na typu použitých léčiv, jmenovitě například léčiv antiaknózních, antiseboroických, antiseptických apod. [4, s. 67].

Farmaceuticky se využívají hydrogely přírodní, syntetické i polosyntetické. Mezi přírodní lze zařadit gely škrobové (především glyceroly škrobu), tragantové, bentonitové, či gely oxidu křemičitého. Mezi polosyntetické pak hydrogely derivátů celulózy, nejčastěji methylcelulózy a sodné soli karboxymethylcelulózy. A konečně mezi syntetické hydrogely používané v tomto odvětví patří gely kyseliny akrylové a karbomery. Český lékopis 2009 uvádí karbomery jako vysokomolekulární polymery kyseliny akrylové síťované s polyalkenylethery cukrů nebo polyalkoholů. Karbomerové gely jsou bezbarvé, průhledné a působí silně chladivě. Samostatně je možno použít karbomerový gel jako lubrikans (např. gely pro sonografii) nebo jako základ gelů určených k použití na sliznici dutiny nosní, oční i ušní [2, s. 115 – 118].

V kosmetice jsou gelové přípravky také poměrně oblíbené, především díky své estetické přitažlivosti a křišťálovému vzhledu, který vyvolává dojem čistoty. Využití nacházejí především jako zahušťovadla (regulátory viskozity), suspenzní činidla, stabilizátory a nosiče aktivních látek [1, s. 164][12, s. 535][13].

Některé látky sloužící k přípravě hydrogelů, které jsou v kosmetice využívány jako zahušťovadla, jsou uvedeny v *Tab. 1*.

Tab. 1. Vybrané gelotvorné látky využívané v kosmetice jako zahušťovadla [14, s. 10]

Neionické	Anionické
Hydroxymethylcelulóza	Kyselina akrylová
Hydroxyethylcelulóza	Akryláty a metakryláty (kopolymery)
Hydroxypropylcelulóza	Karbomery
Hydroxypropylmethylcelulóza	Karagenany
Guma guar, Maltodextrin, Dextran	Karboxymethylcelulóza
Kopolymery polyethylenglykolů	Arabská guma, Xanthanová guma

Z Tab. 1 je patrné, že jako regulátory viskozity mohou být v kosmetice použity deriváty celulózy (HEC, HPC, CMC atd.). Jsou to látky poměrně stabilní a nedráždivé. Jejich nevýhodou je však složitější proces rozpouštění, což snižuje jejich technologickou hodnotu a při přípravě kosmetických přípravků proto nejsou příliš často využívány [1, s. 164]. Přesto však můžeme tyto látky najít např. v recepturách některých šamponů, tekutých mýdel, sprchových gelů, zubních past, make-upů, vlasových gelů, aj. [15].

Nejčastěji používané gelotvorné látky k přípravě hydrogelů v kosmetice jsou karbomery. Karbomer, dle INCI (Mezinárodní názvosloví kosmetických přísad) „Carbomer“, je jako kosmetická přísada řazen do kategorií stabilizátorů emulzí, gelotvorných látek a regulátorů viskozity (zahušťovadel) [16]. Díky těmto vlastnostem jsou karbomery součástí gelů na ošetřování rukou, gelů po holení, vlasových gelů a fixátorů, šamponů, nejrůznějších masek na obličej, čistících mlék, opalovacích gelů a pěn, gelových sér s aktivními látkami proti stárnutí a vráskám, a mnoha dalších přípravků [1, s. 130][15][16].

Existuje nepřeberné množství komerčních přípravků na bázi karbomerů, například Carbopol®, Acrypol®, OptasenseTM, Tego® Carbomer, Polygel CA, Synthalen®, atd. Za těmito komerčními názvy obvykle následuje číslo, které udává molární hmotnost. Například označení Carbopol® 940 říká, že tento karbomerový prášek má molární hmotnost $940 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [2, s. 117][16].

Výrobou hydrogelových produktů pro využití v kosmetice se zabývá také firma Hydromer, Inc. Jedná se konkrétně o produktové řady Aquatrix® II a Aquamere®. Hydrogely Aquatrix II, dle INCI „PVP/Carboxymethyl Chitosan“ jsou založeny na kombinaci dvou biokompatibilních polymerů PVP a chitosanu. Tyto hydrogely jsou díky svým vynikajícím soudržným, elastickým, absorpčním, zvláčňujícím a dalším vlastnostem ideální pro širokou škálu kosmetických přípravků včetně pleťových masek, hydratačních šamponů, kondicionérů, stylingových přípravků, aj. a mají také rozsáhlé použití v oblasti zdravotnictví. Produktová řada Aquamere se skládá ze čtyř různých sérií výrobků (série H, A, S a C), které se liší fyzikálními vlastnostmi a chemickým složením. V závislosti na konkrétní sérii dodávají tyto formulace různé stupně viskozity, lesku a typy základů kosmetických výrobků. Všechny polymery v rámci každé řady mají schopnost tvořit komplex s celou řadou účinných látek a organických molekul, jako jsou barviva, UV absorbenty aj. Tyto výrobky nacházejí uplatnění v tělových a opalovacích přípravcích, ve vlasové a dekorativní kosmetice, včetně barev na vlasy atd. [17][18].

2 SYROVÁTKOVÉ BÍLKOVINY

Bílkoviny neboli proteiny jsou přítomny ve všech živých tkáních a hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech. Je známo, že bílkoviny představují cenný obnovitelný zdroj a řada z nich je zpracovávána v průmyslovém měřítku v mnoha odvětvích zahrnujících potravinářství, kosmetiku, farmacii, lékařství, obalové materiály, lepidla, nátěrové hmoty, atd. [19, s. 1].

Syrovátkové bílkoviny tvoří spolu s kaseiny dvě hlavní skupiny bílkovin mléka. Kravské mléko obsahuje asi 3,5 % bílkovin, z čehož 80 % jsou kaseiny a zbývajících 20 % představují syrovátkové bílkoviny. Syrovátka je pak přirozený vedlejší produkt procesu výroby sýra. Je to nažloutlá tekutina, která vzniká po úmyslném sražení mléka a odstranění vysráženého kaseinu (sýřeniny). Z této tekutiny jsou poté za použití různých technik separace a čištění získávány syrovátkové bílkoviny. Mimo zmiňovaných bílkovin obsahuje syrovátka také laktózu, lipidy, vitamíny a minerální látky pocházející z mléka [20][21].

Syrovátkové bílkoviny obsahují všechny esenciální aminokyseliny a v porovnání s ostatními bílkovinami z jiných zdrojů dosahují v žebříčcích hodnocení kvality bílkovin jedněch z nejvyšších hodnot [21]. Vzhledem k tomu, že všechny hlavní druhy syrovátkových bílkovin jsou globulární proteiny s definovanou terciární a často také kvartérní strukturou, jsou náchylné k denaturaci pomocí tepelného zpracování. Syrovátka však většinou prochází tepelnými zákroky odlišné závažnosti ještě předtím, než začne výroba samotných syrovátkových bílkovin [19, s. 31].

Pokroky ve zpracovatelských technologiích vedly k průmyslové výrobě různých produktů s různým obsahem bílkovin z tekuté syrovátky. Tyto výrobky mají různé biologické aktivity a funkční vlastnosti. Důsledkem technologických pokroků se rozšířilo komerční využití syrovátkových bílkovin a jejich produktů [20].

2.1 Přehled a vlastnosti syrovátkových bílkovin

Hlavní syrovátkové proteiny jsou β -laktoglobulin (β -LG), α -laktalbumin (α -LA), bovinní sérum albumin (BSA) a těžké a lehké frakce imunoglobulinů (Ig). Další důležité proteiny nalezené v syrovátce, ale přítomné v menších množstvích, jsou laktoferin (LF) a laktoperoxidáza (LP). Syrovátka může obsahovat také proteoso-peptony, glykomakropeptidy a nízkomolekulární produkty vytvořené enzymatickou hydrolyzou z kaseinů v průběhu procesu výroby sýra [22, s. 15].

Složení syrovátky a syrovátkových výrobků závisí na metodách výroby, čištění a výsledné koncentraci produktu. Zastoupení a některé fyzikální vlastnosti syrovátkových bílkovin jsou uvedeny v *Tab. 2*.

Tab. 2. Typické složení a fyzikální vlastnosti bílkovin v syrovátce [22][23]

Složka	Obsah [%]	Molární hmotnost [kg/mol]	pH izoelektrického bodu
β -laktoglobulin	50 – 55	18	5,4
α -laktalbumin	20 – 25	14	4,4
Imunoglobuliny	10 – 15	150	5 – 8
Glykomakropeptid	10 – 15	8,6	< 3,8
Sérum albumin	5 – 10	66	5,1
Laktoferin	1 – 2	77	7,9
Laktoperoxidáza	0,5	78	9,6

2.1.1 β -laktoglobulin

β -laktoglobulin (β -LG) je typický globulární protein a představuje přibližně polovinu syrovátkových bílkovin kravského mléka, zatímco mateřské mléko β -LG neobsahuje. Je zdrojem esenciálních aminokyselin a obsahuje relativně vysoký podíl aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAAs), které mu poskytují některé silně hydrofobní oblasti. Díky vysokému obsahu BCAAs (konkrétně leucinu, izoleucinu a valinu) se řadí mezi jeden z nejbohatších zdrojů potravin těchto aminokyselin. β -LG je také bohatý na aminokyseliny obsahující síru, které mu dodávají vysokou biologickou hodnotu. Zvláště důležitý je pak cystein, protože po tepelné denaturaci reaguje s disulfidy κ -kaseinu a významně tak ovlivňuje srážení pomocí syřidla a tepelnou stabilitu mléka [23][19, s. 34][24, s. 188].

β -LG má pravděpodobně funkci přenašeče malých hydrofobních molekul včetně retinolu, který chrání před oxidací [23][24, s. 191].

β -LG představuje řadu funkčních a výživových vlastností, které činí tento protein multifunkční přísadou pro řadu potravinářských a biochemických aplikací. Kromě toho bylo prokázáno, že β -LG je vynikající zdroj peptidů s širokou škálou bioaktivity, konkrétně s účinky antihypertenzivními, antimikrobiálními, antioxidačními, antikarcinogenními, imunomodulačními, hypocholesterolemickými atd. [25, s. 20].

2.1.2 α -laktalbumin

α -laktalbumin (α -LA) je jedním z hlavních proteinů nacházející se jak v kravském, tak v mateřském mléce. Tvoří přibližně 20 až 25 % syrovátkových bílkovin a obsahuje celou řadu aminokyselin, zahrnujících snadno dostupné množství esenciálních aminokyselin (je dobrým zdrojem tryptofanu a cysteinu) a aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Čištěný α -LA má nejvíce strukturálně podobný profil aminokyselin ve srovnání s mateřským mlékem, a proto se nejnadhěji používá při výrobě kojenecké výživy [23].

α -LA je součástí laktóza-syntetázy, a proto je nezbytně přítomen ve všech druzích mléka, která laktózu obsahují. Bylo zjištěno, že množství laktózy je v přímé souvislosti s množstvím α -LA. Struktura této poměrně malé bílkoviny je dobře stabilizována pomocí disulfidických můstků, což znamená, že se sama o sobě může rozvinout při záhřevu a poté znovu složit do podoby blízké její nativní formě [19, s. 37].

2.1.3 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) tvoří 70 – 80 % z celkového obsahu bílkovin v mlezivu, zatímco v mléce obsahují pouze 1 – 2 % všech bílkovin. Rozdělují se do různých tříd na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností a biologické aktivity. Hlavní třídy zastoupené v mléce skotu a mateřském mléce jsou IgG, IgM a IgA. Základní struktura všech Ig je podobná, molekula má tvar písmene „Y“ a skládá se ze dvou identických lehkých řetězců a dvou těžkých řetězců, které jsou navzájem spojeny pomocí disulfidových můstků. Imunoglobuliny (Ig) plní biologickou funkci protilátek a jsou přítomny v mlezivu všech kojících druhů. Hlavní funkcí Ig je tedy ochrana novorozence proti mikrobiální infekci. Propojují různé části buněčného a humorálního imunitního systému – jsou schopny zabránit adhezi mikrobů, inhibují metabolismus bakterií, zvyšují fagocytózu bakterií, neutralizují toxiny a viry, atd. [25, s. 19].

2.1.4 Glykomakropeptid

Glykomakropeptid (GMP), označovaný také jako kaseinmakropeptid, tvoří 10 – 15 % syrovátkových bílkovin. Vzniká při procesu výroby sýrů v důsledku působení syřidla (chymosinu) na kasein. GMP je přítomen pouze tehdy, pokud se při zpracování používá chymosin. Při výrobě sýrů, které se vyrábějí bez účasti syřidla (např. Cottage), GMP nevzniká. GMP je bílkovina s vysokým obsahem BCAAs a neobsahuje aromatické aminokyseliny jako je fenylalanin, tryptofan a tyrosin. Je to tedy jedna z mála přirozeně se

vyskytujících bílkovin, která postrádá fenylalanin, a je proto bezpečný pro osoby trpící fenylketonurií [23].

2.1.5 Bovinní sérum albumin

Bovinní sérum albumin (BSA) je velký protein, který tvoří přibližně 10 – 15 % syrovátkových bílkovin. Je totožný s albuminem krevního séra. V krvi má albumin řadu funkcí, avšak v mléce nemá příliš velký význam, transportuje nerozpustné volné mastné kyseliny [22, s. 8].

2.1.6 Laktoferin

Laktoferin (LF) je železo vázající glykoprotein, který se nachází v mléce a jiných tělesných tekutinách většiny druhů savců. Je dominantní složkou syrovátkové bílkoviny v mateřském mléce, ale koncentrace ve většině komerčních syrovátkových prášcích je pouze 0,35 – 2 %. Koncentrace LF lidského mateřského mléka a mleziva je přibližně 2 mg/ml a 7 mg/ml v daném pořadí, zatímco u kravského mléka a mleziva je to asi 0,2 mg/ml a 1,5 mg/ml [23].

LF hraje důležitou roli v obranyschopnosti. Má antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé i protirakovinné vlastnosti a podílí se na regulaci imunitních funkcí. Je to bílkovina, která zabraňuje množení bakterií různými mechanismy. LF působí antibakteriálně, protože odebírá železo bakteriím, což vede k inhibici jejich růstu. Přímá vazba LF na buněčné membrány bakterií (zejména na lipopolysacharidy gramnegativních bakterií) pak způsobuje fatální strukturální škody, čímž dochází k jejich zániku [25, s. 21].

2.1.7 Laktoperoxidáza

Laktoperoxidáza (LP) je důležitý enzym přítomný ve vysokých koncentracích v kravském mléce, ale v malém množství v mléce mateřském. LP tvoří 0,25 – 0,5 % syrovátkové bílkoviny. Je to protein obsahující asi 0,07 % železa a skládá se ze dvou identických podjednotek. LP je jeden z nejvíce tepelně stabilních enzymů v mléce. V průběhu pasterizace (72 °C, po dobu 15 sekund) není LP inaktivována, ovšem zahřátím na velmi vysokou teplotu (UHT záhřev, tj. 135 °C) se tento enzym inaktivuje a používá se tak jako indikátor správného průběhu ohřevu [23][24, s. 331 – 332][26].

Význam tohoto enzymu spočívá vzhledem k jeho antibakteriální aktivitě. V přítomnosti peroxidu vodíku (H_2O_2) katalyzuje LP oxidaci thiokyanatanu (SCN^-) a některých

halogenidů (jod, brom), což v konečném důsledku vytváří produkty (např. hypotiokyanát), které inhibují a/nebo zabíjejí řadu bakteriálních druhů [23][24, s. 229].

2.2 Formy syrovátkových bílkovin

Existují tři hlavní formy syrovátkových bílkovin, které vyplývají z různých technologií výroby využívaných k jejich separaci. Rozlišujeme tedy sušenou syrovátku, syrovátkový koncentrát (WPC) a syrovátkový izolát (WPI) [21]. Složení forem syrovátkových bílkovin je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3. Složení forem syrovátkových bílkovin v % [27]

Složka	Sušená syrovátka	Syrovátkový koncentrát	Syrovátkový izolát
Bílkoviny	11 – 14,5	25 – 89	90 +
Laktóza	63 – 75	10 – 55	0,5
Mléčný tuk	1 – 1,5	2 – 10	0,5

2.2.1 Sušená syrovátka

Samotná sušená syrovátka se vyskytuje v několika různých variantách, zahrnujících sladkou či kyselou syrovátku, demineralizovanou syrovátku (primárně jako přídatná látka v potravinách, včetně kojenecké výživy) a redukované formy syrovátky [21].

Rozdíl mezi sladkou a kyselou syrovátkou spočívá v přípravě a obsahu kaseinmakropeptidu. Sladká syrovátka vzniká při klasické výrobě sýra, kdy za použití syřidla (které štěpí κ -kasein) vzniká relativně vysoké množství kaseinmakropeptidu, zatímco kyselá syrovátka obsahuje tohoto peptidu mnohem méně [19, s. 32].

2.2.2 Syrovátkový koncentrát (WPC)

Obsah bílkovin v syrovátkovém koncentrátu se může pohybovat v rozmezí 25 – 89 %. Zpracováním syrovátky na její koncentrát je odstraňována voda, laktóza, popeloviny a některé minerální látky. V porovnání se syrovátkovými izoláty, pak syrovátkový koncentrát obvykle obsahuje další biologicky aktivní složky a proteiny, které jej činí velmi atraktivním doplňkem stravy pro sportovce [21].

2.2.3 Syrovátkový izolát (WPI)

Izoláty obecně jsou nejčistší dostupné zdroje bílkovin a syrovátkové izoláty jich obsahují minimálně 90 % a více. Zpracováním syrovátky na izolát dochází ke značnému odstranění tuku a laktózy. Výsledkem toho je, že jedinci, kteří trpí laktózovou intolerancí, mohou většinou tyto produkty bezpečně užívat [27].

Přestože je obsah bílkovin v této formě syrovátkových bílkovin nejvyšší, v důsledku výrobního procesu pak často dochází k denaturaci bílkovin, tedy poškození struktury a ztrátě peptidové vazby, což snižuje účinnost bílkoviny [21].

2.3 Výroba produktů syrovátkových bílkovin

Složení produktů syrovátkových bílkovin je dáno nejen zdrojem syrovátky, ale také způsobem, kterým jsou bílkoviny koncentrovány před sušením. Převážná většina moderních komerčních produktů syrovátkových bílkovin je vyráběna jedním ze dvou uvedených způsobů, tedy membránovou filtrací nebo iontově výměnnou chromatografií [19, str. 32].

2.3.1 Membránová filtrace

Zpracování pomocí membrány je nejrozšířenější způsob pro výrobu WPC a některých WPI. Tento proces zahrnuje ultrafiltraci s použitím membrány za účelem odstranění vody, laktózy a minerálních látek. [19, s. 32].

Membránová filtrace je molekulární separační technika využívaná k oddělení molekul v roztoku na základě jejich velikosti. Využívá k tomu semipermeabilní (polopropustné) membrány s póry o různých rozměrech. Ty umožňují průchod rozpustným sloučeninám s nízkou molární hmotností (permeát), zatímco pro větší sloučeniny jsou nepropustné a zůstanou zachyceny na filtru (retentát) [22, s. 4].

Ke zpracování syrovátky se používá pět typů membránových filtrací, někdy v kombinaci. Jsou to ultrafiltrace (UF), mikrofiltrace (MF), elektrodialýza (ED), nanofiltrace (NF) a reverzní osmóza (RO). Ty se od sebe liší velikostí pórů membrán, což souvisí s molární hmotností prošlých a zachycených sloučenin. UF, MF, NF a RO jsou techniky tlakově řízené a jejich parametry jsou uvedeny v *Tab. 4*. Elektrodialýza je pak elektrochemický proces, kdy syrovátkou uvnitř komory s iontově propustnými stěnami prochází stejnosměrný proud [22, s. 4 – 6].

Po všech typech filtrací následuje sprejové sušení do získání suchého produktu (< 5 % vlhkosti). Kombinace těchto procesů jsou využívány k výrobě syrovátkových prášků s různým obsahem bílkovin [22, s. 4 – 5].

Tab. 4. Tlakově řízené membránové filtrace složek mléka [22, s. 5]

Typ	Velikost pórů [nm]	Zadržené složky	Molární hmotnost [kDa]
MF	20 – 4 000	Bakterie, kaseinové micely, tukové kuličky	100 – 500
UF	20 – 200	Syrovátkové bílkoviny	1 – 100
NF	< 2	Laktóza	0,1 – 1
RO	< 2	Ionty	< 0,1

Pro výrobu WPC s více jak 50 % bílkovin se používá ultrafiltrace následovaná diafiltrací (DF), což je přidání vody do retentátu následované druhou UF [21][22, s. 5].

Vzhledem k tomu, že molární hmotnost frakcí syrovátky není přesná, tato metoda může mít za následek ztrátu některých menších proteinů, zejména α -laktalbuminu. Z tohoto důvodu, některé membránově vyráběné WPC obsahují nižší hladiny α -LA, než by se dalo čekat [19, s. 32].

2.3.2 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná (iontoměničová) chromatografie se používá k výrobě WPI, obvykle často také ve spojení s membránovou filtrací. Principem této metody je dělení složek podle iontového náboje. Protein se váže na iontoměnič a následuje vymývání laktózy a minerálních látek. V poslední fázi je pak provedeno vymytí proteinu pomocí změny iontového prostředí a/nebo pH [19, s. 32][21].

Tato metoda produkuje velmi čistý proteinový produkt, ale může měnit složení bílkovin výrobku, protože zachovává pouze proteiny s kladným nábojem (a kyselých izoelektrických bodů), čímž do značné míry dojde k odstranění kaseinmakropeptidu z WPI ze sladké syrovátky a ovlivnění složení k vysokému obsahu β -laktoglobulinu [19, s. 32].

2.4 Využití syrovátkových bílkovin

Kdysi dávno byla syrovátka jako vedlejší produkt výroby sýrů a kaseinu na obtíž. S postupem času a zdokonalováním vědy a techniky se však z dřívějšího problému stal

„zlatý důl“. Pokroky ve zpracovatelských technologiích rozšířily komerční využití syrovátkových bílkovin a jejich produktů a vzhledem ke stále rostoucí celosvětové poptávce se jejich další růst a využití ještě očekává [20][22, s. 369].

Mnoho studií in vitro a in vivo ukázaly, že jednotlivé syrovátkové bílkoviny mají jednu nebo více biologických aktivit. Bioaktivní složky syrovátky mají potenciální výhody z hlediska výživy a zdraví, a proto nacházejí uplatnění především v potravinářském, zdravotnickém, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu [20][25].

2.4.1 Využití v potravinářství

Výhody WPC a WPI v potravinářských aplikacích zahrnuje jejich vysoký obsah bílkovin, aminokyselin, nízká energetická hodnota, nízký obsah tuku a sodíku, nepřítomnost patogenů a také toxických a antinutričních látek. Součástí mnoha potravinových systémů jsou také díky funkčním vlastnostem, mezi které patří dobrá emulgační schopnost, rozpustnost, povrchová aktivita, tvorba gelu, pěny, zadržování vlhkosti a kompatibilita s ostatními složkami. Další výhodou je také jejich relativně snadná dostupnost a dojem, že se jedná o „přírodní produkt“ [22, s. 6, 285].

Vysoká čistota bílkovin a čirost roztoků syrovátkových izolátů umožňuje jejich použití v nápojích a potravinových doplňcích. Pro svou schopnost tvorby pěny jsou často používány při výrobě zmrzlin, suflé a jiných potravinářských pěn. Nacházejí uplatnění také v pekařství, kdy kyselá sušená syrovátka zlepšuje barvu kůrky a zvyšuje chuť chleba, sušenek, sucharů a snack výrobků, kterým poskytuje zlatý povrch po upečení. Dále jsou WPC a WPI využívány při výrobě cukrovinek, polotovarů, dezertů, omáček, majonéz, kojenecké výživy, polévek, mléčných výrobků, masa, klobás, atd. [22, s. 6 – 10]. WPC jsou díky pozitivnímu vlivu na nárůst svalové hmoty, síly a sportovního výkonu bez významných nežádoucích účinků, také velmi oblíbené doplňky výživy mezi sportovci, především věnujících se kulturistice a fitness cvičení [28].

2.4.2 Terapeutické aplikace

Biologické složky syrovátky vykazují řadu imunitu zvyšujících vlastností. Kromě toho má syrovátka či její jednotlivé komponenty schopnost působit jako antioxidant, má protizánětlivé, antihypertenzivní, antikarcinogenní, antivirové a antibakteriální účinky a může působit jako chelatační činidlo. Primární mechanismus účinku spočívá v

intracelulární konverzi aminokyseliny cysteinu na glutathion (silný intracelulární antioxidant), což může tělu pomáhat v boji proti různým nemocem [23][20].

Řada klinických studií byla úspěšně provedena za použití syrovátky v léčbě rakoviny, HIV, hepatitidy B, kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, diabetes II. typu a obezity. Na imunitní modulaci se nejvíce podílejí laktoferin a imunoglobuliny, které jsou atraktivní jako funkční potraviny pro pacienty s oslabenou imunitou a jako antimikrobiální činidlo [23][22, s. 345].

V některých případech byly výhody a léčebné vlastnosti syrovátkových bílkovin a peptidů prokázány klinickými studiemi na lidech, ale většina experimentálních výsledů byla získána ze studií na zvířatech. Ve vědeckých poznatcích tedy stále existují mezery a k rozšíření terapeutického využití syrovátkových bílkovin a peptidů je tedy potřeba dalších klinických studií [20][25, s. 276].

2.4.3 Využití v kosmetice

Syrovátková bílkovina, dle INCI „Whey Protein“, je řazena do kategorií „Hair conditioning“ a „Skin conditioning“, tzn. látek se zvlhčujícími účinky na vlasy a pokožku. Uplatnění tedy nachází ve výrobcích, jako jsou krémy, šampony, vlasové balzámy, omlazující či rozjasňující séra aj. [29].

Komerčními složkami kosmetických přípravků na bázi syrovátkových bílkovin jsou například Lumerrin™ a Bioferrin® 5000, což jsou přírodní látky izolované ze sladké syrovátky pomocí pokročilých frakcionačních technik.

Bioferrin® 5000, dle INCI „Apo-Lactoferrin“, je biologicky aktivní protein, který byl patentován pro zvyšování koncentrace kyseliny hyaluronové v lidské tkáni vedoucí ke zvýšení hydratace pokožky po místní aplikaci a je zvláště vhodný pro použití v přípravcích na citlivou pokožku. Lumerrin™, dle INCI „Hydrolyzed Whey Protein“, je přírodní přípravek biologicky aktivních peptidů. V hyperpigmentačních studiích, bylo prokázáno, že snižuje hromadění melaninu, a může tak být užitečný v kosmetických aplikacích pro zjasnění pokožky a minimalizaci stařeckých skvrn. Tato látka nachází uplatnění v mnoha výrobcích, jako jsou pleťové krémy a séra, krémy na ruce, tělová mléka, zklidňující krémy a mléka po opalování, či sprchové gely [29][30].

Na podporu zdravého vzhledu pokožky byla vyvinuta látka s obchodním názvem Praventin™, což je bílkovinný komplex bohatý na laktoferin pocházející ze syrovátky,

který je určen k ústnímu užívání. Vliv této látky na zdravou pokožku byl prokázán v několika studiích se skupinami amerických a asijských teenagerů. Tyto studie ukázaly, že perorálně podávaný laktoferin snižoval výskyt skvrn a zarudnutí u jedinců s problémovou pleť. Mechanismus vysvětlující pozitivní účinky této látky není dosud zcela objasněn. Avšak některé z prokázaných biologických vlastností laktoferinu kravské syrovátky (tj. antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky) jsou pravděpodobně důležité pro prevenci a léčbu zdravé pokožky, což může být předpokladem, že Praventin™ působí prostřednictvím jednoho nebo v kombinaci těchto tří různých mechanismů podporujících zdravou pleť [31, s. 386 – 396].

Jak již vyplývá z předchozího textu, použití samotného laktoferinu jako frakce syrovátkové bílkoviny je v kosmetice pro jeho účinky velmi oblíbené. Vzhledem k potenciálnímu synergickému efektu se laktoferin používá společně s lysozymem (enzym s antibakteriálními účinky) a laktoperoxidázou do výrobků pro ústní zdravotní péči, jako jsou zubní pasty, ústní vody, hydratační gely i žvýkačky [25, s. 22].

Velmi cennou surovinou pro kosmetiku je také syrovátka z kozího mléka. Syrovátkové bílkoviny podporují hydrataci kůže, zabraňují jejímu vysušování, zlepšují její prokrvení a tím i její odolnost. Mimo prospěšné bílkoviny obsahuje kozí syrovátka také spoustu dalších prospěšných látek pro použití v kosmetice, jako jsou kyselina mléčná, citronová, antioxidanty, vitaminy skupiny B a kyselina pantotenová. Celkově jsou tedy kosmetické přípravky s obsahem syrovátky kozího mléka velmi vhodné pro ošetření citlivé dehydratované pleti a rovněž mastné problematické pleti se sklonem k akné. Používají se v léčbě a prevenci akné, atopického ekzému a lupénky [32].

Jistou zajímavostí v kosmetice je využití oslího mléka, které je svým složením velmi podobné mléku mateřskému. Minerály, vitamíny, mastné kyseliny, bioaktivní enzymy a koenzymy, laktóza a syrovátkové bílkoviny obsažené v tomto mléce, zabraňují procesu stárnutí pokožky a mají hydratační účinky [33]. Oslí mléko také podporuje proces hojení. Obsažené minerální soli podporují čištění pleti pomocí efektivního urychlení odstraňování odumřelých buněk, čímž se uvolňuje prostor pro růst nových, zdravých buněk. Obsažené látky urychlují léčbu onemocnění typu ekzému nebo lupénky a zároveň pomáhají zachovat pružnost pleti [34].

3 DALŠÍ SLOŽKY POUŽÍVANÉ V KOSMETICE

Počet různých druhů surovin použitelných v kosmetice se pohybuje okolo šesti až deseti tisíc. Tyto suroviny mohou být rozděleny podle různých kritérií, nejčastěji podle chemické podobnosti nebo funkce, kterou v kosmetickém přípravku (KP) zastávají. Některé ze surovin patří mezi aktivní složky, které mají blahodárné účinky na pokožku, vlasy nebo nehty a jsou obvykle používány v omezeném množství. Ostatní složky jsou potom používány k formulování výrobku nebo vytvoření vehikula, tj. základu kosmetického přípravku. Tyto látky jsou používány v poměrně velkém množství a jejich výsledná kombinace udává povahu kosmetického přípravku [1, s. 146][9, s. 10].

Podle převažujících účinků lze kosmetické suroviny rozdělit na humektanty, emolienty a okluzíva (látky lipidní povahy), emulgátory a čisticí látky (tenzidy), zahušťovadla a regulátory viskozity, antimikrobika, antioxidanty, vonné látky, barviva, atd. Avšak je třeba zdůraznit, že každá látka může v KP zastávat více než jednu, ne-li řadu funkcí, a proto může být řazena i do několika ze jmenovaných skupin, které budou dále stručně popsány.

Humektanty jsou hygroscopické látky schopné vázat vodu (resp. vlhkost) v širokém rozmezí relativní vlhkosti okolí. Vlastnosti těchto látek jsou podobné látkám NMF (Natural moisturizing factor), což jsou nízkomolekulární látky, jejichž prostřednictvím jsou korneocyty (buňky nejsvrchnější vrstvy pokožky, tj. *Stratum corneum* (SC)) schopny zadržovat vodu ve své struktuře a je tak zabezpečena optimální hydratace kůže. Kategorizace těchto látek je obtížná a nejjednodušeji je lze rozdělit na látky totožné s NMF (např. močovina, kyselina mléčná, sodná sůl kys. pyrrolidon karboxylové, aj.) a látky, které součástí NMF nejsou. Do druhé zmíněné skupiny patří především polyoly (glycerol, sorbitol, panthenol, aj., z nichž některé budou dále podrobněji popsány), případně některé polysacharidy či hydrolyzáty bílkovin [35, s. 34, 39].

Emolienty a okluzíva jsou látky, které mají změkčující a zklidňující účinek na kůži. Tyto látky přispívají k hydrataci pokožky, avšak jiným mechanismem než humektanty a prakticky všechny přispívají ke zlepšení vzhledu pokožky. Rozdíl mezi těmito skupinami přísad je uváděn v tom, že emolienty zůstávají na povrchu kůže a působí jako mazadlo, kdežto okluzivum brání odpařování vody z povrchu kůže, čímž nepřímo zvyšuje její obsah v pokožce. Většina emolientů však také omezuje odpařování vody z povrchu kůže, čímž vykazuje v podstatě okluzivní účinek, a proto není snadné suroviny mezi tyto skupiny rozdělovat. Lepší klasifikace látek s emoliačními a okluzivními účinky je podle polarit,

konkrétně na emolienty nepolární, středně polární a polární. Mezi nepolární emolienty jsou řazeny především produkty petrochemie, z nichž nejběžnější jsou minerální oleje, parafíny, isoparafíny, petrolatum aj. Nejrozšířenější a nejobjemnější skupinou emolientů jsou však středně polární emolienty, mezi které patří estery přírodního či syntetického charakteru, tj. tuky a oleje (rostlinné i živočišné) i některé vosky [35, s. 51 – 53].

Jako emulgátory a čistící látky nacházejí v kosmetice uplatnění tenzidy neboli surfaktanty. Jsou to povrchově aktivní látky, které mimo zmiňované čistící a emulgační funkce mají také smáčecí, dispergační a solubilizační vlastnosti a jsou schopné tvořit pěnu. Tenzidy jsou klasifikovány na základě iontového charakteru na ionické (anionické, kationické a amfoterní) a neionické. Na rozdíl od průmyslových aplikací je výběr tenzidů pro využití v kosmetice poněkud omezen a díky jejich kontaktu s pokožkou je přednostním požadavkem minimální iritace. Dalšími faktory pro výběr vhodného tenzidu jsou vůně, barva a čistota tenzidu [9, s. 17][35, s. 86 – 87].

Zahušťovadla a regulátory viskozity nacházejí uplatnění především u přípravků s vyšším obsahem vody, případně u emulzí typu o/v (olej ve vodě), které jsou základem většiny hydrofilních krémů. Surovin schopných zvýšit viskozitu vody je poměrně velké množství a velmi často se jedná o látky polymerní povahy [1, s. 164]. Tyto látky využívané v kosmetice byly již zmíněny v kapitole o využití hydrogelů v dermatologii a kosmetice, a některé z nich byly uvedeny v tabulce č. 1.

Vonné látky jsou v kosmetice využívány po celou dobu její historie. Původně byly používány pouze látky přírodního původu, a to jak rostlinné, tak živočišné. S rozvojem průmyslové výroby kosmetických surovin se objevila snaha o přípravu vůní syntetických, kterých je dnes již nepřehledné množství. Jedná se o různorodou skupinu látek, např. estery, aldehydy, ketony, alkoholy, terpeny, aj. Nejdůležitější roli hrají při výrobě parfémů a hojně jsou využívány také pro tzv. parfemaci běžné kosmetiky [1, s. 167][35, s. 136].

Barviva tvoří z chemického hlediska také velmi různorodou skupinu látek. V kosmetice nacházejí uplatnění především v odvětví dekorativní kosmetiky. V ostatních oborech pak slouží k vylepšení vzhledu přípravku nebo k zamaskování neestetického zbarvení použitých surovin. Speciální skupinou jsou pak barviva na vlasy [35, s. 122].

Problematika látek s antimikrobními a antioxidačními účinky se týká zpracování praktické části práce, a proto bude těmto skupinám věnována pozornost dále v samostatné kapitole.

3.1 Látky zvyšující stabilitu KP

Během skladování a používání KP je důležité, aby nedocházelo ke změnám, jejichž příčinou může být působení vzdušného kyslíku nebo mikroorganismů. K zajištění oxidační stability a pro kontrolu mikrobiální kontaminace, tzn. ke stabilizaci složení přípravku, slouží antioxidanty a konzervační látky [1, s. 165].

3.1.1 Antioxidanty

Rostlinné a živočišné tuky a oleje i některé vosky obsažené v KP mohou po určité době podléhat procesu žluknutí. Jeho příčinou je oxidace mastných kyselin působením vzdušného kyslíku, za vzniku organických peroxidů, aldehydů, ketonů a dalších látek, nepříjemně zapáchajících. Tímto způsobem změněné suroviny jsou pro kosmetické účely nepoužitelné, jak z hlediska estetického, tak i kvůli dráždivému působení na pokožku. Antioxidanty jsou látky, které zabraňují, zpomalují nebo oddalují oxidaci složek KP, tím že se přednostně oxidují za vzniku nedráždivých látek nebo jinými různými mechanismy. Mezi nejznámější z nich patří tokoferoly (vitamin E) a kyselina askorbová (vitamin C), dále estery kyseliny gallové, askorbylpalmitát a také syntetické antioxidanty butylhydroxyanisol (BHA) a butylhydroxytoluen (BHT) [1, s. 165 – 166][9, s. 13].

3.1.2 Konzervační látky

Konzervační látky (antimikrobika) jsou běžně přidávány do všech KP, které mohou podporovat růst mikroorganismů (MO), zvláště pak do přípravků s obsahem vody, jako jsou emulze či gely. Ty mohou být snadno napadeny MO, jako jsou bakterie, kvasinky i plísně. Kromě rozkladu přípravku a nežádoucích změn jeho vlastností (změna vůně, barvy, konzistence atd.), ke kterým může dojít, představuje přítomnost MO také riziko především pro zdraví spotřebitele [1, s. 166][35, s. 105].

Příčinou mikrobiální kontaminace KP mohou být suroviny (především přírodního charakteru), voda, lidské zdroje i prostředí výroby. Přestože výroba sterilní kosmetiky je možná, udržování sterility KP při běžném používání je problematické, protože prsty či kosmetické aplikátory ani okolní prostředí sterilní nejsou. Výrobky by proto neměly podporovat růst nebo životaschopnost MO, které mohou být do KP náhodně zavedeny a konzervační látky v nich obsažené by měly být schopny případnou mikrobiální kontaminaci při běžném denním používání snižovat [9, s. 13].

Použití konzervačních látek představuje na jednu stranu ochranu zdraví uživatelů kosmetiky před MO, na druhou stranu však mohou mít některá antimikrobika negativní účinky na kůži. Například mohou působit dráždivě nebo jako senzibilizátory (tj. látky odpovědné za vznik přecitlivělosti) [9, s. 15]. Proto kromě výběru správného konzervatu musí být dobře zvoleno také jeho použité množství, které zabrání kontaminaci a zároveň nepředstavuje pro uživatele riziko nežádoucích zdravotních účinků.

V současné době se musejí výrobci kosmetiky v ČR řídit Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, o kosmetických přípravcích [36], které obsahuje v příloze č. V seznam konzervačních přísad povolených v KP. V tomto seznamu je kromě názvů (chemických i INCI) a identifikačních čísel daných látek uveden také druh výrobků, pro které je vhodné jejich použití spolu s nejvyššími povolenými koncentracemi.

Volba konzervační látky pro daný výrobek je obtížná. V řadě přípravků je přítomna směs různých konzervačních přísad, o které se potom hovoří jako o konzervačním systému KP [9, s. 13][35, s. 105]. Mezi nejdůležitější faktory, které by měly být zvažovány při sestavování konzervačního systému, patří: 1) spektrum účinnosti vybraných konzervantů (musí být v souladu s MO, které jsou ve výrobku přítomny, resp. očekávány při jeho použití); 2) vlastnosti výrobku (jeho složení, pH, vodní aktivita, přítomnost látek snižujících účinnost konzervantu, atd.); 3) podmínky přípravy výrobku (především teplota); a konečně 4) typ budoucího použitého obalového materiálu [35, s. 116 – 117].

Jak již bylo zmíněno v bodě 2), je důležité brát v potaz složení výrobku a zejména látek, které snižují účinnost konzervatu. Může jít např. o látky, které slouží MO jako zdroj uhlíku a energie, mezi které patří proteiny, lipidy, polysacharidy, různé rostlinné extrakty atd. Nebo také látky, které jsou schopné interakcí s daným konzervatem (proteiny, tenzidy, aj.). V těchto případech je pak nutné buďto zvýšit koncentraci antimikrobik (což může vést ke zvýšení senzibilizace) nebo se pokusit sestavit jiný konzervační systém [35, s. 118].

V kosmetických přípravcích jsou používány jak syntetické, tak přírodní konzervační látky. Na základě podobného mechanismu účinků mohou být kosmetické konzervanty rozděleny například na: organické kyseliny a jejich deriváty, alkoholy, deriváty isothiazolinonu, donory formaldehydu, halogenové deriváty, látky typu kationických tenzidů a chelatační činidla [35, s. 107 – 116][37, s. 164]. Zmíněné skupiny nezahrnují všechny látky používané jako konzervační přísady KP, ale většinu běžně používaných ano. Příklady nejčastěji využívaných konzervačních látek jsou uvedeny v *Tab. 5*.

Tab. 5. Nejčastěji využívané kosmetické konzervanty [35, s. 107 – 116][37, s. 164 – 173]

Organické kyseliny a jejich deriváty	- kys. benzoová a její sodná sůl, kys. sorbová a její draselná sůl, kys. salicylová - estery kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové (parabeny): nejčastěji methyl-, <i>n</i> -propyl- a <i>n</i> -butylparaben
Alkoholy	- alifatické – ethanol, isopropanol - aromatické – benzyl alkohol a deriváty fenolu (fenoxyethanol, <i>o</i> -fenylnol a jeho sodná sůl, chloroxyfenol, resorcinol)
Deriváty isothiazolinonu	- methylisothiazolinone (MIT), benzisothiazolinone (BIT), chloromethylisothiazolinone (CMIT)
Donory formaldehydu	- imidazolidinyl urea, DMDM, quaternium-15 - bromonitro sloučeniny (Bronopol, Bronidox)
Halogenové deriváty	- triclosan, chlorfenesin, dibromdykyanobutan
Látky typu kationických tenzidů	- benzalkonium chlorid, cetylpyridinium chlorid
Chelatační činidla	- ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA), její sodná a draselná sůl

Je třeba zdůraznit, že problematika kosmetických konzervantů je velice obsáhlé téma a vzhledem k rozsahu této práce není možné se zabývat všemi oblastmi jako například jejich charakteristikami, konkrétním použitím, oblastí účinnosti atd.

Přesto vzhledem k obsahu praktické části práce budou na závěr velmi stručně popsány antimikrobní látky použité při výrobě gelového balzámu. Jedná se konkrétně o salicylan sodný, sorban draselný, methylparaben, imidazolidinyl ureu, nisin a tymiánovou silici.

Salicylan sodný a **sorban draselný** patří mezi soli organických kyselin salicylové a sorbové. Jejich optimální účinnost leží v kyselé oblasti pH (do pH kolem 5 – 6). Ve formě svých kyselin je salicylan širokospektrá látka (působí na všechny typy MO), sorban je pak účinný především na kvasinky a plísň [35, s. 107 – 108]. Nejvyšší povolená koncentrace salicylanu sodného v KP je 0,5 % a sorbanu draselného 0,6 % [36].

Methylparaben je methylester kyseliny *p*-hydroxybenzoové. Parabeny obecně jsou širokospektré (účinné proti grampozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním) a lze se s nimi setkat prakticky ve všech KP. Výhodou těchto látek je jejich dobrá stabilita a nízká cena, jistou nevýhodou pak horší snášenlivost s neionickými a kationickými tenzidy [9, s. 196] [35, s. 108]. Nejvyšší povolená koncentrace metylparabenu v KP je 0,4 % a při použití v kombinaci s jinými parabeny je jejich celkové povolené množství 0,8 % [36].

Imidazolidinyl urea je dobře rozpustná ve vodě a účinná v rozmezí pH4 – 9, ale pouze proti bakteriím. Oproti jiným derivátům uvolňuje menší množství formaldehydu, proto lze očekávat menší senzibilaci na formaldehyd. V KP je součástí především vlasové kosmetiky a deodorantů [35, s. 112 – 113]. Nejvyšší povolená koncentrace v KP je 0,6 % [36].

Nisin je přírodní antibakteriální látka, kterou produkují bakterie mléčného kvašení *Lactococcus lactis*. Jedná se o látku bezpečnou pro lidské zdraví, kterou ovšem nelze syntetizovat. Nisin je účinný především proti gram pozitivním bakteriím [38].

3.2 Vybrané bioaktivní látky

Uvedené aktivní látky v této kapitole tvoří jen velmi malou část z mnoha v současnosti používaných látek. Pozornost bude věnována látkám využívaným kosmetice a dermatologii se zaměřením na látky použité k výrobě gelového balzámu v praktické části.

3.2.1 Glycerol

Glycerol, dle INCI „glycerin“, je čirá, bezbarvá, viskózní, hygrokopická kapalina, která patří mezi polyoly a je asi 0,6x sladší než třtinový cukr. V kosmetice je využíván jako humektant (jeho hygrokopicitata je téměř srovnatelná s látkami NMF) a pro své ochranné a plastifikační vlastnosti (způsobuje zvýšení pružnosti pokožky). Bylo zjištěno, že přispívá ke zvyšování objemu korneocytů a zároveň ke zvětšování vzdálenosti mezi jejich jednotlivými vrstvami, čímž přispívá k dalšímu zvýšení obsahu vody ve SC. Jeho působení také brání krystalizaci lamelárních lipidních struktur při nízké relativní vlhkosti. Vzhledem k dobré rozpustnosti glycerinu ve vodě bývá nejčastěji součástí vodné fáze emulzních prostředků v množství kolem 10 %, v hydratačních přípravcích k léčbě suché pokožky pak může být obsažen v množství až 20 – 25 %. Použití čistého glycerolu nebo jeho velmi vysokých koncentrací však není vhodné, protože v tomto případě dochází k odebírání vlhkosti z pokožky, tedy jejímu vysoušení [35, s. 42][39, s. 110].

3.2.2 Panthenol

Panthenol je čirá, téměř bezbarvá, viskózní, hygrokopická kapalina. Je to alkoholický analog kyseliny pantothenové (vitamin B₅), která je součástí koenzymu A. V organismu je na vitamín rychle oxidován, a proto bývá někdy označován jako provitamin B₅. Panthenol se vyskytuje ve formě D a L enantiomerů. Biologicky aktivní je však pouze D-panthenol (dexpantenol). V kosmetice a dermatologii je využíván stejně jako glycerol jako

humektant a plastifikátor SC. Má také regenerační účinky na kůži po opalování, potlačuje zarudnutí, zlepšuje hojení ran a spálenin, tlumí stárnutí pleti a rozvoj vrásek a celkově přispívá ke zklidnění pokožky. Díky jeho substantivitě ke keratinu je často využívám ve vlasové kosmetice a ve vlasových šamponech bývá obsažen v množství 0,5 – 2 %. Povrchově aplikovaný D-panthenol snadno proniká do kůže i vlasů, a proto je součástí celé řady KP a léčebné kosmetiky. V různých recepturách bývá obsažen v množství do 15 %, ovšem jako minimální účinný obsah je považováno 1 % této suroviny [35, s. 43].

3.2.3 Kyselina hyaluronová a její soli

Kyselina hyaluronová patří mezi polymerní látky označované jako glykosaminoglykany (GAG). Jedná se o nerozvětvený polysacharid s disacharidickou jednotkou, kterou tvoří kyselina glukuronová a (N-acetyl)glukosamin. Vzhledem k tomu, že v organismu se nachází spíše jako sodná nebo jiná sůl, bývá často označována také jako „hyaluronan“. Všechny GAGy jsou vzhledem k jejich anionickému charakteru schopny přijímat a zadržovat ve své struktuře velké množství vody. Například sama kyselina hyaluronová je schopna vázat řádově 10^3 více vody než sama váží. Hydratační účinek těchto látek je však odlišný od působení humektantů, protože vzhledem k jejich velké molekule nejsou schopny významnější difuze do SC. Významnou vlastností je ale substantivita k proteinům, zejména ke keratinu. Na proteinovém podkladu vytváří film, který mimo to, že brání ztrátě vody, má také kondičiační účinek. V KP je používána především ve formě sodné soli, která je lehce zabudovatelná do emulzních přípravků a již v koncentraci 0,2 % výrazně omezuje odpařování vody z pokožky. Významné uplatnění nachází také v prostředích péče o zralou pleť, protože mezi změny stárnoucí kůže patří i ztráta vody ve SC. K tomuto použití však musí být použita kyselina s větší distribucí, respektive s nižší molární hmotností [35, s. 27, 49][39, s. 111].

3.2.4 Ichtamol

Ichtamol je hlavním představitelem bituminózních dehtů (sulfonovaných živičných olejů), které jsou získávány z důlních sedimentů v hnědouhelných dolech. Z chemického hlediska se jedná o směs amonných solí sulfonových kyselin (obsahuje organicky i anorganicky vázanou síru a amoniak aj.). Je to hustá, hnědočerná tekutina charakteristického (rybího) zápachu a patří mezi povrchově aktivní látky s anionickým charakterem. Účinky ichtamolu jsou antipruriginózní (proti svědění), antiflogistický (tlumí zánět), antiseboroický (snižující nadměrnou tvorbu mazu), slabě antimikrobiální a antimykotický. Toho je využíváno u řady

dermatóz, např. u lupénky, atopického a mikrobiálního ekzému, seboroické dermatitidy aj. Jeho předností jsou také minimální iritační, senzibilizační a fotosenzibilizační účinky. Běžná terapeutická koncentrace je v rozmezí 2 – 10 %, nejčastěji ve formě mastí, past, roztoků, ale také jako součást vlasových šamponů a tekutých mýdel. Vysoká koncentrace 20 – 50 %, je pak používána např. u omrzlin a některých typů pyodermií (hnisavé kožní infekce), často i v kombinaci s kyselinou salicylovou [2, s. 104][40].

3.2.5 Vitaminy

Vitaminy jako biokatalyzátory jsou potřebné pro normální funkci organismu a jejich prvotní význam pro zdravou pokožku, vlasy a nehty je ve výživě. Jako složka KP jsou pak využívány v tucích rozpustné vitaminy A (příp. jeho prekurzor β -karoten), D, E a K a ve vodě rozpustné vitaminy skupiny B (především vit. B₅) a vit. C [1, s. 173][12, s. 1067].

V praktické části práce byl použit β -karoten, vitamin E, C a z vitaminů skupiny B potom vitamin B₁ (thiamin), B₆ (pyridoxin) a provitamin B₅ (panthenol), který je na vitamin B₅ (kyselinu pantothenovou) v organismu rychle oxidován, viz kapitola 3.2.2. o panthenolu.

β -karoten

β -karoten je žluté barvivo získávané z extrakcí z rostlinného materiálu (např. z mrkve) nebo synteticky z β -iononu. V kosmetice je využíván jako ochrana proti slunečnímu záření a pro kolorování tukové fáze lotionů a emulzí. β -karoten je také předepisován k léčbě dědičného onemocnění kůže (erythropoetické protoporfyrie, jejímž důsledkem je přecitlivělost na sluneční záření) ke snížení závažnosti fotosenzitivní reakce pacientů trpících tímto onemocněním [9, s. 339][35, s. 125].

Vitamin E

Vitamin E je označení pro skupinu tokoferolů a tokotrienolů, což jsou deriváty chromanu s postranním lipofilním řetězcem. Vyskytují se ve všech částech pokožky, kde hrají důležitou roli při ochraně biomolekul před oxidačním stresem. Nejúčinnější biologicky aktivní formou je α -tokoferol. Je nejčastěji používaným přírodním antioxidantem v topických přípravcích a jeho účinnost se zvyšuje při použití v kombinaci s askorbylpalmitátem [12, s. 1073,1076][39, s. 301].

Mezi příznivé účinky vitaminu E na kůži patří zvýšení hydratace, jemnosti a hladkosti pokožky. Dále byly také zjištěny jeho protizánětlivé, antikancerogenní a fotoprotektivní účinky (bylo prokázáno, že lokálně aplikovaný α -tokoferol tlumí otok a zarudnutí vyvolané

UVB zářením). Vzhledem k tomu, že je α -tokoferol náchylný k působení tepla, světla i kyslíku, jsou v kosmetice využívány především jeho stabilnější formy – vitamin E acetát a vitamin E linoleát [12, s. 1075][39, s. 302 – 303].

Vitamin C

Aktivní forma vitamínu C je kyselina L-askorbová, která je jedním z nejdůležitějších ve vodě rozpustných antioxidantů. Vitamin C stimuluje syntézu kolagenu v dermálních fibroblastech a je také nezbytný při tvorbě příslušných bariérových lipidů v epidermis. Tento vitamin je navíc nezbytný pro hojení ran, nicméně použití orální i topické suplementace ke zlepšení hojení ran je sporné. Ochrannými účinky topicky aplikovaného vitamínu C se zabývalo mnoho studií (na zvířatech, buněčných kulturách a lidech) a bylo prokázáno např. snížení minimální erytérové dávky a méně pozorovatelné zčervenání po expozici UVB. Ovšem ověření výhod použití vit. C v topických přípravcích je dále zkoumáno. Vzhledem k tomu, že samotný vitamin C není stejně jako vit. E příliš stabilní, jeho použití v topických přípravcích může být řešeno např. esterifikací kyseliny askorbové fosfátem [12, s. 1072 – 1073][39, s. 303 – 304].

3.2.6 Rostlinné silice

Silice jsou organické látky rostlinného původu, označované také často jako éterické nebo esenciální oleje. Z chemického hlediska jde o směsi těkavých uhlovodíků a kyslíkatých organických látek, obsahují také látky glykosidického charakteru, hořčiny, třísloviny aj. Rostlinné silice nacházejí uplatnění v profesionální i domácí kosmetice, parfumerii, v masážní praxi, ve fyzioterapii, farmacii a dermatologii (jako podpůrné prostředky léčby či součásti léku). V kosmetice jsou využívány především účinky silic osvěžující, prokrvující, uklidňující, adstringentní a dezinfekční (mykostatické a bakteriostatické). Silice jsou však látky vysoce koncentrované a pro použití v KP musí být několikanásobně ředěny, jinak by mohlo dojít k vážnému poškození kůže a sliznic [1, s. 197].

Při přípravě gelového balzámu na vlasy v praktické části byla použita tymiánová silice, která patří mezi silice s bakteriostatickým a mykostatickým účinkem a mimo to má také prokrvující vlastnosti. Je získávána z tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) a její hlavní složkou je thymol (36 – 55 %), který je známý právě díky svým antibakteriálním, antimykotickým a antiparazitárním vlastnostem. Mezi další obsažené účinné látky této silice patří cymen, terpinen, linalool, karvakrol, myrcen aj. [1, s. 201][9, s. 306, 389].

4 STABILITNÍ STUDIE

Podle platné legislativy, musí být před uvedením kosmetického přípravku na trh provedeno posouzení jeho bezpečnosti a vypracována Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku. Tato zpráva musí mimo jiné obsahovat také údaje o fyzikálních/chemických vlastnostech, stabilitě a mikrobiologické kvalitě kosmetického přípravku (výsledcích zátěžového testu konzervace). Stabilitou přípravku se pak rozumí stabilita za rozumně předvídatelných podmínek skladování [36].

Účelem testování stability kosmetických přípravků je zajistit, aby nový nebo nově upravený výrobek splňoval při vhodném skladování požadavky fyzikální, chemické a mikrobiologické kvality, stejně jako jeho funkčnost a estetické vlastnosti [41].

Stabilitní studie prováděné jak v reálném čase nebo za podmínek zrychlené zkoušky by měly být prováděny tak, aby byla zajištěna stabilita a fyzická integrita kosmetických přípravků za vhodných podmínek skladování, přepravy a používání, dále pak chemická a mikrobiologická stabilita, funkčnost KP a v neposlední řadě také jeho kompatibilita s obalovým materiálem [41].

Požadavky na fyzikální stabilitu kosmetických prostředků, nejsou tak přísné jako ty, pro chemickou stabilitu. Malé změny viskozity nebo vzhledu jsou pro spotřebitele většinou přijatelné, ovšem více drastické změny, kdy dochází k různým typům rozpadu emulze, jsou již neúnosné. Z chemického hlediska jsou nepřijatelné všechny interakce mezi složkami, které vedou ke vzniku nových chemických látek nebo produktům rozkladu. Obzvláště důležité je testování stability přípravků, které obsahují aktivní nebo léčivé složky, které jsou doprovázeny tvrzeními o jejich účincích [9, str. 9].

Vzhledem k široké škále KP a jejich komplexnímu složení, nejsou ani nemohou být "standardní" testy stability pro všechny druhy KP předepsány. Výrobci, kteří mají dokonalou znalost svých výrobků a obalů, vyžadují flexibilitu v rámci změny zkušebních protokolů a posuzování stability produktů. Existují však různá doporučení, která pomáhají výrobcům kosmetiky při výběru a zdokonalování příslušných stabilitních testů. Jedním z nich je např. příručka k testování stability kosmetických prostředků (Guidelines on stability testing of cosmetic products) [41], kterou vypracovala asociace s dřívějším názvem Colipa (nyní již Cosmetics Europe – The Personal Care Association) ve spolupráci s CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association).

4.1 Náležitosti stabilitní studie

Stabilitní studie by měla zahrnovat především volbu testů, které slouží k urychlení a předpovědi účinků při normálních podmínkách skladování a používání (zrychlené zátěžové testy), dále vyhodnocení kritických estetických vlastností jako je barva, vůně, textura aj., zvláště po vystavení podmínkám zátěže, změny v provozních podmínkách a v neposlední řadě také vliv obalového materiálu na výrobek, stejně jako všechny účinky, které by mohl mít výrobek na obal [41].

4.1.1 Zrychlené a zátěžové testy

Zrychlené testy byly vyvinuty z důvodu relativně krátkého vývojového cyklu KP a slouží k předpovědi stability výrobku. Podmínky skladování jako je teplota a/nebo doba trvání by měly být zvoleny podle typu produktů a měly by být založeny na spolehlivém vědeckém úsudku. K samotné předpovědi stability potom slouží data získaná pomocí různých technik, při různých teplotách a době působení, ve spojení např. s použitím matematických modelů. Zkoušky se často provádí při teplotě 37 °C, 40 °C nebo 45 °C po dobu 1, 2, 3 až několik měsíců [41].

Konkrétně v případě léčivých přípravků jsou podmínky skladování u střednědobých testů stanoveny na 30 °C/65% RH po dobu 6 měsíců (tj. tak, aby mírně zvyšovaly rychlost chemické degradace a fyzikálních změn přípravku, který se má skladovat dlouhodobě při teplotě 25 °C), u zrychlených testů pak při 40 °C/75% RH také po dobu 6 měsíců [42].

Zátěžové testy mají za cíl vyhodnotit vliv ztížených podmínek na daný přípravek. Tyto studie zahrnují testování pomocí cyklujících teplot a/nebo teplotních extrémů, mechanické šokové zkoušky či fotostability. Tyto testy jsou více specifické vzhledem ke konkrétním typům prostředků. Mechanické zkoušky šoku se provádí za účelem zjištění, zda vlivem manipulace či přepravy (např. lodních pohybů) může dojít k poškození výrobku. Testy fotostability se potom provádí u výrobků, jejichž obal umožňuje vystavení obsahu KP světlu [41].

4.1.2 Testování změn vlastností KP

Při návrhu zkušebního protokolu stability je důležité mít na paměti, že s prodlužující dobou přípravku od jeho výroby se mohou měnit jeho vlastnosti. Proto by testování stability mělo zahrnovat právě testování vlastností, ke kterým může v průběhu skladování KP docházet.

Požadavky pro testování konkrétních vlastností závisí především na kategorii výrobků, druhu balení, atd. V úvahu mohou připadat například:

- barva, vůně a vzhled
- hodnota pH
- viskozita
- změny hmotnosti
- mikrobiální testy prokazující schopnost výrobků zamezit růstu mikroorganismů při běžném používání nebo v případě nutnosti další specifické testy
- analytické údaje týkající se dalších parametrů pro konkrétní typy výrobků
- aj. [41]

4.1.2.1 Hodnota pH

Hodnota pH je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů. Zjednodušeně řečeno nás tato hodnota informuje o tom, jestli je zkoumaná látka kyselá, neutrální nebo zásaditá. Za chemicky neutrální jsou považovány látky s pH 7, kyselé látky mají potom $\text{pH} < 7$ a zásadité (alkalické) látky naopak $\text{pH} > 7$.

Z kosmetického hlediska je jako neutrální pH považována hodnota v oblasti $\text{pH} 5.0 - 6.0$, protože průměrné pH pokožky (díky slabě kyselé reakci, kterou vykazuje její ochranný film) se pohybuje přibližně v tomto rozmezí [1, s. 118].

Vzhledem k tomu, že stabilita či účinnost některých látek je na hodnotě pH v různé míře závislá, hraje určitou roli i při výrobě KP. Pro spotřebitele má potom pH význam informativní, protože dojde-li ke změně hodnoty pH kosmetického přípravku nedeklarované výrobcem, je pravděpodobné že došlo ke změně jeho složení a tento přípravek je dále nepoužitelný [1, s. 118].

Momentální hodnoty pH se zjišťují v praxi dvěma způsoby. Buď přesně za pomoci elektronického přístroje zvaného pH-metr nebo orientačně pomocí indikátorových papírků s přesností $\pm 0,5 \text{ pH}$ [1, s. 118].

4.1.2.2 Viskozita

Viskozita je výsledkem působení přitažlivých (kohezních) sil v kapalině, jejichž vlivem kladou molekuly kapaliny odpor proti přemísťování. Je to fyzikální veličina charakterizující vnitřní tření při posunu dvou vzájemně rovnoběžných vrstev kapaliny o různé rychlosti pohybu, kdy pomalejší vrstva brzdí vrstvu rychlejší [1, s. 121]

Dynamická viskozita η [Pa.s] je jednou z důležitých reologických veličin a charakterizuje odpor dané látky proti toku. Hodnota dynamické viskozity je podílem smykového napětí τ [Pa] a rychlosti smykové deformace g [s^{-1}]. Donesedávna byla pro dynamickou viskozitu používána jednotka [P] „poise“, pojmenovaná po známém fyzikovi Jean-Marie Poiseuilleovi (1P = 100 cP, 1cP = 1 mPa.s) [43, s. 6 – 7].

Kinematická viskozita ν [$m^2.s^{-1}$] je potom definována jako podíl dynamické viskozity η a hustoty ρ [$kg.m^{-3}$]. Její donedávna používanou jednotkou byl [St] „stokes“, po fyzikovi Georgie G. Stokesovi (1St = 100 cSt, kde dále 1 cSt = 1 $mm^2.s^{-1}$) [43, s. 7].

Z kosmetického hlediska je měření viskozity dnes už nepostradatelné nejen pro kontrolu surovin, meziproduktů i finálních výrobků, ale také pro sledování a řízení výrobního procesu a vývoje nových zpracovatelských procesů [43, s. 95].

Zařízení, která se běžně používají k měření viskozity, se nazývají viskozimetry. Pro potřeby vývoje a výzkumu i různých průmyslových odvětví bylo vyvinuto několik typů viskozimetrů, které mohou být na základě principu měření rozděleny na:

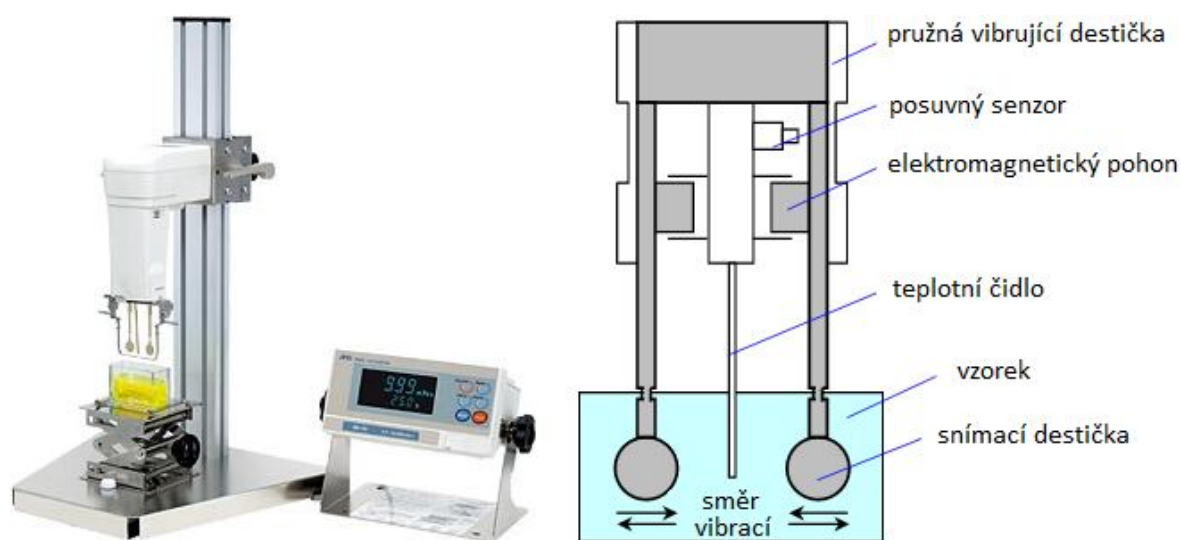
- **Vibrační viskozimetry:** Principem stanovení viskozity je řízení amplitudy snímacích destiček ponořených do vzorku a měření velikosti elektrického proudu pro jejich pohon (viz dále).
- **Rotační viskozimetry:** Viskozita je stanovována měřením kroutícího momentu rotorů o různých rozměrech a tvarech (válec, kužel či deska) ponořených ve vzorku.
- **Kapilární viskozimetry:** Principem stanovení viskozity je měření doby průtoku měřené kapaliny o určitém objemu mezi dvěma ryskami.
- **Kuličkové viskozimetry:** Principem stanovení viskozity je určení času pádu kuličky, která je vhozena do měřené kapaliny, během určité vzdálenosti.
- **Výtokové pohárky:** Viskozita je stanovována měřením doby, za kterou vyteče celý objem pohárku danou kapilárou umístěnou na jeho dně [43, s. 24 – 32][44].

Pro měření hydrogelových přípravků nacházejí uplatnění především první dvě skupiny viskozimetrů. V praktické části práci byl pak využíván ke stanovení viskozity vibrační viskozimetr SV-10, který bude proto dále stručně popsán.

Vibrační viskozimetr SV-10 je zobrazen spolu se schématem jeho detekčního systému na *Obr. 4*. Obsahuje dvě tenké snímací destičky, které jsou poháněny pomocí

elektromagnetické síly na stejné frekvenci vibrací (30 Hz). Elektromagnetický pohon ovládá pohyby snímacích destiček pro udržení konstantní amplitudy. Řízení elektrického proudu, který je hnací silou, detekuje velikost třecích sil mezi snímačem destiček a vzorkem kapaliny. Dynamická viskozita se získá korelací mezi hnacím elektrickým proudem a velikostí třecích sil [44].

Tento přístroj je určen pro citlivé měření dynamické viskozity v širokém rozsahu, konkrétně pro typ SV-10 je rozmezí měřitelných viskozit 0,3 – 10 000 mPa.s.



Obr. 4. Vibrační viskozimetr SV-10 (vpravo: detekční systém) [44]

4.2 Stabilitní studie hydrogelů

Stabilitní studie hydrogelových výrobků byla prováděna např. s laboratorně připravenou antioxidační gelovou maskou [45]. Složení připravené masky zahrnovalo kromě karbomeru a neutralizačních látek triethanolaminu a hydroxidu sodného, také salicylan sodný, glycerin a vitamin E acetát. Tato studie byla prováděna za účelem stanovení fyzikálně-chemických, mikrobiologických a estetických vlastností. Součástí studie bylo provedení dlouhodobého i zátěžového testu. U výrobku byly také hodnoceny účinky IR a UV záření na obsah salicylanu sodného. Během studie bylo zjištěno, že salicylan sodný má na stabilitu gelu významný vliv.

Sledování vlivu dalších biologicky aktivních látek na vyrobené gely na bázi kopolymerů kyselin akrylové pro aplikace v kosmetologii, popř. farmacii, bylo prováděno ve studii zabývající se využitím fermentačních produktů syrovátky jako modifikátoru hydrofilních

polymerních matric pro kosmetické aplikace [46]. Cílem této práce bylo sledování vlivu modifikace polymerního gelu bioaktivními látkami s původem ve fermentačních produktech syrovátky (tj. nisinu a kyseliny mléčné), na fyzikálně-chemické a antibakteriální vlastnosti výsledného systému. Jedním z výsledků této studie bylo, že zkoumané látky způsobují snížení viskozity hydrogelů na bázi karbomerů při jejich výrobě, ale v průběhu skladování již k dalšímu markantnímu poklesu viskozity nedochází. Také bylo zjištěno, že nisin se jeví jako nedostačující antibakteriální látka proti gramnegativním bakteriím, a proto je pro zajištění antimikrobiální čistoty vhodná jeho kombinace s jinou konzervační látkou.

Studii hydrogelů s obsahem syrovátkových bílkovin se zabývala Kolářová-Rašková a kol. ve stabilitních studiích [47] a [48]. V těchto studiích byl sledován vliv koncentrací účinných látek hydrogelu na vlastnosti polymerních matric gelů na bázi kopolymerů kyseliny akrylové (karbomerů). Byly sledovány vlivy skladovacích podmínek na pH, viskozitu, barvu, vůni, morfologii a mikrobiologickou stabilitu výrobků. Testována byla dlouhodobá stabilita výrobků a také provedeny jejich zátěžové testy (gely byly podrobeny zvýšené teplotě, cyklování teplot i expozici světlem). Mimo jiné bylo na základě těchto studií zjištěno, že ke změnám viskozity a pH dochází především během prvních dvou měsíců skladování výrobků a u zrychlených zátěžových testů pak během 5 – 10 cyklů. Výsledky také ukázaly, že glycerin je vhodný jako přídatné rozpouštědlo (mimo vodu), díky tomu že podporuje bobtnání a viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů.

Na tyto studie navazuje praktická část diplomové práce.

5 CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- charakterizovat hydrogely a syrovátkové bílkoviny, se zaměřením na jejich využití v biomedicínských aplikacích a kosmetice
- popsat složky kosmetických prostředků a náležitosti stabilitní studie
- vyrobit gelový balzám na vlasy s obsahem syrovátkových bílkovin jako aktivní složky
 - o s co nejvyšším obsahem vitaminů (především řady B)
 - o s vhodným množstvím syrovátkových proteinů a dalších aktivních látek
 - o pokusit se nalézt vhodný konzervační systém
 - o provést stabilitní studii výrobku

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ

6.1 Použité chemikálie

K přípravě hydrogelů:

- Polygel CA – Carbomer (Carboxyvinyl polymer) (3V Sigma s.p.a.)
- Stabylen 30 – Acrylates/Vinyl Isodecanoate Crosspolymer (Acrylic acid/Vinyl ester copolymer) (3V Sigma s.p.a.)
- Salicylan sodný p.a. – Sodium salicylate (Chiromed group s.r.o.)
- Glycerol bezvodý p.a. – Glycerin (Ing. Petr Lukeš)
- Hydroxid sodný p.a. – Sodium hydroxide (Ing. Petr Lukeš)
- Ichthammolum, Ph. Eur. 6.3 – Ichthammol (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
- Hyaluronan sodný – Sodium hyaluronate (CPN spol. s r.o.)
- D-Pantenol 75% – D-Panthenol (M + H, Míča a Harašta s.r.o.)
- Oxid zinečnatý p.a. – Zinc oxide (Ing. Petr Lukeš)
- Kyselina L-askorbová p.a. – Ascorbic acid – Vitamín C (Ing. Petr Lukeš)
- Vitamin E Acetate 50% – Tocopheryl acetate (Biomedica s.r.o.)
- Vitamin B₁ – Thiamine (Biomedica s.r.o.)
- Vitamin B₆ – Pyridoxine (Biomedica s.r.o.)
- Betakaroten 10% – Betacarotene (Biomedica s.r.o.)
- Ethanol 96 % jemně denaturovaný lékařským benzinem (Lihovar Kojetín a.s.)
- Imidazolidinyl urea (M + H, Míča a Harašta s.r.o.)
- Sorban draselný – Potassium sorbate (Lach-Ner s.r.o.)
- Methylparaben (M + H, Míča a Harašta s.r.o.)
- Tymiánová silice (Biomedica s.r.o.)
- Nisin – from *Lactococcus lactis*, 2,5% prášek, zbytek NaCl a směs syrovátkových proteinů (Sigma Aldrich)
- Nisin – ve směsi se syrovátkovými proteiny (vyroben ve Výzkumném ústavu mlékárenském (VÚM) v Praze)
- WPC (syrovátkový koncentrát) – laboratorně připraven ze syrovátky vyrobené v laboratoři UTB z mléka od dodavatele, jež si nepřál být uveden

- WPI (syrovátkový izolát) – laboratorně připraven ze syrovátky vyrobené v laboratoři UTB z mléka od dodavatele, jež si nepřál být uveden
- WPI (syrovátkový izolát) – laboratorně připraven ze syrovátky z VÚM v Praze – uchováván v PBS pufru

Na mikrobiologické zkoušky:

- Soyabean Casein Digest Agar – agar s hydrolyzáty sóji a kaseinu (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.)
- Sabouraud Dextrose Maltose Agar – Sabouraudův agar s dextrózou a maltózou (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.)
- Mueller Hinton agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.)
- Chlorid sodný p.a. – Sodium chloride (Ing. Petr Lukeš)
- Tween 80 – Polysorbate 80 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.)
- Lecitin natural – sojový granulovaný lecitin (Mogador s.r.o.)

6.2 Použité přístroje

- Předvážky – SPB52 (Scaltec)
- Analytické váhy – SI-234A (Denver Instrument)
- Vpichový pH metr – pH Spear for food testing (Eutech Instruments)
- Digitální pH metr – GPH 014 GL (Greisinger)
- Vibrační viskozimetr – Vibro viscometer SV-10 (A&D Company)
- Rotační viskozimetr – Myr V2-L (Maneco)
- Climacell – klimatizovaný box s kontrolovanou vlhkostí (BMT, MMM-Group)
- Minitřepačka – MS1 Minishaker (IKA)
- Flow box – laminární box Hera safe (Thermo scientific)
- Inkubátor INE 400 – Memmert 531

6.3 Použité pomůcky

- Automatické mikropipety Finnpiette (Thermo scientific)
- Bürkerova počítací komůrka
- Ostatní pomůcky jsou běžnou součástí vybavení laboratoře

7 POSTUPY MĚŘENÍ

7.1 Příprava hydrogelů

Do odváženého množství destilované vody bylo přidáno potřebné množství glycerinu a salicylanu sodného (NaSal) a následně přidáno potřebné množství karbomerů. Takto připravený základ byl ponechán bobtnat po dobu 24 h při laboratorní teplotě v zakryté nádobě. Poté byl vzniklý hydrogel homogenizován a neutralizován pomocí 10% roztoku NaOH (na hodnotu pH přibližně 6,5 – 7,5) a znovu homogenizován. Po odstání vzorků bylo orientačně změřeno pH a poté postupně přidávány další ingredience. Jednotlivé vzorky hydrogelů byly připravovány v množství 100 g a konkrétní obsah přidávaných složek je uveden v *Tab. 7* a *Tab. 8*.

7.2 Příprava zásobních roztoků

Bylo naváženo množství chemikálie potřebné pro přípravu roztoku požadované koncentrace (vztaženo na g/100 ml) a rozpuštěno v kádince s malým množstvím destilované vody, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno na požadovaný objem.

Tímto způsobem byly připraveny roztoky:

- **10% roztok hydroxidu sodného**
- **1% roztok ichtamolu**
- **1% roztok vitaminů B₁ + B₆**
- **10% roztok imidazolidinyl urey**
- **10% roztok sorbanu draselného**

Příprava 1,5% roztoku oxidu zinečnatého v 10% kys. L-askorbové

Nejprve byl připraven roztok kyseliny L-askorbové (vitamínu C) navážením jeho potřebného množství pro výrobu 10% roztoku (vztaženo na g/100 ml). Poté bylo na předvážkách naváženo množství oxidu zinečnatého (ZnO) potřebné pro výrobu 1,5% roztoku (vztaženo na g/100 ml). Navážené množství bylo rozpuštěno v kádince s malým množstvím 10% vitamínu C, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno na požadovaný objem.

Příprava 1% roztoku hyaluronanu sodného

Bylo naváženo množství hyaluronanu sodného (NaHA) potřebné pro výrobu 1% roztoku (vztaženo na g/100 g). K naváženému množství NaHA bylo přidáno potřebné množství vody a glycerolu (v poměru 1 : 4). Poté byl roztok při teplotě asi 60 °C míchán do rozpuštění hyaluronanu. Tento zásobní roztok byl uchováván ve tmě a chladu.

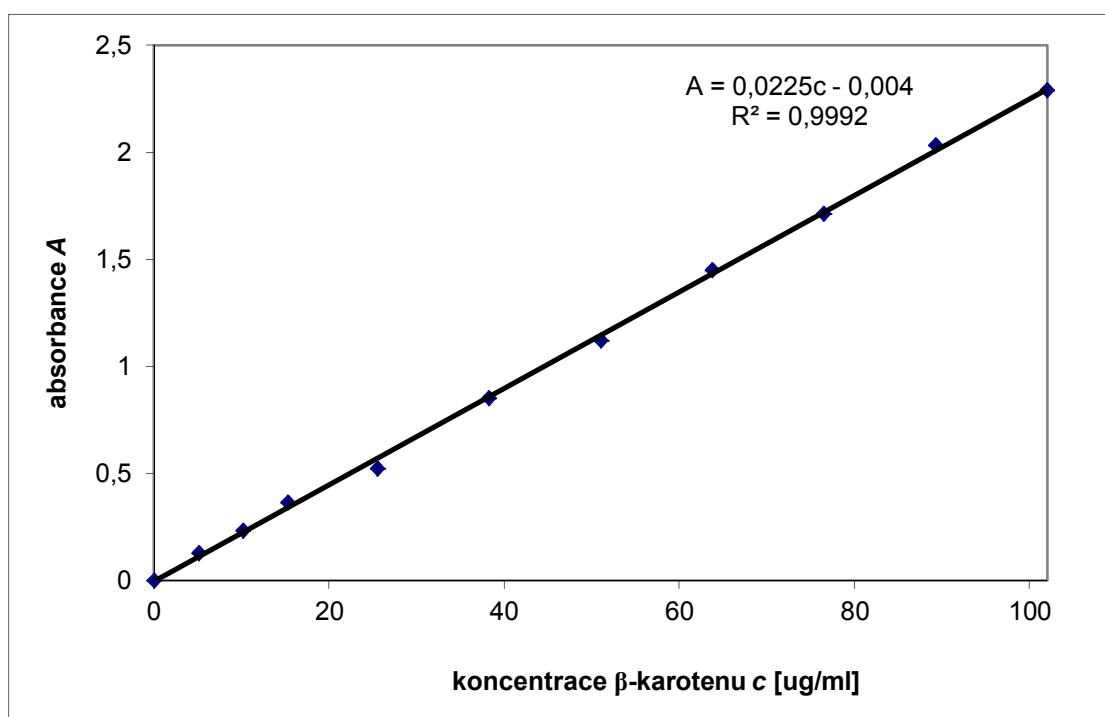
Příprava zásobních roztoků nisinu

Z komerčního nisinu i nisinu z VÚM byly připraveny zásobní roztoky nisinu v 0,01M-HCl o koncentraci přibližně $4,1 \cdot 10^{-4}$ g/ml.

Příprava beta-karotenového extraktu

Byl připraven 2% roztok rozdrceného β -karotenu v ethanolu, tak, že byla drť 2 dny extrahována. Po extrakci byl nerozpuštěný podíl β -karotenu zfiltrován a vypočtena skutečná koncentrace. Výsledná koncentrace extraktu β -karotenu byla 0,51 mg/ml.

Pro případné další potřeby byla sestavena kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci β -karotenu (viz Obr. 5). Pro její sestavení byly použity roztoky β -karotenu o koncentraci 5,1 – 510 μ g/ml připravené z vyrobeného β -karotenového extraktu, u kterých byly proměřovány absorbance při vlnové délce 450 nm proti etanolu.



Obr. 5. Kalibrační přímka β -karotenu

7.3 Stanovení viskozity a hodnoty pH

V průběhu výroby hydrogelů bylo orientačně měřeno pH a viskozita na rotačním viskozimetru Myr V2-L. Po přidání poslední suroviny, tedy dokončení výroby hydrogelu, bylo u vzorků změřeno konečné pH a viskozita pomocí vibračního viskozimetru SV-10.

Pro hodnocení dlouhodobé stability hydrogelů byly vzorky podrobeny zátěžovému „zrychlenému testu“, což je studie prováděná za extrémních skladovacích podmínek za účelem urychlení chemického rozkladu či fyzikální změny KP. Postup tohoto testu byl následující. Vyrobené vzorky byly uloženy do klimatizovaného boxu Climacell a vystaveny působení teploty 40 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu (po 12 hodinách) byly vzorky opět zahřívány a postup opakován. Celý proces, který dohromady tvořil jeden cyklus, tedy trval 36 hodin. Průběh i počet cyklů, jemuž byly vzorky podrobeny, byl nastaven pomocí programu. V průběhu studie byly u vzorků vždy po určitém počtu cyklů opět proměřovány hodnoty pH a viskozit pomocí vibračního viskozimetru SV-10.

Některé ze vzorků byly pro srovnání skladovány při laboratorní teplotě ve tmě. Hodnoty pH a viskozit těchto vzorků gelů byly proměřovány po určitých časových intervalech.

7.4 Hodnocení mikrobiologické stability

7.4.1 Zkouška účinnosti protimikrobních konzervačních látek

Zkušební postup této zkoušky vychází z požadavků Českého lékopisu (ČL) 2009 [49]. Tato zkouška nemusí být vykonána u KP, ale provádí se v rámci vývoje zdravotnického prostředku nebo při změně typu nebo koncentrace v něm obsažené konzervační látky.

Použité sterilní roztoky:

- pro bakterie a kvasinky: sterilní fyziologický roztok – vodný roztok NaCl (9 g/l)
- pro plíseň: sterilní fyziologický roztok s polysorbátem – vodný roztok NaCl (9 g/l) a polysorbátu 80 (0,5 g/l)
- neutralizátor – fyziologický roztok s polysorbátem 80 (30 g/l) a lecitinem (3 g/l)

Použité zkušební kmeny MO:

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517
- *Candida albicans* CCM 8215, *Aspergillus niger* CCM 8222

Použité živné půdy:

- pro bakterie – agarová půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu (TSA)
- pro kvasinky a plísň – Sabouraudův agar s dextrózou a maltózou (SA)

Postup:

Nejprve byla připravena inokula MO. Povrch živné půdy v Petriho misce byl naočkován čerstvými zásobními mikroorganismy. Takto naočkované kultury byly inkubovány následujícím způsobem: bakterie (18 – 24 h, při 30 – 35 °C), kultura *C. albicans* (48 h, při 20 – 25 °C) a kultura *A. niger* (při 20 – 25 °C po dobu 1 týdne nebo do dosažení dobré sporulace). Narostlé kultury byly přeneseny sterilní kličkou do zkumavky se sterilním roztokem (v případě *A. niger* sterilním roztokem NaCl a polysorbátu) a naředěny stejným roztokem tak, aby obsahovaly asi 10^8 mikroorganismů v 1 ml. Z takto připravených suspenzí byl ihned odebrán vzorek a stanoven počet jednotek tvořících kolonie v 1 ml (CFU/ml) suspenze (orientačně počítáním na Bürkerově počítací komůrce a přesně metodou počítání na pevných půdách).

Připravené inokulum (mikrobiální suspenze) bylo poté naočkováno do zkoušeného gelu, (tak aby v 1 g přípravku bylo 10^5 až 10^6 MO) a ten pečlivě promíchán, aby bylo dosaženo stejnoměrného rozptýlení inokula. Naočkované gely byly po celou dobu zkoušky skladovány při teplotě 20 – 25 °C a chráněny před světlem.

Z naočkovaného gelu byl dále odvážen 1 g do zkumavky s 9 ml neutralizátoru (kvůli odstranění zbytkové protimikrobní účinnosti) a na mikrotřepačce promícháván do vzniku homogenní suspenze bez shluků gelu. Ze získané suspenze pak bylo odpipetováno: a) 1 ml na sterilní Petriho misky (paralelně na 2) a zalit příslušným agarem (v případě bakterií a kvasinek); b) 0,2 ml na již připravené půdy v Petriho miskách (paralelně na 2) a rozetřeno sterilní hokejkou (v případě plísní). Z této suspenze byla dále připravena řada ředění do 10^{-6} a postup byl opakován.

Poté byly takto připravené agary inkubovány stejným způsobem jako při přípravě inokula MO a po uplynutí příslušné doby byl stanoven počet životaschopných zárodků počítáním na pevných půdách. Tento postup s naočkovaným gelem byl opakován po 24 hodinách, 7, případně 14 dnech a bylo sledováno snížení počtu živých MO oproti hodnotám získaným u čerstvě naočkovaného gelu.

Požadavky na pokles počtu mikroorganismů v závislosti na čase jsou uvedeny v *Tab. 6*. Podle lékopisu [49], požadavky v řádku A vyjadřují doporučenou účinnost, které má být

dosaženo. V oprávněných případech, kdy tyto požadavky nemohou být splněny, např. pro zvýšené riziko nežádoucích účinků, musí se uplatnit požadavky uvedené v řádku B.

Tab. 6. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti – Topické přípravky [49]

		Logaritmické snížení počtu zárodků			
		24 h	7 d	14 d	28 d
Bakterie	A	2	3	-	NI*
	B	-	-	3	NI
Houby	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

*NI = bez zvýšení počtu

7.4.2 Difuzní agarový test

Tato metoda slouží k testování antimikrobní aktivity účinné složky. V podstatě se jedná o stanovení citlivosti kmene ke zkoumané látce (prostřednictvím měření průměru inhibičních zón), a tedy zhodnocení jestli má výrobek antibakteriální vlastnosti.

Použité zkušební kmeny MO:

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516
- *Candida albicans* CCM 8215

Použité živná půdy:

- Mueller Hinton agar (MH)

Postup:

Na MH agar byla sterilním vatovým tampónem nanášena bakteriální suspenze. Po jejím zaschnutí byl do agaru vykrojen otvor o průměru 10 mm, do kterého byl poté nadávkován 1 g vzorku gelu (paralelně na 2 misky). Takto naočkované agary byly poté inkubovány při 35 °C, 24 – 72 hodin dnem dolů (po každém dnu byl sledován případný výskyt zón).

7.5 Hodnocení klientského komfortu

Součástí stabilitní studie bylo vizuální hodnocení celkového vzhledu, barvy, vůně, případně komfortu aplikace v závislosti na viskozitě vzorku (tzn. aby jeho viskozita nebyla příliš vysoká ani nízká, ale v rozmezí, kdy je jeho aplikace pohodlná pro potenciálního uživatele).

7.6 Rámcové složení hydrogelů

Rámcové složení vyráběných vzorků gelů je uvedeno v *Tab. 7*. Kromě surovin uvedených v této tabulce, byly přidávány ke vzorkům ještě další konzervační látky, konkrétně methylparaben (MPB), imidazolidinyl urea (IU), sorban draselný (SD), nisin a tymiánová silice. Množství těchto přidávaných antimikrobních látek je uvedeno v *Tab. 8*.

Tab. 7. Složení gelů typu A, B a C (vztaženo na 100 g hydrogelu)

Ingredience	Gel A [% hm.]	Gel B [% hm.]	Gel C [% hm.]
Polygel CA	0,3	0,5	-
Stabylen 30	0,35	0,3	0,6 – 0,9
Glycerin	2	2	2
Salicylan sodný	0,2 – 0,5	0,2 – 0,5	0,2 – 0,3
10% NaOH	2,5	2,5	2,5
1% Ichtamol	2,5	2,5	2,5
1% Hyaluronan sodný	1	1	1
D-panthenol	3	3	3
Vit. E acetát	0,2	0,2	0,2
1% Vit. B ₁ + B ₆	5 – 10	5 – 10	5
1,5% ZnO v 10% Vit. C	0,5 – 3	0,5 – 3	1
Beta-karoten (extrakt)	-	-	1
WPC/WPI (lyofilizovaný)	0,5 – 1	0,5 – 1	0,5 – 1

Tab. 8. Další používané látky s antimikrobními vlastnostmi

Antimikrobní látka	Množství [% hm.]
Methylparaben	0,1
10% Imidazolidinyl urea	5
10% Sorban draselný	5
Nisin ($4,1 \cdot 10^{-4}$ g/ml)	2
Tymiánová silice	0,02 – 0,06

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Stanovení viskozity a pH

Nejprve byl zkoumán vliv vitaminů B₁, B₆, C a ZnO na gelovou matici. Různé kombinace těchto složek byly zkoušeny u všech typů gelů a jejich složení je uvedeno v *Tab. 9*. Hodnoty viskozit v průběhu zátěžového testu jsou uvedeny v *Tab. 10*, *Tab. 11*, *Tab. 12* a *Tab. 13*. Souhrnně jsou pak tyto výsledky uvedeny na *Obr. 6*.

Tab. 9. Složení 1. série gelů – gely s různým obsahem vit. B₁, B₆, C a ZnO

Ingredience	Gel A [% hm.]	Gel B [% hm.]	Gel C [% hm.]
Polygel CA	0,3	0,5	-
Stabylen 30	0,35	0,3	0,8
Glycerin	2	2	2
Salicylan sodný	0,2	0,2	0,2
10% NaOH	2,5	2,5	2,5
1% Ichtamol	2,5	2,5	2,5
1% Hyaluronan sodný	1	1	1
D-panthenol	3	3	3
Vit. E acetát	0,2	0,2	0,2
Vit. B ₁ + B ₆	0,05 – 0,1	0,05 – 0,1	0,05 – 0,1
Vit. C	0 – 0,5	0 – 0,5	0 – 0,5
ZnO	0 – 0,1	0 – 0,1	0 – 0,1

Tab. 10. Hodnoty viskozit gelů typu A s různým obsahem vit. B₁ a B₆

Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]	
	0,05 % vit. B ₁ +B ₆	0,1 % vit. B ₁ +B ₆
0	411,0	239,0
5	65,2	69,6
23	25,0	67,0
45	10,0	34,0

Tab. 11. Hodnoty viskozit gelů typu A s různým obsahem vit. B₁, B₆, C a ZnO

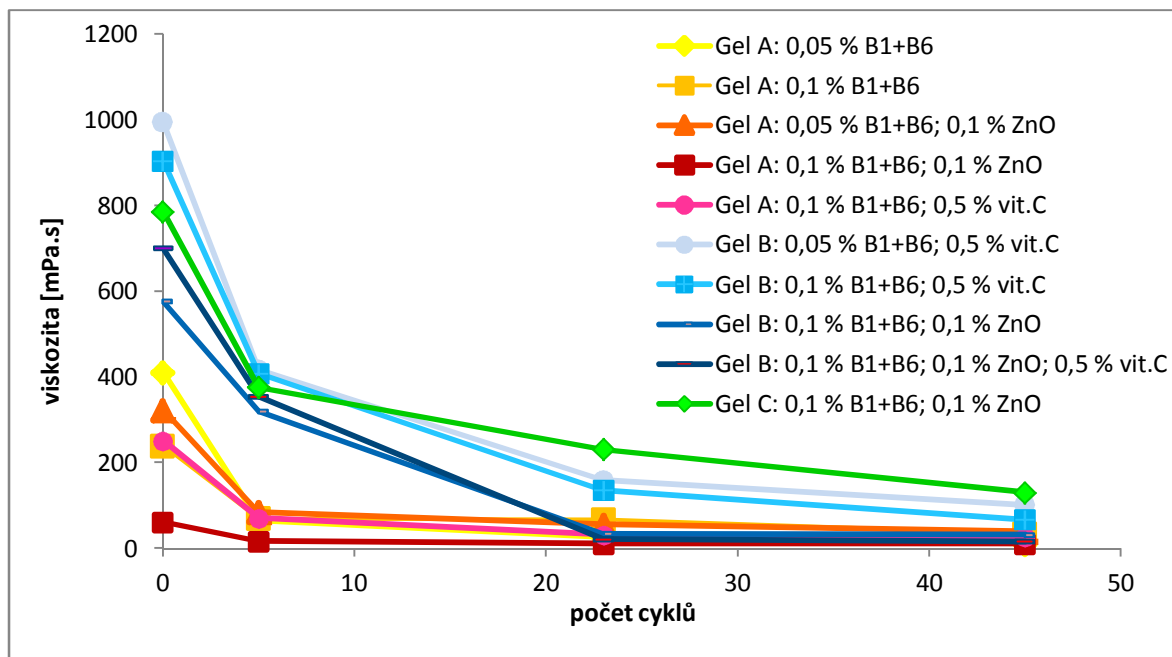
Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]		
	0,05 % vit. B ₁ + B ₆ 0,1 % ZnO	0,1 % vit. B ₁ + B ₆ 0,1 % ZnO	0,1% vit. B ₁ + B ₆ 0,5% vit. C
0	323,0	61,0	251,0
5	84,0	16,1	70,1
23	55,0	10,0	31,0
45	38,9	10,0	26,0

Tab. 12. Hodnoty viskozit gelů typu B s různým obsahem vit. B₁, B₆, C a ZnO

Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]			
	0,05 % vit. B ₁ +B ₆ 0,5 % vit. C	0,1 % vit. B ₁ +B ₆ 0,5 % vit. C	0,1 % vit. B ₁ +B ₆ 0,1 % ZnO	0,1 % vit. B ₁ +B ₆ 0,1 % ZnO 0,5 % vit. C
0	995,0	904,0	576,0	700,0
5	417,0	408,0	320,0	354,0
23	158,0	135,0	33,5	21,0
45	101,0	66,3	31,0	15,3

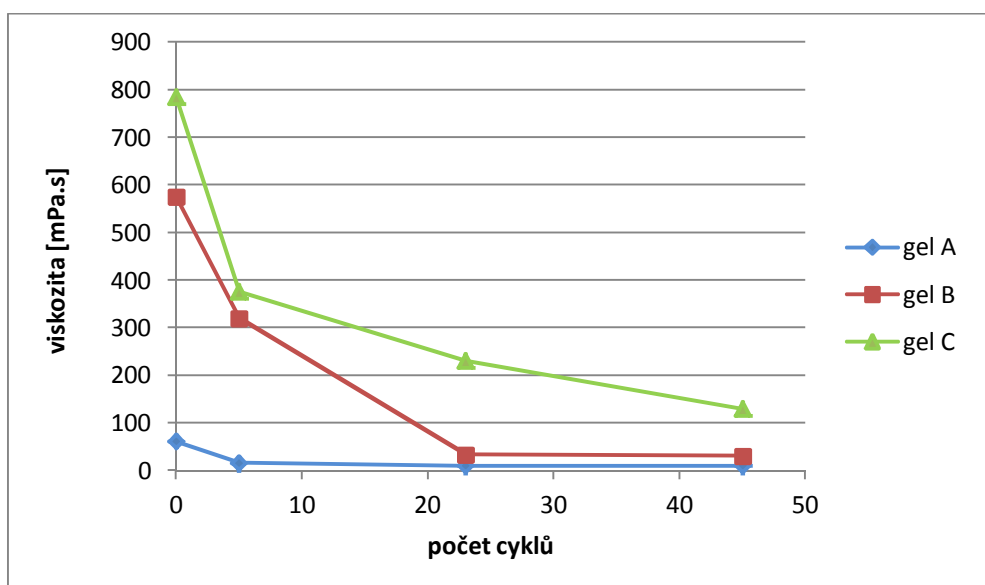
Tab. 13. Hodnoty viskozit gelu typu C s různým obsahem vit. B₁, B₆, C a ZnO

Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]
	0,1 % vit. B ₁ +B ₆ ; 0,1 % ZnO
0	786
5	376
23	231
45	130



Obr. 6. Průběh zátěžového testu – gely s různým obsahem vitaminů B₁, B₆, C a ZnO

Z Obr. 6 je zřejmé, že obsah vitaminů B₁, B₆, C a ZnO má na gelovou matici výrazně destabilizační vliv. Všechny připravené gely typu A a většina gelů typu B se rozpadla. V zátěžovém testu dopadl nejlépe gel typu C a poměrně obstojně také dva gely typu B, u kterých byly naměřeny nejvyšší počáteční hodnoty viskozit. Z Obr. 6 je také patrná rozdílnost viskozit čerstvě připravených gelů typu A, B a C, která je dána zastoupením karbomerů v těchto hydrogelech. Na Obr. 7 jsou porovnány jednotlivé typy gelů se stejným obsahem vit. B₁ + B₆ a ZnO.



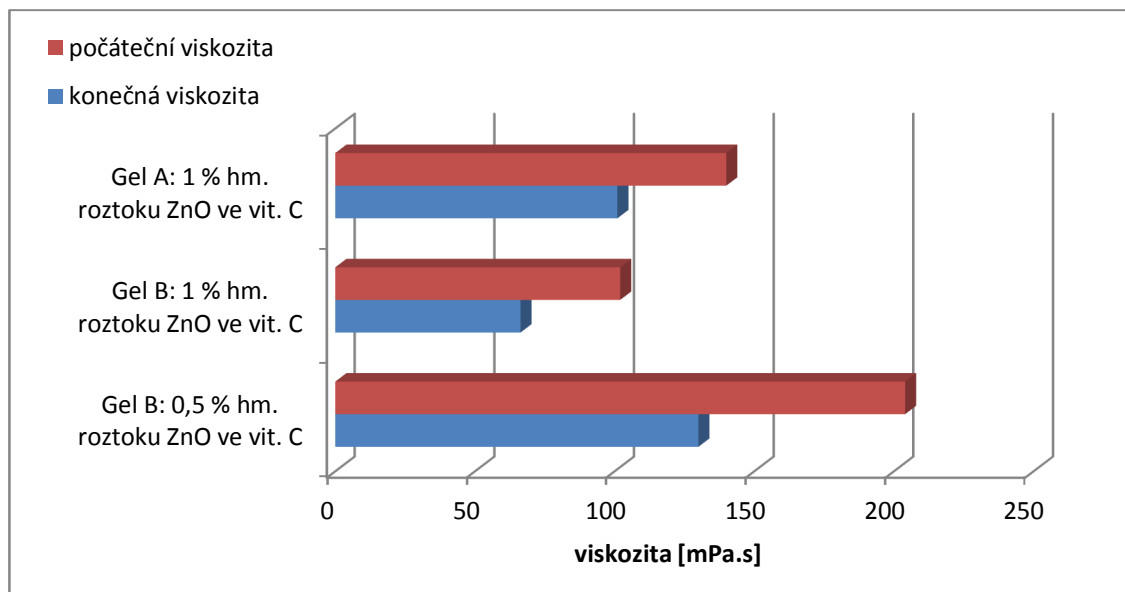
Obr. 7. Porovnání gelů A, B a C s 0,1 % vit. B₁ + B₆ a 0,1 % ZnO

Po této sérii vzorků byla připravena další (viz *Tab. 14*), kde byl na základě předchozích výsledků sjednocen obsah 1% roztoku vitaminů B₁+B₆ (na obsah 5 % hm.) a byla přidána další konzervační látka, konkrétně 10% roztok imidazolidinyl urey (v množství 5 % hm.). U těchto vzorků byl zkoumán vliv 1,5% ZnO v 10% vit. C v množství 0,5 – 3 % hm.

Tab. 14. Složení 2. série gelů – gely s různým obsahem 1,5% ZnO v 10% vit. C

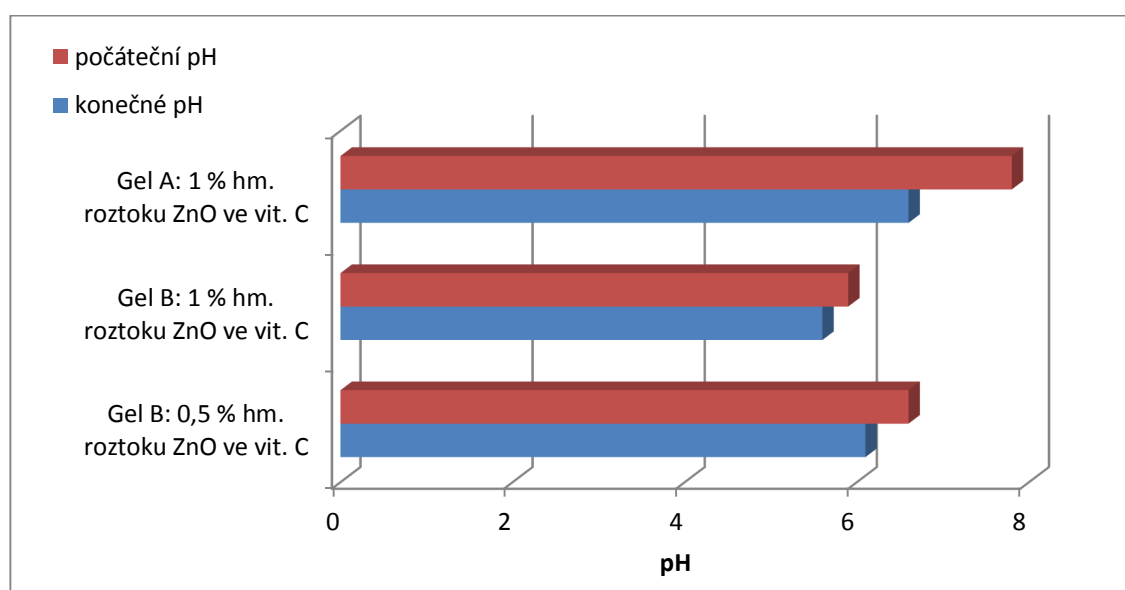
Ingredience	Gel A [% hm.]	Gel B [% hm.]
Polygel CA	0,3	0,5
Stabylen 30	0,35	0,3
Glycerin	2	2
Salicylan sodný	0,2	0,2
10% NaOH	2,5	2,5
1% Ichtamol	2,5	2,5
1% Hyaluronan sodný	1	1
D-panthenol	3	3
Vit. E acetát	0,2	0,2
1% Vit. B ₁ + B ₆	5	5
1,5% ZnO v 10% Vit. C	0,5 – 3	0,5 – 3
10% imidazolidinyl urea	5	5

Gely, ke kterým byl přidán roztok 1,5% ZnO v 10% vit. C v množství více než 1 % hm., se rozpadly již týden po přípravě (jejich viskozita byla nižší než 50 mPa.s, měřeno na vibračním viskozimetru). Tyto vzorky byly zhodnoceny jako nevyhovující a k dalším experimentům už použity nebyly. Zbýlé vzorky byly podrobeny zátěžovému testu a hodnoty viskozit a pH po 25 cyklech jsou uvedeny na *Obr. 8* a *Obr. 9*.



Obr. 8. Viskozity gelů s různým obs. 1,5% ZnO v 10% vit. C, před a po zátěžovém testu

Z Obr. 8 je patrné, že nejlépe dopadl gel typu B, ve kterém bylo použito nejnižší zkoumané množství 1,5% ZnO v 10% vit. C, které činilo 0,5 % hm. Zároveň však u tohoto gelu byla pozorována nejvyšší změna viskozity oproti počáteční hodnotě. Hodnoty pH těchto gelů (viz Obr. 9), se po provedení zátěžového testu oproti počátečním hodnotám příliš nezměnily (došlo k poklesu o cca 15 % z původní hodnoty, což lze u výrobku tohoto typu považovat za tolerovatelnou změnu).



Obr. 9. pH gelů s různým obs. 1,5% ZnO v 10% vit. C, před a po zátěžovém testu

Z dosavadních výsledků byl pro přípravy dalších vzorků gelů zvolen obsah 1% vit. B₁ + B₆ v množství 5 % hm. a 1,5% ZnO v 10% vit. C pak 1 % hm. (s přihlédnutím k požadavku, aby gelový balzám obsahoval co nejvíce vitaminů). Tyto gely již obsahovaly syrovátkový koncentrát (WPC), případně izolát (WPI) a mimo salicylanu sodného (NaSal), který byl obsažen ve všech vyráběných hydrogelech, také některou z dalších antimikrobních látek, či jejich kombinace.

Složení 3. série gelů, ve kterých byl použit WPC, je uvedeno v *Tab. 15*. K těmto gelům byly přidávány konzervační látky – methylparaben (MPB), imidazolidinyl urea (IU) a sorban draselný (SD). Přidávaná množství těchto použitých konzervačních látek jsou uvedena v *Tab. 8*.

Výsledky ovlivnění viskozit gelů použitými konzervanty během zátěžového testu jsou uvedeny v *Tab. 16* a *Tab. 17* a shrnuty na *Obr. 10* a *Obr. 11*.

Tab. 15. Složení 3. série gelů – gely s WPC a různým obsahem NaSal v kombinaci s dalšími antimikrobními látkami

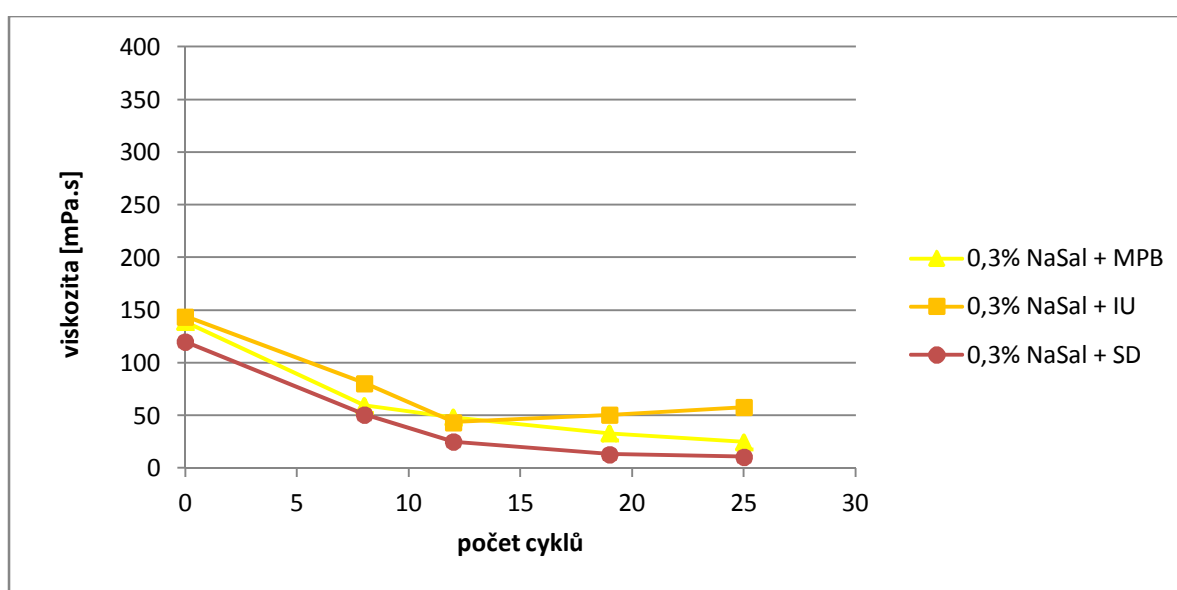
Ingredience	Gel A [% hm.]	Gel B [% hm.]
Polygel CA	0,3	0,5
Stabylen 30	0,35	0,3
Glycerin	2	2
Salicylan sodný	0,3 – 0,5	0,3 – 0,5
10% NaOH	2,5	2,5
1% Ichtamol	2,5	2,5
1% Hyaluronan sodný	1	1
D-panthenol	3	3
Vit. E acetát	0,2	0,2
1% Vit. B ₁ + B ₆	5	5
1,5% ZnO v 10% Vit. C	1	1
WPC	1	1

Tab. 16. Hodnoty viskozit gelů typu A s WPC a různým obsahem konzervačních látek

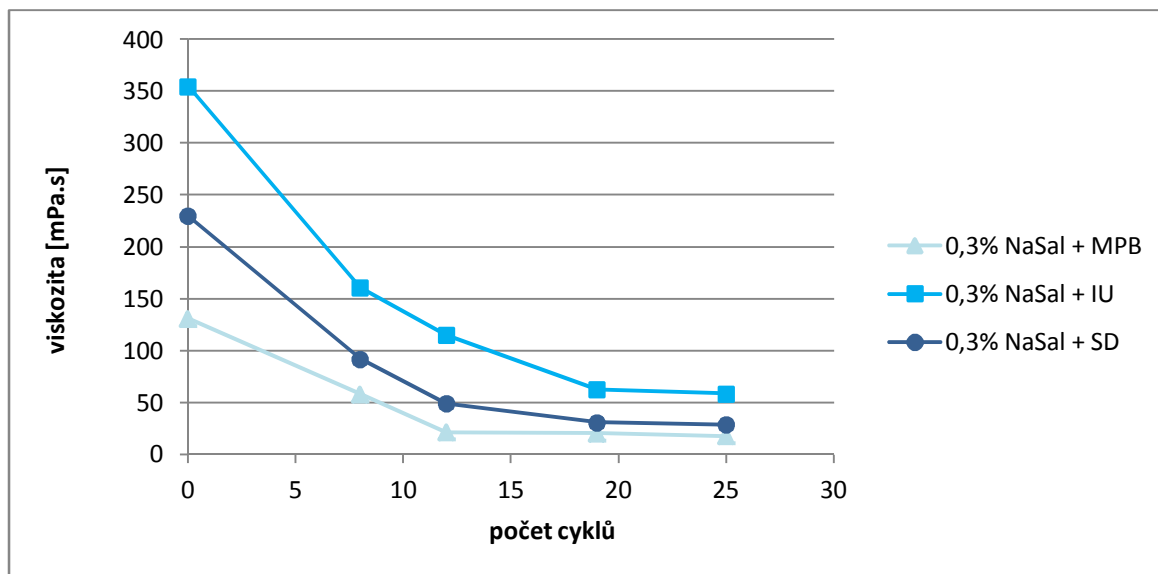
Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]				
	0,3 % NaSal MPB	0,4 % NaSal MPB	0,5 % NaSal MPB	0,3 % NaSal IU	0,3 % NaSal SD
0	139,0	122,0	117,0	144,0	120,0
8	59,5	74,6	65,1	81,0	51,1
12	48,5	54,2	31,2	43,8	25,4
19	33,3	30,2	19,6	50,9	13,4
25	25,0	21,0	19,0	58,0	11,0

Tab. 17. Hodnoty viskozit gelů typu B s WPC a různým obsahem konzervačních látek

Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]				
	0,3 % NaSal MPB	0,4 % NaSal MPB	0,5 % NaSal MPB	0,3 % NaSal IU	0,3 % NaSal SD
0	131,0	214,0	260,0	355,0	230,0
8	58,4	93,3	121,0	161,0	92,3
12	21,7	64,3	59,7	115,2	49,5
19	20,7	45,9	43,2	62,8	31,2
25	18,0	34,0	31,0	59,0	29,0



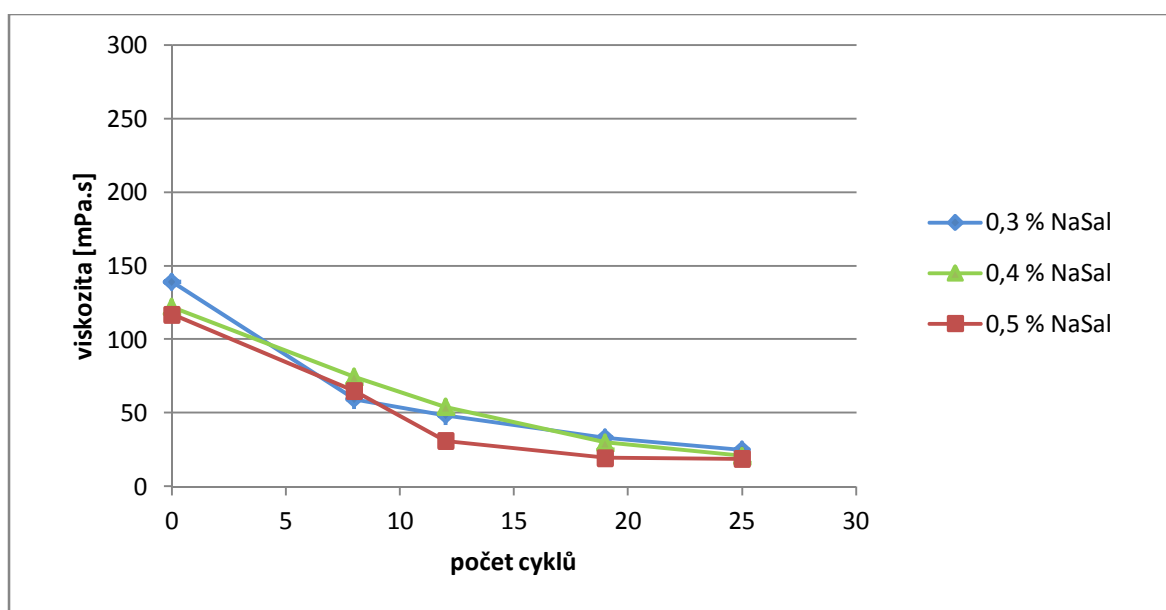
Obr. 10. Průběh zátěžového testu – gely A s různými typy konzervačních látek (viz Tab. 16)



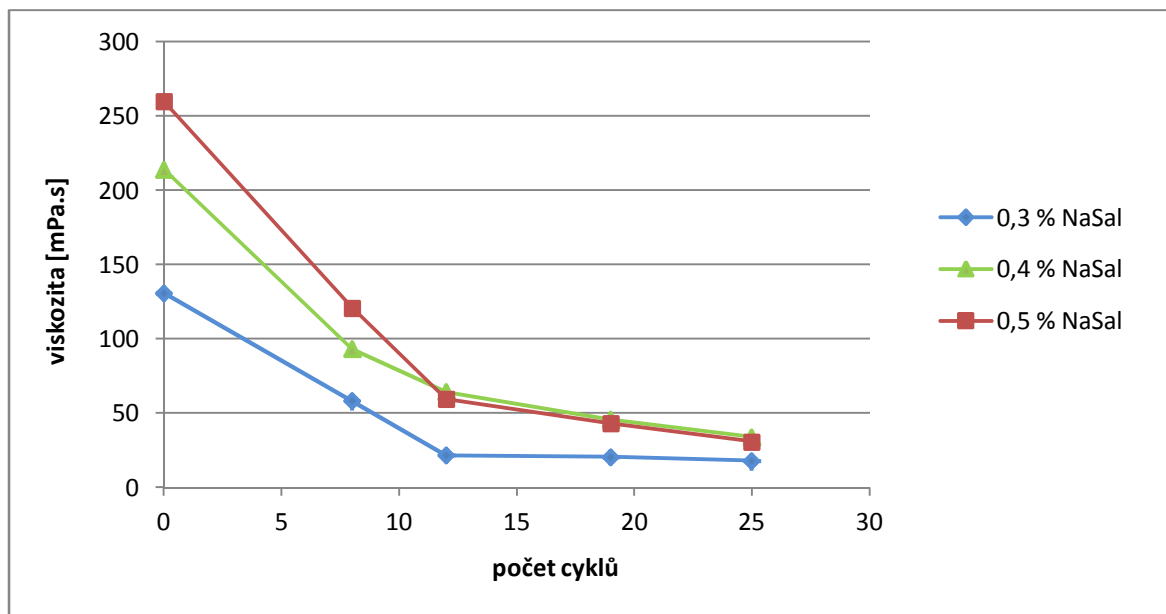
Obr. 11. Průběh zátěžového testu – gely B s různými typy konzervačních látek (viz Tab. 17)

Vliv konzervačních látek MPB, IU a SD na gely s obsahem WPC je uveden na Obr. 10 a Obr. 11. Z těchto obrázků je patrné, že před zahájením zátěžového testu měly gely typu B s použitím IU a SD viditelně vyšší viskozitu než všechny gely typu A.

Po 25 cyklech teplotní zátěže však viskozita těchto gelů poklesla na podobně nízké hodnoty. Nejlépe dopadly oba typy gelů, ve kterých byla použita IU, i když i jejich viskozita byla na velmi nízké hranici použitelnosti. Všechny ostatní gely zátěžový test nevydržely a došlo k jejich rozpadu.



Obr. 12. Průběh zátěžového testu – gely A s MPB a různým obsahem NaSal (viz Tab. 16)



Obr. 13. Průběh zátěžového testu – gely B s MPB a různým obsahem NaSal (viz Tab. 17)

Vliv MPB v kombinaci s různým obsahem NaSal je znázorněn na Obr. 12 a Obr. 13. Z těchto výsledků je zajímavý vliv koncentrace NaSal na použité gely, kdy viskozita čerstvě připravených gelů typu A byla nejvyšší při přidávku 0,3 % NaSal a nejnižší u gelů s nejvyšším přidavkem NaSal, tj. 0,5 %. Zatímco u gelů typu B tomu bylo přesně naopak.

Z Obr. 12 a Obr. 13 je dále patrné, že obsah NaSal má mnohem větší vliv na matici gelu typu B a to tak, že naměřená viskozita těchto čerstvě připravených gelů leží v rozmezí 130 – 260 mPa.s. Zatímco u gelů typu A v rozmezí 120 – 140 mPa.s. Obdobný trend je pozorovatelný na Obr. 10 a Obr. 11, kdy i jiné konzervační látky mají větší vliv na matici gelu typu B.

Stejně jako v předchozích případech, žádný z připravených vzorků působení teplotní zátěže během 25 cyklů nevydržel.

K rozpadu 3D mikrostruktury došlo i přesto, že k žádnému výraznějšímu poklesu pH nedošlo (viz Tab. 18 a Tab. 19). Rozpad gelu způsobený vlivem změny pH bývá způsoben výrazným poklesem hodnoty pH a v tomto případě lze rozpad sítě vrátit opětovnou alkalizací, což ovšem vzhledem k relativně stabilnímu pH těchto vzorků, není náš případ.

Tab. 18. Hodnoty pH gelů typu A s WPC a různým obsahem konzervačních látek

Počet cyklů při 40 °C	pH				
	0,3 % NaSal MPB	0,4 % NaSal MPB	0,5 % NaSal MPB	0,3 % NaSal IU	0,3 % NaSal SD
0	7,5	7,8	8,0	7,6	7,4
8	7,0	7,2	7,5	7,1	7,0
19	6,5	6,7	6,8	6,6	6,6
25	6,1	6,7	6,7	6,5	6,6

Tab. 19. Hodnoty pH gelů typu B s WPC a různým obsahem konzervačních látek.

Počet cyklů při 40 °C	pH				
	0,3 % NaSal MPB	0,4 % NaSal MPB	0,5 % NaSal MPB	0,3 % NaSal IU	0,3 % NaSal SD
0	6,8	6,7	6,6	6,8	6,6
8	6,6	6,5	6,5	6,4	6,5
19	6,4	6,4	6,3	6,2	6,3
25	6,3	6,0	6,1	6,5	6,2

V poslední sérii vzorků (viz Tab. 20), byl použit WPI. Vzhledem k předchozím výsledkům nebyl dále použit gel typu A, kvůli jeho nejméně vyhovujícím vlastnostem.

Byly tedy připraveny různé gely typu B a C s dalšími konzervačními látkami, především s obsahem tymiánové silice a nisinu. Tyto typy přírodních antimikrobních látek byly použity s cílem nahradit používané syntetické konzervanty, což je v dnešní době často požadavkem ze strany spotřebitelů.

Vzhledem k doposud zjištěnému nepříznivému vlivu působení zvýšené teploty na připravené gely, byly některé z gelů typu B a C uchovávány při laboratorní teplotě a ve tmě. Hodnoty pH a viskozit byly u těchto vzorků proměřovány po určitých časových intervalech v řádech několik desítek dnů.

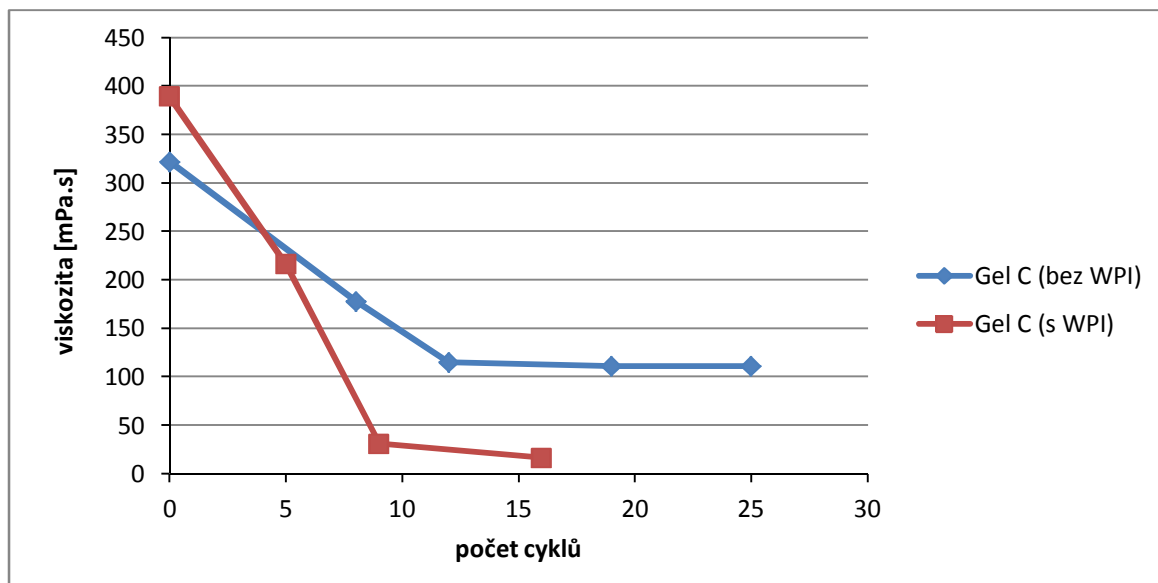
Tab. 20. Složení 4. série gelů – gely s WPI a různým obsahem antimikrobních látek

Ingredience	Gel B [% hm.]	Gel C [% hm.]
Polygel CA	0,5	-
Stabylen 30	0,3	0,6 – 0,9
Glycerin	2	2
Salicylan sodný	0,3	0,3
10% NaOH	2,5	2,5
1% Ichтамol	2,5	2,5
1% Hyaluronan sodný	1	1
D-panthenol	3	3
Vit. E acetát	0,2	0,2
1% Vit. B ₁ + B ₆	5	5
1,5% ZnO v 10% Vit. C	1	1
Beta-karoten (extrakt)	1	1
WPI (v PBS pufru)	0,5	0,5

Tab. 21. Výsledky zátěžového testu gelů typu C, s WPI a různým obs. antimikrobních látek

Gel C (0,6 % Stabylen) bez WPI			Gel C (0,9 % Stabylen) s WPI		
IU a nisin (komerční)			Tymiánová silice (0,02 %)		
Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]	pH	Počet cyklů při 40 °C	Viskozita [mPa.s]	pH
0	322,0	7,8	0	389,0	6,4
8	178,0	-	5	216,0	-
12	115,0	-	9	30,8	-
19	111,0	-	16	16,1	5,5
25	111,0	6,8	-	-	-

Výsledky viskozit a pH gelů typu C, které byly podrobeny zátěžovému testu, jsou uvedeny v Tab. 21 a srovnány na Obr. 14. Z tohoto obrázku je zřejmé, že přítomnost WPI v kombinaci s ostatními použitými surovinami vedla také k rozpadu gelu a to již po 9 cyklech zátěžového testu. K výraznější změně pH vzorků nedošlo ani v tomto případě.



Obr. 14. Průběh zátěžového testu – gely typu C s přídavkem a bez WPI (viz Tab. 21)

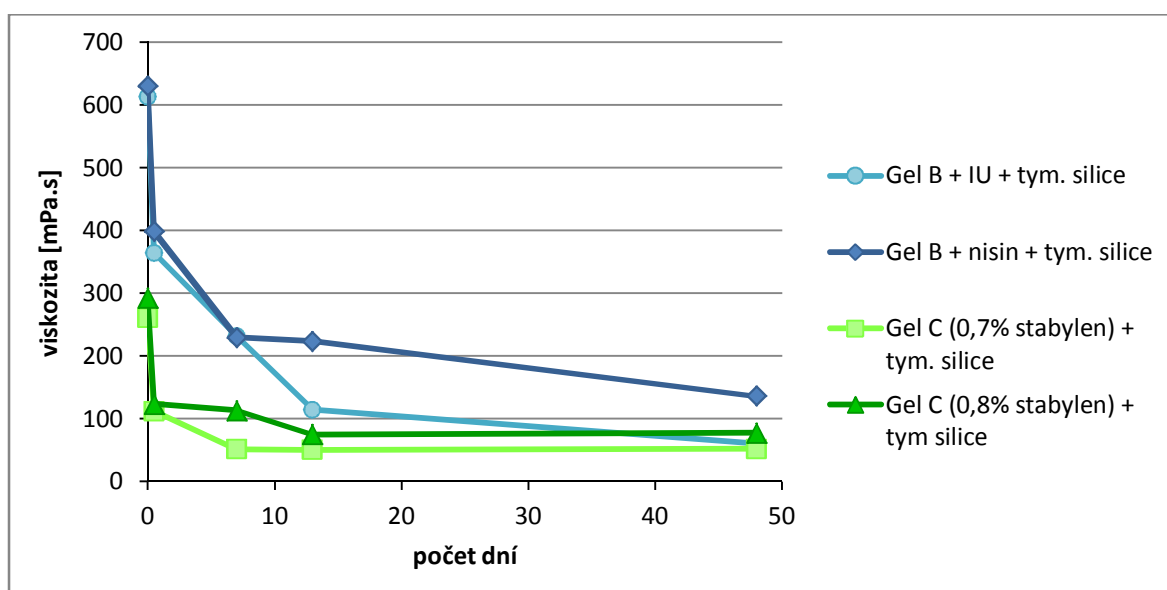
Výsledky gelů typu B a C, které nebyly podrobeny zátěžovému testu a byly uchovávány při laboratorní teplotě a ve tmě, jsou uvedeny v Tab. 22, Tab. 23 a na Obr. 15. Hodnoty viskozity a pH uvedené jako „den 0“ odpovídají vzorkům před přidáním tymiánové silice a WPI. Tyto hodnoty jsou zde uvedeny spíše pro zajímavost, kvůli znázornění jak ovlivňovalo viskozitu přidání zmíněných látek. Samotné sledování stability gelů by mělo tedy správně začínat až ode „dne 0,5“, který představuje hodnoty konečných výrobků.

Tab. 22. Hodnoty viskozity a pH gelů typu B s WPI, tymiánovou silicí (0,06 %) a další antimikrobiální látkou

Počet dnů	Viskozita [mPa.s]		pH	
	IU	nisin (z VÚM)	IU	nisin (z VÚM)
0	613,0	630,0	6,0	6,0
0,5	364,0	398,0	6,5	6,4
7	231,0	229,0	-	-
13	114,0	223,0	5,7	5,7
48	60,2	136,0		

Tab. 23. Hodnoty viskozit a pH gelů typu C s WPI a tymiánovou silicí (0,02 %)

Počet dnů	Viskozita [mPa.s]		pH	
	Stabylen (0,7 %)	Stabylen (0,8 %)	Stabylen (0,7 %)	Stabylen (0,8 %)
0	261,0	292,0	6,9	6,5
0,5	112,0	123,0	7,1	6,5
7	51,1	113,0	6,8	6,2
13	49,8	74,7	6,4	5,8
48	51,8	77,1	5,9	5,7



Obr. 15. Gely typu B a C skladované při laboratorní teplotě a tmě (viz Tab. 22 a Tab. 23)

Jak je patrné z Obr. 15, přidavek WPI a tymiánové silice značně ovlivnil viskozitu celého systému. S čímž ovšem bylo počítáno, a proto byly použité receptury gelů s počáteční viskozitou mnohem vyšší, než by byla vhodná při použití výrobku jako gelový balzám na vlasy (především kvůli komfortu aplikace).

Nejvyšší pokles viskozity nastal u gelu B, kde byla použita jako konzervant IU v kombinaci s tymiánovou silicí. Přesto však viskozita žádného ze vzorků skladovaných při laboratorní teplotě neklesla po 48 dnech pod hodnotu 50 mPa.s a všechny tedy stále byly ve formě gelu (nedošlo k rozpadu polymerní 3D mikrostruktury). Nejlépe z těchto vzorků gelů s obsahem WPI dopadl gel typu B v kombinaci s nisinem a tymiánovou silicí. Tento vzorek ze všech zkoušených variant vyrobených gelů nejlépe splňoval požadavky jako gelový balzám na vlasy s obsahem syrovátkových bílkovin.

8.2 Hodnocení mikrobiologické stability

Mikrobiologická stabilita vzorků gelu byla hodnocena zkouškou účinnosti protimikrobních konzervačních látek a pomocí difuzního agarového testu.

Vzorky 3. série gelů s WPC (složení viz *Tab. 15*) a salicylanem v kombinaci s další konzervační látkou (MPB, IU nebo SD) byly testovány na grampozitivních (*S. aureus*) a gramnegativních (*E. coli*) bakteriích. Výsledky těchto vzorků jsou uvedeny v *Tab. 24* a *Tab. 25*. Na jejich základě bylo vyhodnoceno, že použití WPC (díky obsahu laktózy, příp. dalších látek oproti WPI) v přítomnosti dalších aktivních látek obsažených ve vzorcích, není příliš vhodné.

Tab. 24. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPC (S. aureus CCM 4516, koncentrace $1,4 \cdot 10^7$ CFU/ml)

Vzorek*	Počet CFU/ml	
	čerstvě naočkované	po 24 h
Gel A + MPB	$2,8 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$
Gel A + IU	$2,7 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$
Gel A + SD	$2,6 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$

* koncentrace NaSal byla u testovaných vzorků 0,3%

Tab. 25. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPC (E. coli CCM 4517, koncentrace $3,2 \cdot 10^8$ CFU/ml)

Vzorek*	Počet CFU/ml	
	čerstvě naočkované	po 24 h
Gel A + MPB	$3,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Gel A + IU	$7,7 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^3$
Gel A + SD	$2,7 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$

* koncentrace NaSal byla u testovaných vzorků 0,3%

Vzorky 4. série gelů s WPI (složení viz *Tab. 20*) v kombinaci s různými antimikrobiálními látkami byly testovány na bakteriích *S. aureus*, kvasinkách *C. albicans* a plísni *A. Niger*. Výsledky těchto vzorků jsou uvedeny v *Tab. 26*, *Tab. 27* a *Tab. 28*. Na základě těchto výsledků byl vyhodnocen jako nejlepší konzervační systém sorban draselný (SD) v kombinaci s nisinem a tymiánovou silicí. Tato kombinace antimikrobních látek jako jediná splnila požadavky na hodnocení protimikrobní účinnosti pro topické přípravky, dle ČL 2009 (viz *Tab. 6*) [49].

Tab. 26. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI
(*S. aureus* CCM 4516, koncentrace $7,1 \cdot 10^7$ CFU/ml)

Vzorek	Počet CFU/ml		
	čerstvě naočkované	po 24 h	po 7 dnech
Gel B + 0,02 % tym. silice	$6,0 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^6$
Gel B + IU + 0,03 % tym. silice	$5,5 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^3$
Gel B + SD + 0,03 % tym. silice + nisin (komerční)	$2,3 \cdot 10^3$	0	0

Tab. 27. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI
(*C. albicans* CCM 8215, koncentrace $2,2 \cdot 10^7$ CFU/ml)

Vzorek	Počet CFU/ml		
	čerstvě naočkované	po 24 h	po 7 dnech
Gel B + IU + 0,03 % tym. silice	$2,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$
Gel B + SD + 0,03 % tym. silice + nisin (komerční)	$2,3 \cdot 10^3$	< 10	0

Tab. 28. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI
(*A. niger* CCM 8222, koncentrace $9,3 \cdot 10^6$ CFU/ml)

Vzorek	Počet CFU/ml			
	čerstvě naočkované	po 24 h	po 7 dnech	po 14 dnech
Gel B + IU + 0,03 % tym. silice	$7,0 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^1$
Gel B + SD + 0,03 % tym. silice + nisin (komerční)	$7,4 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$	< 50	< 30

Difuzní agarový test byl prováděn u gelů s WPI za účelem zjištění antimikrobiálních či antimykotických účinků připravených vzorků gelů. Test byl prováděn s MO *S. aureus* a *C. albicans* a jeho výsledky jsou uvedeny v Tab. 29. Nejlépe dopadl vzorek gelu B s nisinem (z VÚM) a tym. silicí (0,03 %), jehož účinek na bakteriální kulturu *S. aureus* je pro zajímavost znázorněn na Obr. 16.

Tab. 29. Výsledky difuzního agarového testu – vzorky s WPI (koncentrace mikroorganismů v rozmezí $10^7 - 10^8$ CFU/ml)

Vzorek	Velikost zóny	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Gel B + IU + 0,03 % tym. silice	-	2,5 mm
Gel B + IU + 0,06 % tym. silice	1,5 mm (+ 12 mm zeslabení)	0
Gel B + nisin (z VÚM) + 0,03 % tym. silice	5 mm	2,5 mm
Gel C + nisin (z VÚM) + 0,06 % tym. silice	3 mm (+ 9 mm zeslabení)	0
Gel B + SD + nisin (komerční) + 0,03 % tym. silice	0	0

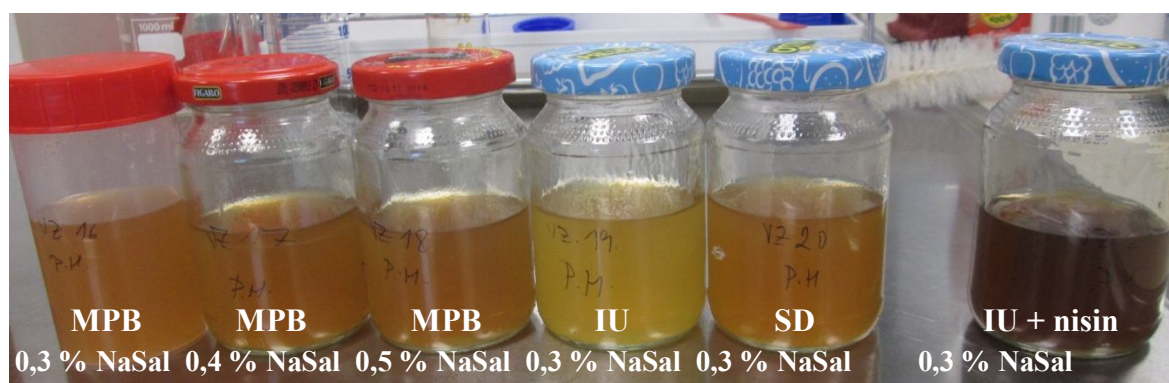


Obr. 16. Difuzní agarový test – *S. aureus*: inhibiční zóna vzorku gelu B s nisinem (z VÚM) a tym. silicí (0,03 %)

8.3 Hodnocení klientského komfortu

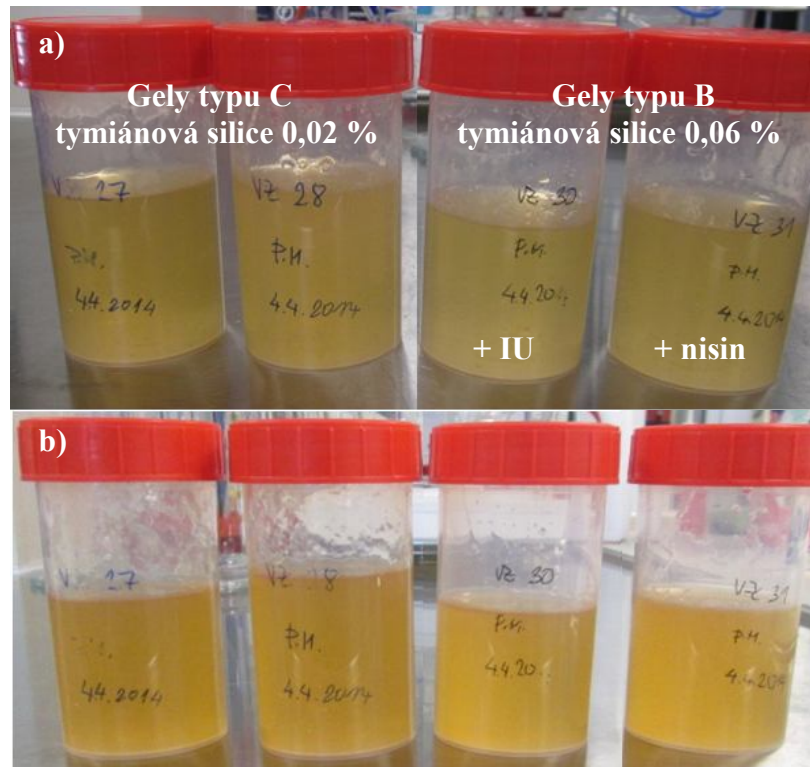
Z tohoto hlediska byly jako nevhodné vyhodnoceny všechny vzorky, které během testů změnilly svou barvu, vůni nebo viskozitu (došlo k rozpadu jejich mikrostruktury).

Bylo zjištěno, že změna barvy některých vzorků gelů s obsahem syrovátkových bílkovin byla ovlivněna použitou konzervační látkou. Pro názornost je uveden *Obr. 17*, na kterém jsou vzorky gelů s WPC (složení viz *Tab. 15*) a různými konzervanty a jeden gel typu C bez obsahu syrovátkových bílkovin, po 25 cyklech zátěžového testu. Barva těchto čerstvě připravených gelů byla stejná jako u vzorků na *Obr. 18 a*). Z *Obr. 17* je patrné, že nejméně změnu barvy gelů s obsahem WPC ovlivňovala IU.



Obr. 17. Gely typu B s WPC (prvních pět vzorků zleva) a gel typu C bez obsahu syrovátkových bílkovin (první vzorek zprava), po 25 cyklech zátěžového testu

Na *Obr. 18* jsou uvedeny vzorky gelů typu B a C s WPI (složení viz *Tab. 20*), které nebyly podrobeny zátěžovému testu. U těchto vzorků gelů byly použity jako antimikrobní látky kromě NaSal také tymiánová silice, samotná nebo v kombinaci s IU, či nisinem. Z uvedeného obrázku je patrné, že barva vzorků s WPI se během skladování při laboratorní teplotě po 48 dnech téměř nezměnila.



Obr. 18. Vzorky gelů typu B a C s WPI: a) čerstvě připravené
b) po 48 dnech skladování při laboratorní teplotě a ve tmě

Z hlediska vůně nejhůře dopadly všechny vzorky s WPC a také některé další, u kterých nefungoval konzervační systém. U těchto vzorků docházelo zřejmě k mikrobiálnímu rozkladu, což se projevilo jejich nepříjemným zápachem. Nejlépe byly z tohoto hlediska vyhodnoceny vzorky, které obsahovaly 0,06% tymiánové silice.

Na základě subjektivního zkoušení na kůži byly jako gely vhodné pro použití jako gelový balzám vyhodnoceny vzorky s viskozitou přibližně 50 – 200 mPa.s (měřeno na vibračním viskozimetru). Pod dolní hranicí již došlo k rozpadu gelové mikrostruktury a nad horní hodnotou by už aplikace nemusela být pro potenciálního klienta pohodlná.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyrobit gelový balzám na vlasy s obsahem syrovátkových bílkovin jako aktivní složky, pokusit se nalézt pro tento výrobek vhodný konzervační systém a provést jeho stabilitní studii. Jedním z požadavků bylo, aby gel obsahoval co nejvíce vitaminů (především skupiny B) a další aktivní látky vhodné pro daný typ výrobku.

Stabilitní studie byla prováděna pomocí zrychleného zátěžového testu, kdy bylo měřeno pH a viskozita a také bylo prováděno hodnocení klientského komfortu. Viskozita byla měřena na vibračním viskozimetru SV-10.

V podstatě u všech vzorků došlo v průběhu zátěžového testu (působení teploty 40 °C v cyklech) ke snížení viskozity hydrogelů natolik, že došlo k jejich rozpadu. Největší podíl na této skutečnosti mají zřejmě vitaminy řady B, některé konzervační látky (které mimo to ovlivňovaly i změnu barvy vzorků gelů), případně také obsah WPC/WPI. Proto by gely v tomto složení neměly být vystaveny teplotě nad 25 °C, ani přímému slunečnímu záření.

K výraznější změně pH nedošlo v průběhu studie u žádného z vyrobených vzorků. U těchto došlo k poklesu pH do cca 15 % z původní hodnoty, což lze u výrobku tohoto typu považovat za tolerovatelnou změnu.

Na základě mikrobiologických testů bylo zjištěno, že nejvhodnějším řešením je využití synergického efektu nisinu a tymiánové silice. Tyto látky jsou kompatibilní se syrovátkovými proteiny a s hydrogelovým systémem. Jejich výhodou je, že jde v podstatě o přírodní konzervační systém, přičemž tymiánová silice slouží zároveň jako parfemace. Ukázalo se, že tyto dvě látky je vhodné doplnit například sorbanem draselným. V kosmetice běžně používané konzervanty se ukázaly být nedostačujícími pro účely stabilizace systému s vysokou organickou zátěží. Z difúzních agarových testů byly patrné i jisté antibakteriální a antimykotické účinky.

Ze všech vyrobených vzorků gelů nejlépe splňoval požadavky jako gelový balzám na vlasy s obsahem syrovátkových bílkovin gel typu B (kombinace Polygelu a Stablyenu), jehož složení je uvedeno v Tab. 20. Konzervační systém tohoto výrobku zahrnoval salicylan sodný v kombinaci s nisinem a tymiánovou silicí. Tento gel také splňoval všechna kritéria z hlediska hodnocení klientského komfortu, tedy nedošlo ke změně jeho barvy ani vůně a jeho viskozita byla v rozmezí pro snadnou aplikaci. Vhodnost použití tohoto výrobku by však měla být ještě ověřena dlouhodobější studií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FEŘTEKOVÁ, V. *Kosmetika v teorii a praxi*. 4. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 80-7345-046-1
- [2] VÉGH, R. *Farmaceutická technologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2011. ISBN 978-80-251-3319-4.
- [3] KVÍTEK, L. a A. PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [4] ZÁHEJSKÝ, J. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: Pohledy klinické, fyziologické a biologické*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.
- [5] OTTENBRITE, R. M. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York: Springer Science+Business Media, 2010. ISBN 978-1-4419-5918-8.
- [6] STEIN, D. B. *Handbook of hydrogels: properties, preparation & applications*. New York: Nova Science Publishers, 2009. ISBN 978-1-60741-702-6.
- [7] Carbopol® Polymers: Overview [pdf]. © The Lubrizol Corporation, 2008. Dostupné z: <http://www.toprhyme.com.tw/New%20product/Carbopol%20polymer%20powder.pdf>
- [8] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2013. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- [9] SEIDEL, A. *Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-118-40692-2.
- [10] ZHAO W., JIN X., CONG Y., Y. LIU a J. FU. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013, Vol. 88, Iss. 3, pp. 327 – 339. DOI: 10.1002/jctb.3970.
- [11] BOATENG, J. S., MATTHEWS, K. H., H. N. E. STEVENS a G. M. ECCLESTON. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2008, Vol. 97, Iss. 8, pp. 2892 – 2923. DOI: 10.1002/jps.21210.

- [12] SCHLOSSMAN, M. L. *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics. Volume III – Ingredients*. 3rd ed. USA: Allured Publishing Corporation, 2002. ISBN 0-931710-77-4.
- [13] Lubrizol. *Product Stewardship: Carbopol®*, *Pemulen™*, and *Noveon® Polymers* [online]. © 1995 – 2014 The Lubrizol Corporation [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <https://www.lubrizol.com/CorporateResponsibility/ProductStewardship/Carbopol.html>
- [14] MORGAN, S. et al. *Cosmetics Nanotechnology*. Washington, D.C.: ACS Symposium Series, 2007. DOI: 10.1021/bk-2007-0961.ch001.
- [15] TOEDT, J., D. KOZA a K. VAN CLEEF-TOEDT. *Chemical composition of everyday products*. London: Greenwood Press, 2005. ISBN 0-313-32579-0.
- [16] SpecialChem. *INCI Directory: Carbomer* [online]. © 2014 [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.specialchem4cosmetics.com/services/inci/ingredient.aspx?id=2254>
- [17] Hydromer. *Hydromer® Products & Services: Cosmetics & Personal Care*. [online]. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: http://www.hydromer.com/cosmetics_personal_care.html
- [18] Innovations in Polymeric COSMETIC INGREDIENTS [pdf]. Hydromer®, 2013 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.hydromer.com/cosmetic/cosmetic.pdf>
- [19] PHILIPS, G. O. a P. A. WILLIAMS. *Handbook of food proteins*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011. ISBN 978-1-84569-758-7.
- [20] YALÇIN, A. S. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, Vol. 12, No. 13, pp. 1637 – 1643.
- [21] HOFFMAN, J. R. a M. J. FALVO. Protein – Which Is Best? *Journal of Sports Science and Medicine*. 2004, Vol. 3, Iss. 3, pp. 118 – 130.
- [22] ONWULATA, CH. I. a P. J. HUTH. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpWPFHB001/whey-processing-functionality>
- [23] MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review*. 2004, Vol. 9, No. 2, pp. 136 – 156.

- [24] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1st ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 0-412-72000-0.
- [25] PARK, Y. W. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 978-0-8138-1982-2. ELECTRONIC ISBN 978-1-61344-522-8. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBCMDP00N/bioactive-components-2>
- [26] Nařízení komise (ES) č. 1662/2006, ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- [27] GEISER, M. The Wonders of Whey Protein. *NSCA's Performance Training Journal*. 2003, Vol. 2, pp. 13 – 15.
- [28] SIMONART, T. Acne and Whey Protein Supplementation among Bodybuilders. *Dermatology*. 2012, Vol. 225 (3), pp. 256 – 258. DOI: 10.1159/000345102.
- [29] SpecialChem. *INCI Directory: Whey protein* [online]. © 2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.specialchem4cosmetics.com/services/inci/ingredient.aspx?id=14661&or=dl>
- [30] *Innovadex. The Search Engine For Product Innovators* [online]. © 2013 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.innovadex.com/PersonalCare>
- [31] TABOR, A. a R. M. BLAIR. *Nutritional Cosmetics – Beauty from Within*. William Andrew Publishing, 2009. ISBN 978-0-8155-2029-0. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpNCBW0005/nutritional-cosmetics>
- [32] *La Chèvre, Le Chaton. Studie* [online]. © 2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupný z: <http://www.lachevre.cz/studie/>
- [33] COSENTINO, C., PAOLINO, R., P. FRESCHI a A. M. CALLUSO. Jenny milk production and qualitative characteristics. *Journal of Dairy Science*. 2012, Vol. 95, No. 6, s. 2910 – 2915.
- [34] *Calinesse. Něžná kosmetika z oslího mléka* [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.calinesse.cz/osli-mleko/>
- [35] KREJČÍ, J. *Kosmetika a kosmetologie* [učební text]. UTB ve Zlíně, FT: Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů [cit. 2014-

- 04-28]. Dostupné po přihlášení z:
<http://kosmetika.ft.utb.cz/EntityDisplayTab.aspx?id=19>
- [36] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, ze dne 30. listopadu 2009, o kosmetických přípravcích. Úřední věstník Evropské unie L 342/59.
- [37] BRANNAN, D. K. *Cosmetic microbiology: A practical Handbook*. Florida: CRC Press, 1997. ISBN 0-8493-3713-5.
- [38] STANCOVÁ, V. Účinnější nisinová antibiotika. In: *Gate2Biotech* [online]. 20. 4. 2009 [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/ucinnejsi-nisino-antibiotika/>
- [39] BAREL, A. O., M. PAYE and H. I. MAIBACH. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, 2009. ISBN-13: 978-1-4200-6963-1.
- [40] DITRICOVÁ, D. Ichtamol a dehty v současné dermatologické terapii. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2005, roč. 19, č. 1, s. 47 – 48. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2005/01/09.pdf>
- [41] Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products [pdf]. © CTFA and Colipa, 2004 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=20>
- [42] Stability Testing of new Drug Substances and Products (CPMP/ICH/2736/99) [pdf]. © EMEA, 2006 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/273699EN.PDF>
- [43] PAVLÍNEK, V., M. STĚNIČKA a M. MRLÍK. *Reologie potravin a kosmetických prostředků* [učební text]. UTB ve Zlíně, FT: Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů [cit. 2014-05-09]. Dostupné po přihlášení z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/EntityDisplayTab.aspx?id=4>
- [44] SV-A Series, Sine-wave Vibro Viscometer: Users' Handbook [pdf]. A&D Company, June 2009 [cit. 2014-05-09]. Dostupné z: http://www.aandd.jp/products/test_measuring/sv10/handbook/sv_users_handbook_v1.13e.pdf

- [45] RAŠKOVÁ, Z., VESELÁ D., J. SEDLAŘÍKOVÁ A P. SÁHA. *Studie vlastností laboratorně připraveného produktu – Antioxidační gelové masky. Sborník konference Plastko, 2010.* ISBN 978-80-7318-909-9.
- [46] HRABALÍKOVÁ, M., VESELÁ, D., KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ, Z., SÁHA T., VALÁŠEK, P., J. DRBOHLAV A V. SEDLAŘÍK. Využití fermentačních produktů syrovátky jako modifikátoru hydrofilních polymerních matic pro kosmetické aplikace. *Sborník MKK 2013, Luhačovice, s. 118 – 121.* ISBN 978-80-904679-7-2.
- [47] KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ, Z., VESELÁ, D., HRABALÍKOVÁ M., SEDLAŘÍK, V., A. ŠALAKOVÁ a T. SÁHA. Stabilitní studie hydrogelů s obsahem syrovátkových proteinů využitelných v dermatologické praxi. *Sborník MKK 2013, Luhačovice, s. 126 – 129.* ISBN 978-80-904679-7-2.
- [48] KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ, Z., HOLČAPKOVÁ, P., VESELÁ, D., M. HRABALÍKOVÁ A V. SEDLAŘÍK. Stabilitní studie hydrogelů s obsahem syrovátkových bílkovin. *Sborník konference Plastko 2014, Zlín, s. 274 – 278.* ISBN 978-80-7454-335-7.
- [49] Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009.* Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

α -LA	α -laktalbumin
β -LG	β -laktoglobulin
BCAAs	Branched-Chain Amino Acids (Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem)
BSA	Bovinní sérum albumin
CFU	Colony forming units (kolonie tvořící jednotka – KTJ)
CMC	Karboxymethylcelulóza
DF	Diafiltrace
ED	Elektrodialýza
HEC	Hydroxyethylcelulóza
HPC	Hydroxypropylcelulóza
Ig	Imunoglobuliny
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (Mezinárodní názvosloví kosmetických přísad)
IU	Imidazolidinyl urea
KP	Kosmetický přípravek
LF	Laktoferin
LP	Laktoperoxidáza
MC	Methylcelulóza
MF	Mikrofiltrace
MO	Mikroorganismy
MPB	Methylparaben
NaCl	Chlorid sodný (Sodium chloride)
NaHa	Hyaluronan sodný (Sodium hyaluronate)
NaSal	Salicylan sodný (Sodium salicylate)

NF	Nanofiltrace
NMF	Natural moisturizing factor
o/v	Emulze typu „olej ve vodě“
PEO	Polyethylenoxid
PHEMA	Polyhydroxyethylmetakrylát
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrolidon
RH	Relative humidity (relativní vlhkost)
RO	Reverzní osmóza
SD	Sorban draselný (Potassium sorbate)
UF	Ultrafiltrace
VÚM	Výzkumný ústav mlékárenský
WPC	Syrovátkový koncentrát (Whey Protein Concentrate)
WPI	Syrovátkový izolát (Whey Protein Isolate)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Postup přípravy karbomerového gelu a znázornění struktury řetězce [7].....</i>	13
<i>Obr. 2. Rozdílné struktury hydrogelů [5, s. 5].....</i>	14
<i>Obr. 3. Využití hydrogelů [5, s. 13]</i>	15
<i>Obr. 4. Vibrační viskozimetr SV-10 (vpravo: detekční systém) [44]</i>	44
<i>Obr. 5. Kalibrační přímka β-karotenu</i>	51
<i>Obr. 6. Průběh zátěžového testu – gely s různým obsahem vitaminů B₁, B₆, C a ZnO.....</i>	58
<i>Obr. 7. Porovnání gelů A, B a C s 0,1 % vit. B₁ + B₆ a 0,1 % ZnO</i>	58
<i>Obr. 8. Viskozity gelů s různým obs. 1,5% ZnO v 10% vit. C, před a po zátěžovém testu</i>	60
<i>Obr. 9. pH gelů s různým obs. 1,5% ZnO v 10% vit. C, před a po zátěžovém testu</i>	60
<i>Obr. 10. Průběh zátěžového testu – gely A s různými typy konzervačních látek (viz Tab. 16).....</i>	62
<i>Obr. 11. Průběh zátěžového testu – gely B s různými typy konzervačních látek (viz Tab. 17).....</i>	63
<i>Obr. 12. Průběh zátěžového testu – gely A s MPB a různým obsahem NaSal (viz Tab. 16)</i>	63
<i>Obr. 13. Průběh zátěžového testu – gely B s MPB a různým obsahem NaSal (viz Tab. 17)</i>	64
<i>Obr. 14. Průběh zátěžového testu – gely typu C s přídatkem a bez WPI (viz Tab. 21).....</i>	67
<i>Obr. 15. Gely typu B a C skladované při laboratorní teplotě a tmě (viz Tab. 22 a Tab. 23)</i>	68
<i>Obr. 16. Difuzní agarový test – S. aureus: inhibiční zóna vzorku gelu B s nisinem (z VÚM) a tym. silicí (0,03 %).....</i>	71
<i>Obr. 17. Gely typu B s WPC (prvních pět vzorků zleva) a gel typu C bez obsahu syrovátkových bílkovin (první vzorek zprava), po 25 cyklech zátěžového testu</i>	72
<i>Obr. 18. Vzorky gelů typu B a C s WPI: a) čerstvě připravené b) po 48 dnech skladování při laboratorní teplotě a ve tmě.....</i>	73

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Vybrané gelotvorné látky využívané v kosmetice jako zahušťovadla [14, s. 10]	19
Tab. 2. Typické složení a fyzikální vlastnosti bílkovin v syrovátce [22][23]	22
Tab. 3. Složení forem syrovátkových bílkovin v % [27]	25
Tab. 4. Tlakově řízené membránové filtrace složek mléka [22, s. 5]	27
Tab. 5. Nejčastěji využívané kosmetické konzervanty [35, s. 107 – 116][37, s. 164 – 173]	35
Tab. 6. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti – Topické přípravky [49]	54
Tab. 7. Složení gelů typu A, B a C (vztaženo na 100 g hydrogelu)	55
Tab. 8. Další používané látky s antimikrobními vlastnostmi	55
Tab. 9. Složení 1. série gelů – gely s různým obsahem vit. B ₁ , B ₆ , C a ZnO	56
Tab. 10. Hodnoty viskozit gelů typu A s různým obsahem vit. B ₁ a B ₆	56
Tab. 11. Hodnoty viskozit gelů typu A s různým obsahem vit. B ₁ , B ₆ , C a ZnO	57
Tab. 12. Hodnoty viskozit gelů typu B s různým obsahem vit. B ₁ , B ₆ , C a ZnO	57
Tab. 13. Hodnoty viskozit gelu typu C s různým obsahem vit. B ₁ , B ₆ , C a ZnO	57
Tab. 14. Složení 2. série gelů – gely s různým obsahem 1,5% ZnO v 10% vit. C	59
Tab. 15. Složení 3. série gelů – gely s WPC a různým obsahem NaSal v kombinaci s dalšími antimikrobními látkami	61
Tab. 16. Hodnoty viskozit gelů typu A s WPC a různým obsahem konzervačních látek	62
Tab. 17. Hodnoty viskozit gelů typu B s WPC a různým obsahem konzervačních látek	62
Tab. 18. Hodnoty pH gelů typu A s WPC a různým obsahem konzervačních látek	65
Tab. 19. Hodnoty pH gelů typu B s WPC a různým obsahem konzervačních látek	65
Tab. 20. Složení 4. série gelů – gely s WPI a různým obsahem antimikrobních látek	66
Tab. 21. Výsledky zátěžového testu gelů typu C, s WPI a různým obs. antimikrobních látek	66
Tab. 22. Hodnoty viskozit a pH gelů typu B s WPI, tymiánovou silicí (0,06 %) a další antimikrobní látkou	67
Tab. 23. Hodnoty viskozit a pH gelů typu C s WPI a tymiánovou silicí (0,02 %)	68
Tab. 24. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPC (<i>S. aureus</i> CCM 4516, koncentrace $1,4 \cdot 10^7$ CFU/ml)	69
Tab. 25. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPC (<i>E. coli</i> CCM 4517, koncentrace $3,2 \cdot 10^8$ CFU/ml)	69

Tab. 26. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI (<i>S. aureus</i> CCM 4516, koncentrace $7,1 \cdot 10^7$ CFU/ml)	70
Tab. 27. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI (<i>C. albicans</i> CCM 8215, koncentrace $2,2 \cdot 10^7$ CFU/ml)	70
Tab. 28. Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace – vzorky s WPI (<i>A. niger</i> CCM 8222, koncentrace $9,3 \cdot 10^6$ CFU/ml).....	70
Tab. 29. Výsledky difuzního agarového testu – vzorky s WPI (koncentrace mikroorganismů v rozmezí $10^7 - 10^8$ CFU/ml).....	71