

Příprava hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu pro kosmetické aplikace

Bc. Monika Muchová

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Muchová**
Osobní číslo: **T17247**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu pro kosmetické aplikace**

Zásady pro vypracování:

Hydrogely na bázi dialdehydu celulózy a polyvinylalkoholu (PVA/DAC) jsou netoxické materiály s optimalizovatelnou hustotou sítě a velikostí pórů, což je základní předpoklad pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek. Náplní práce proto bude kromě zpracování literární rešerše na téma využití hydrogelů v kosmetice hlavně příprava PVA/DAC hydrogelů s různou hustotou sítě a studium kinetiky bobtnání a uvolňování biologicky aktivních látek z hydrogelu.

V první fázi bude připraveno samotné síťovací čidlo na bázi oxidované celulózy. Následně budou za pomoci různých reakčních poměrů PVA:DAC a/nebo za využití PVA o různé střední molekulové hmotnosti připraveny hydrogely o různé hustotě sítě a velikosti pórů. Tyto budou následně charakterizovány za pomoci dostupných fyzikálně-chemických metod, se zvláštním důrazem na stanovení parametrů sítě, porozity a stupně bobtnání. Následně budou hydrogely nasyceny roztokem vhodné biologicky aktivní látky. Kinetika jejího uvolňování bude sledována pomocí disolučního systému a dalších vhodných technik. Výsledný materiál bude následně testován z hlediska jeho biologických vlastností, např. transdermální adsorpce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Kim, U.-J.; Lee, Y. R.; Kang, T. H.; Choi, J. W.; Kimura, S.; Wada, M. Protein Adsorption of Dialdehyde Cellulose–Crosslinked Chitosan with High Amino Group Contents. *Carbohydrate Polymers* 2017, 163, 34–42.

Münster, L.; Vícha, J.; Klofáč, J.; Masař, M.; Kucharczyk, P.; Kuřitka, I. Stability and Aging of Solubilized Dialdehyde Cellulose. *Cellulose* 2017, 24 (7), 2753–2766.

Münster, L.; Vícha, J.; Klofáč, J.; Masař, M.; Hurajová, A.; Kuřitka, I. Dialdehyde Cellulose Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels: Influence of Catalyst and Crosslinker Shelf Life. *Carbohydrate Polymers* 2018, 198, 181–190.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Jan Vícha, Ph.D.

Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2019

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Morita Muchová

Obor: TTDK

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 20.5.2019

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 užít 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 přihlíádne k vyšší výdělku dosaženému školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu (PVA) zesíťovaných pomocí 2,3-dialdehyducelulózy (DAC) o různé hustotě sítě a velikosti pórů. Toho bylo dosaženo za využití PVA o různé střední molekulové hmotnosti a různého množství síťovadla (DAC). Následně byly hydrogely zkoumány z hlediska parametrů sítě, viskoelastických a povrchových vlastností (BET a SEM analýza), kapacity pro navázání biologicky aktivní látek, kinetiky jejich uvolňování a také byly provedeny testy toxicity hydrogelů a testy transdermálního uvolňování látek. Vlastnosti hydrogelů závisely jak na typu PVA matrice, tak na množství síťovadla. Přípravu PVA/DAC hydrogelů lze tedy optimalizovat tak, aby vykazovaly dobré mechanické vlastnosti, nízkou toxicitu a schopnost přenosu a transdermálního podání biologicky aktivních látek. Připravené hydrogely tak mohou být vhodnými materiály pro možné kosmetické aplikace.

Klíčová slova: Polyvinylalkohol, dialdehyd celulózy, hydrogel, síťování, kosmetika, mechanické vlastnosti, nízká toxicita

ABSTRACT

Diploma thesis focus on the preparation and the characterization of hydrogels based on poly(vinyl alcohol) (PVA) crosslinked by 2,3-dialdehydecellulose (DAC) with different network parameters and pore sizes. This was achieved by using PVA of different weight-average molecular weight and different amounts of DAC. Subsequently, network parameters, viscoelastic properties and surface properties (BET and SEM analysis) of the hydrogels were determined, together with loading and release kinetics of biologically active substances, toxicity and transdermal tests. Hydrogel properties were highly dependent on both the PVA matrix molecular weight and amount of DAC crosslinker. Properties of resulting hydrogels thus could be optimized to obtain materials with good mechanical properties and low toxicity, which are capable to carry and to transdermally release biologically active compounds. Such hydrogels has a potential application in cosmetics.

Keywords: poly(vinyl alcohol), dialdehyde cellulose, hydrogel, crosslinking, cosmetics, mechanical properties, low toxicity

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D., Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za vedení, rady, pomoc při řešení diplomové práce a vynaložený čas, který mi věnovali při vzniku této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zdeňce Capákové a Ing. Veronice Mikulcové, Ph.D. za ochotu a velkou pomoc při provádění experimentů. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za jejich podporu nejen při této práci, ale i během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 HYDROGELY	11
1.1 CHARAKTERISTIKA A KLASIFIKACE HYDROGELŮ	11
1.2 STRUKTURA HYDROGELU	12
1.3 HYDROGELY NA BÁZI POLYVINYLALKOHOLU (PVA).....	13
1.3.1 Příprava hydrogelů na bázi PVA.....	13
1.4 DIALDEHYD CELULÓZY	14
1.4.1 Příprava DAC.....	14
2 VYUŽITÍ HYDROGELŮ S DŮRAZEM NA KOSMETICKÉ APLIKACE	16
2.1 BIOAKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICE.....	17
2.1.1 Hydroxykyseliny (AHA, PHA, BA).....	17
2.1.2 Retinoidy	18
2.1.3 Rutin.....	19
2.1.4 Vitamin C (kyselina L-askorbová).....	20
2.1.5 Nikotinamid (B ₃).....	21
2.1.6 Rostlinné extrakty	22
3 METODY STUDIA HYDROGELŮ	23
3.1 MORFOLOGIE	23
3.1.1 Specifický povrch.....	23
3.1.2 Porozita	24
3.2 PARAMETRY SÍTĚ	25
3.3 VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI	26
3.4 UVOLŇOVÁNÍ LÁTEK Z HYDROGELU.....	28
3.5 BIODOPATIBILITA	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
4 CÍL PRÁCE	31
5 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE DAC A PVA/DAC HYDROGELŮ	32
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	32
5.2 PŘÍPRAVA DAC A PVA/DAC HYDROGELŮ.....	32
5.2.1 Příprava DAC.....	32
5.2.2 Příprava PVA/DAC hydrogelů	33
5.3 STANOVENÍ PARAMETRŮ SÍTĚ.....	34
5.4 MĚŘENÍ VISKOELASTICKÝCH VLASTNOSTÍ	34
5.5 BET A SEM ANALÝZA	34
5.6 NASYCENÍ HYDROGELŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKOU A JEJÍ UVOLŇOVÁNÍ	35
5.7 CYTOTOXICITA.....	36
5.8 TRANSDERMÁLNÍ UVOLŇOVÁNÍ	37
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	39

6.1	PARAMETRY SÍŤE	39
6.2	VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI	42
6.3	BET A SEM ANALÝZA	45
6.4	NASYCENÍ HYDROGELŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKOU A JEJÍ UVOLŇOVÁNÍ	47
6.5	TESTY CYTOTOXICITY	50
6.6	TRANSDERMÁLNÍ UVOLŇOVÁNÍ	50
	ZÁVĚR	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM TABULEK	63

ÚVOD

Historie hydrogelů sahá již od 70. let 20. století. Díky dobrým viskoelastickým vlastnostem, vysoké schopnosti vázat na sebe vodu a nízké toxicitě se hydrogely podobají přírodním tkáním. Kromě toho také vykazují určitou pórovitost a schopnost pojmout a následně uvolňovat různé biologicky aktivní látky, popřípadě léčiva. Tyto vlastnosti činí hydrogely vynikajícími materiály pro široké spektrum aplikací od podávání léků, dermálních náplastí až po kosmetické aplikace, např. masky na obličej. Díky intenzivnímu výzkumu a vývoji se tak dnes hydrogely využívají v mnoha odvětvích, především v biomedicínském, potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Jedním ze zásadních kritérií pro biomedicínské a kosmetické aplikace hydrogelů je použití netoxických zesíťovacích činidel, které je možné získat například z přirozeně dostupných biopolymerů. Také proto v poslední letech vzrůstá poptávka po nových funkčních biopolymerních derivátech, které vykazují biologickou kompatibilitu, rozložitelnost, celosvětovou dostupnost a nízkou nákladnost. Příkladem takového derivátu je dialdehyd celulózy (DAC), který se získává selektivní oxidací celulózy. V této práci se věnujeme přípravě a charakterizaci hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu zesíťovaného právě pomocí DAC, s vlastnostmi optimalizovanými pro případné kosmetické aplikace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HYDROGELY

Hydrogely jsou trojrozměrné zesíťované struktury, které dokáží absorbovat velké množství vody na základě své hydrofilní povahy. [1] Existují přirozeně ve formě biopolymerů, jako je kolagen či želatina, nebo mohou být vyrobeny synteticky. Přírodní hydrogely mají vynikající biokompatibilitu a často obsahují makromolekuly, které se již nacházejí ve fyziologických systémech. Během posledních dvou desetiletí byly přírodní hydrogely v mnoha případech postupně nahrazeny syntetickými hydrogely, které mají dlouhou životnost, vysokou kapacitu absorpce vody, mohou být upraveny s ohledem na požadované vlastnosti a jsou také snadno charakterizovatelné. [1] [2] [3] Kombinací obou typů jsou potom biohybridní gely, které zahrnují výhody jak přírodních, tak syntetických hydrogelů. Hydrogely mohou obsahovat modifikace pro specifické interakce s buňkami, kontrastní látky pro zobrazování, povrchové skupiny k odpuzování imunitních a koagulačních proteinů atd. [1] [2] [3]

1.1 Charakteristika a klasifikace hydrogelů

Nejdůležitější vlastností hydrogelů je schopnost vázat vodu, která závisí na hustotě hydrogelové sítě a obsahu hydrofilního monomeru. Vyšší množství síťovacích činidel vede k vytvoření pevnější struktury se sníženou schopností bobtnání. [4] Absorbovaná voda může být buď primárně nebo sekundárně vázaná. Primárně vázaná voda hydratuje nejpolarnější hydrofilní skupiny, které jsou přítomné v matici hydrogelu. Síť postupně nabobtnává a dochází tak k interakci molekul vody i s hydrofobními skupinami, což vede k jejímu sekundárnímu vázání. Díky osmotickému tlaku nasává hydrogelová síť další volnou vodu až dosáhne rovnovážného stavu nabobtnání, [1] [5] který závisí na teplotě, pH a iontové síle. [1]

Základní dělení hydrogelů:

- Trvalé (chemické) hydrogely – síť, která obsahuje kovalentní vazby mezi makromolekulami [6] [7]
- Reverzibilní (fyzikální) hydrogely – obsahují molekulární spletení, které stabilizují iontové vazby, hydrofobní interakce či vodíkové vazby [6] [7]

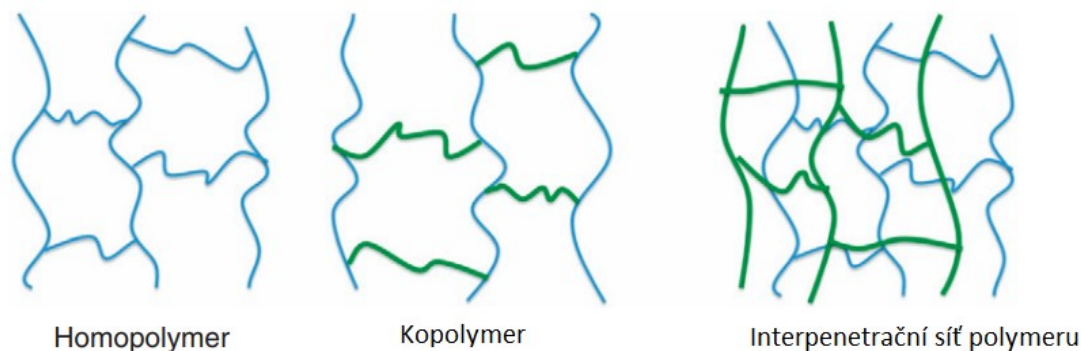
Kromě výše uvedené klasifikace mohou být hydrogely dále rozděleny na základě jejich vlastností, reakce na vnější podněty, náboje a dalších charakteristik, které jsou shrnuty v Tabulce 1. [8]

Tab. 1. Klasifikace hydrogelů na základě jejich vlastností

Sít'ování	Fyzikální, Chemické	
Odezva	Fyzikální	Teplota, tlak, světlo, elektřina/magnetismus
	Biochemická	Antigeny, enzymy, ligandy
	Chemická	pH, glukóza
Fyzikální vlastnosti	Běžné, modifikované	
Příprava	Homopolymerace, kopolymerace, interpenetrace	
Původ	Přírodní, syntetické, smíšené	
Degradabilita	Biodegradabilní, nerozložitelný	
Náboj	Kationické, anionické, neionické, amfoterní	

1.2 Struktura hydrogelu

Hydrogely jsou sítě polymerních řetězců, které jsou kovalentně nebo fyzikálně propojeny do 3D sít'ového uspořádání. Sít' hydrogelu je obecně složena z jedné či více složek (kopolymerů). Při bobtnání může hydrogel přecházet z pevnějšího stavu do stavu gelovitého, což může způsobit značnou křehkost a tím způsobit i nevratné poškození gelové struktury. Hydrogely mohou být homopolymerní – sít' je tvořena z jediného typu opakující se monomerní jednotky nebo kopolymerní – sít' je tvořena různými typy monomerů. Obsahuje-li dvě nebo více sítí, které jsou alespoň částečně propleteny a nejsou vzájemně spojeny kovalentními vazbami, tvoří interpenetrující polymerní sít' (IPN, Obr. 1). [1]



Obr. 1. Různé typy hydrogelových struktur [1]

Struktura a porozita hydrogelů může být modifikována řízením hustoty zesílení v jejich struktuře. Struktura hydrogelní sítě je obecně definována třemi parametry: objemovou frakcí polymeru v nabobtnaném stavu ($v_{2,s}$), střední molekulovou hmotností polymerních řetězců mezi zesíleními (M_c) a velikostí ok sítě (ξ). [1] Objemová frakce polymeru udává procentuální podíl gelové matrice připadající na objem gelu. Molekulová hmotnost mezi uzly sítě popisuje průměrnou hmotnost makromolekulárních řetězců mezi libovolnými dvěma sousedními síťovacími body (chemickými nebo fyzikálními) v rámci trojrozměrné struktury hydrogelové sítě. Velikost oka sítě je vzdálenost mezi jednotlivými řetězci, a popisuje velikost prostoru dostupného pro difúzní pohyb molekul rozpuštěné látky. Porovnání těchto parametrů pro daný typ hydrogelu ukazuje do jaké míry je dané síťovadlo efektivní. [1] [2] [4] Molekulová struktura a hustota zesílení hydrogelů může být optimalizována výběrem specifického polymeru a síťovacího činidla. [4]

1.3 Hydrogely na bázi polyvinylalkoholu (PVA)

Mezi klasické syntetické polymery používané pro přípravu hydrogelů patří poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (PHEMA), poly(N-isopropyl-2-akrylamid) (PNIPAAm), a poly(vinyl alcohol) (PVA). [1] [2] [3] Poslední z jmenovaných, PVA, je jedním z nejčastěji a nejvíce používaných materiálů pro hydrogelové aplikace, protože je hydrofilní, biologicky kompatibilní, odbouratelný, netoxický a je možné ho mísit se širokým spektrem syntetických polymerů a biopolymerů. Kromě toho má PVA dobrou chemickou, tepelnou a mechanickou stabilitu, která umožňuje jeho použití v obalech, čištění odpadních vod apod. [8] [9]

1.3.1 Příprava hydrogelů na bázi PVA

Hydrogely na bázi PVA mohou být připraveny různými způsoby, které určují jejich parametry sítě a fyzikálně-chemické vlastnosti.

Prvním způsobem je fyzikální síťování pomocí krystalizace vyvolané zmrazováním a rozmrazováním nebo vysokoteplotním (energetickým) zpracováním, kdy jsou uzly sítě vytvořeny prostřednictvím prodlouženého ohřevu. Výhodou fyzikálního síťování je nepřítomnost jakéhokoliv síťovacího činidla. Částečná degradace PVA způsobená vyššími teplotami ovšem může vést k tvorbě nenasycených vazeb, štěpení řetězce a tím i k kovalentním interakcím. Síťovací proces je tak spíše špatně definován po chemické stránce. Kromě toho hydrogely připravené pomocí fyzikálních metod vykazují poněkud horší mechanické vlastnosti v zbobtnalém stavu, protože fyzikální zesítnění není tak silné a stabilní jako při použití chemických metod. [10]

Druhý způsob je síťování chemickou cestou, kdy se využívají síťovací činidla, jako je epichlorhydrin, různé aldehydy (formaldehyd, glutaraldehyd, benzaldehyd atd.), anhydridy (dianhydrid EDTA) nebo kyselina boritá. Síťování je dosaženo reakcí síťovacích činidel s hydroxylovými skupinami PVA. Společným znakem síťovacích činidel je syntetický původ (kromě kyseliny borité) a relativně vysoká toxicita. Nízká molekulová hmotnost síťovacích činidel také umožňuje snadné proniknutí přes různé bariéry do živého organismu. [8] [10] Výsledné hydrogely proto musí být před použitím intenzivně vyprány a i přesto mohou být pro organismy toxické při dlouhodobém vystavení. Důležitým krokem přípravy syntetických hydrogelů je proto jejich intenzivní čištění a odstranění všech potenciálně toxických reakčních složek, které mohou být zachyceny v gelové síti.

1.4 Dialdehyd celulózy

Z důvodů relativně vysoké toxicity některých nízkomolekulárních síťovacích činidel, např. glutaraldehydu, je pro biomateriálové aplikace vhodné zvážit použití alternativní činidel na bázi přirozeně se vyskytujících biopolymerů. [10] Například Genipin je látka, která se extrahuje z plodů *Gardenia Jasminoides* a může se použít jako přírodní síťovadlo s nízkou toxicitou. Nicméně, jeho omezená dostupnost a vysoká cena omezují jeho použití ve větším měřítku. Tento problém lze vyřešit použitím široce rozšířených, snadno dostupných a modifikovatelných biopolymerů jako je celulóza, jejíž modifikací lze připravit dialdehyd celulózy (DAC). [8] [10]

1.4.1 Příprava DAC

Oxidace je poměrně častou modifikací celulózy a používá se například pro zvýšení rozpustnosti celulózy ve vodě nebo jako prostředek k její další modifikaci. Oxidace je téměř vždy

doprovázena degradací polymerního řetězce celulózy. Snížení stupně polymerace může být buď důsledkem oxidační reakce *per se* nebo může být důsledkem následné depolymerace indukované změnami pH. Tomuto lze předejít pomocí šetrné selektivní oxidace celulózy jodistanem, [11] což je vysoce selektivní reakce, která se mimo jiné používá i při analýze sacharidů a polysacharidů a je také průmyslově využívána k výrobě oxidovaného škrobu. Dochází při ní k oxidaci hydroxylových skupin na C2 a C3 na dvojici aldehydových skupin za současného štěpení vazby C2-C3 anhydroglukopyranosidového cyklu. Oxidace se provádí ve tmě, aby se zabránilo radikálově indukované depolymeraci. Doba reakce a koncentrace oxidačního činidla určuje stupeň konverze celulózy. [12] [13] Výsledný produkt se označuje jako dialdehyd celulózy (DAC).

Vzhledem k vysoké reaktivitě aldehydových skupin může DAC sloužit například jako meziprodukt pro derivatizaci celulózy. Aldehydové skupiny DAC mohou být převedeny na karboxylové skupiny, primární alkoholy nebo iminy.[14] Kromě toho se DAC využívá se v mnoha oblastech a aplikacích, jako jsou biologické materiály pro zdravotnictví, textilní a obalový průmysl. Využívají se také jako absorbenty pro ionty těžkých kovů nebo proteiny a materiál pro chromatografické kolony. [15]

Alternativní metodou přípravy DAC je oxidace celulózy pomocí kovových solí, například chloridu lithného, za vysokých teplot. Vyšší teplota zrychluje reakční kinetiku, ale příliš vysoká teplota (nad 75 °C) částečně rozkládá DAC. [8] [10]

DAC není bezprostředně po oxidaci rozpustný ve vodě ani organických rozpouštědlech, a to kvůli tvorbě hemiacetalů aldehydových skupin s hydroxylovými skupinami celulózy. Produkt se stává ve vodě rozpustným pouze po redukci svých aldehydových skupin na primární alkoholy nebo jejich oxidaci na karboxylové kyseliny. [14] Jinou možností je solubilizace vysoce oxidovaného DAC (stupeň konverze nad 70%) v horké vodě, při níž dochází k postupnému odštěpování řetězců od nerozpustného materiálu a tvorbě vodného roztoku DAC. [12] [13] [16]

2 VYUŽITÍ HYDROGELŮ S DŮRAZEM NA KOSMETICKÉ APLIKACE

Aplikace hydrogelů sahá až do roku 1960, kdy Wichterle a Lim použili hydrogel na bázi poly 2-hydroxyethylmethakrylátu na výrobu prvních kontaktních čoček. V dnešní době jsou hydrogely široce využívány především pro inženýrské, biologické a farmaceutické účely. Aplikace hydrogelů závisí na jejich původu, trvanlivosti, odezvě na podněty prostředí, náboji, struktuře nebo složení. [17] Polyelektrolytové hydrogely jsou obzvláště zajímavé, neboť na sebe vážou s opačně nabitě látky a vytvářejí tak komplexy. Toho se využívá pro řízené uvolňování léčiv, proteinů, peptidů, pesticidů a hormonů pro biomedicínské aplikace. Hydrogely také mohou kopírovat chování lidských tkání. Reagují na změny prostředí jako je pH, teplota, enzymy a elektrické pole, čehož lze využít v lékařských implantátech, protektických svalech či diagnostice.

Jak už bylo zmíněno, PVA zaujímá přední místo mezi různými syntetickými hydrofilními polymery používanými k přípravě hydrogelů a biomateriálů protože je netoxický, nekarcinogenní a má dobrou biologickou kompatibilitu. PVA hydrogely mají širokou škálu biomedicínských aplikací od náhrady artikulárních chrupavek až po řízené uvolňování farmaceutických substancí. [18, 19] Jejich využití je také v potravinářském průmyslu jako přísady do potravin, v kosmetickém průmyslu či v sanitárních produktech. V domácnostech to jsou například plenky obsahující hydrogel na bázi polyakrylátu sodného. Hrubé prášky polyakrylamidu nebo draselné polyakrylátové matrice se používají jako dlouhodobý rezervoár vody pro růst rostlin. [5]

V kosmetickém průmyslu se hydrogely používají v širokém rozsahu jako zahušťovadla a želírující látky v kosmetických přípravcích určených pro osobní péči. Příkladem jsou šampóny, pleťové krémy, kondicionéry, vlasové a tělové gely, zubní pasty, opalovací krémy apod. Řada těchto hydrogelů je komerčně dostupná. Patří mezi ně jak přírodní, tak syntetické látky. Příkladem přírodních hydrogelů jsou zejména ty založené na polysacharidech a jejich derivátech a zahrnují např. guarovou gumu a její deriváty (hydroxypropyl-, karboxymethyl- a hydroxypropyltrimonium-), karubovou gumu, deriváty celulózy (karboxymethyl-, methylhydroxypropyl-, methyl-, hydroxyethyl- a další) a xantanovou gumu. Syntetické hydrogely používané v kosmetickém průmyslu jsou do značné míry založeny na bázi akrylátu. [20] [21]

Další využití náchází hydrogely v kosmetických prostředcích pro péči o pokožku, např. pro tvorbu obličejových masek. Ty se obvykle vyrábějí z kolagenu, kyseliny hyaluronové nebo polyvinylpyrrolidonu. Masky mají za úkol hydratovat pokožku a zabránit stárnutí buněk. Hydrogely na bázi polyvinylpyrrolidonu jsou vhodné také do opalovacích krémů nebo řasenek. Existují také masky které uvolňují biologicky aktivní látky jako jsou arbutin, adenosin a niacinamid, které ošetřují kůži proti vráskám.[4]

Bioadhezivní hydrogely umožňují delší dobu aplikace a tím udržují vysokou lokální koncentraci aktivní složky v okolních tkáních po delší dobu, což je důležité pro dosažení dlouhého dermálního účinku, a měly by působit až do hlubokých vrstev pokožky. Pro tvorbu hydrogelů mohou být použity různá síťovací činidla. Jedním z nejčastěji používaných gelujících činidel je karbomer, což je polymer kyseliny akrylové s vysokou molekulární hmotností.[22]

2.1 Bioaktivní látky v kosmetice

Hydrogely lze v kosmetice použít pro uvolňování řady látek, které zvyšují hydrataci, mají antioxidační a exfoliační účinky, působí proti vzniku vrásek, snižují photoaging apod. Nej důležitější z nich jsou stručně popsány v následujícím textu.

2.1.1 Hydroxykyseliny (AHA, PHA, BA)

Alfa-hydroxykyseliny (AHA): Jsou organické karboxylové kyseliny s jednou hydroxylovou skupinou v α poloze alifatické nebo alicyklické molekuly. Mnoho AHA je přítomno v potravinách a ovoci a proto se také označují jako ovocné kyseliny. Nejznámější patří kyselina glykolová, kyselina mléčná a kyselina citrónová. Van Scott a Yu objevili AHA v polovině 70. let při zkoumání léčby ischyosiformních poruch. [23] Zpočátku bylo zjištěno, že AHA mají hluboký účinek na keratinizaci a exfoliaci *stratum corneum*. Pozdější výzkum ukázal významné účinky proti stárnutí díky budování dermální matrice a do dnešní doby AHA zůstávají důležitými složkami péče o pleť. Objevem dalších hydroxykyselinových sloučenin jako jsou polyhydroxykyseliny (PHA) a bionové kyseliny (BA) došlo k jejich uplatnění nejen v péči o pokožku, ale také v dermatologických terapiích. [24]

Polyhydroxykyseliny (PHA):

Jsou strukturně podobné AHA, avšak mají v molekule dvě nebo více hydroxylových skupin, přičemž jedna z nich je v α pozici. Mnoho PHA jsou přirozeně se vyskytující endogenní metabolity lidského těla. Mezi nimi patří kyselina glukonová či glukolakton. Glukolakton

používaný v kosmetických prostředcích má podobné účinky jako kyselina glykolová, čili působí jako chelatační činidlo a dodává zvýšené hydratační a exfoliační účinky. Je kompatibilní s citlivou kůží, včetně růžovky a atopické dermatitidy. S přidavkem benzoylperoxidu nebo retinoidy působí proti akné. [24]

Bionické kyseliny (BA):

Bionické kyseliny se skládají ze dvou složek: polyhydroxykyseliny připojené k molekule cukru. Patří mezi nimi kyselina laktobionová a kyselina maltobionová. Kyselina laktobionová je tvořena kyselinou glukonovou (PHA), která je etherickou vazbou připojená ke galaktóze. Kyselina maltobionová je stejně připojená k molekule glukózy. Díky přítomnosti několika hydroxylových skupin mají BA hygroskopickou povahu. Snadno přitahují a zadržují vodu a mohou vytvářet gelovou matici. BA mají také antioxidační a chelatační vlastnosti. [24]

2.1.2 Retinoidy

Jsou sloučeniny odvozené od vitamínu A, které se používají k prevenci a léčbě stárnoucí pleti (photoaging) po celá desetiletí. Existují přírodní a syntetické retinoidy. V kosmetických přípravcích jsou využívány především v přírodní formě. [24]

Termín “retinoid“ označuje skupinu léčiv, která se váže a aktivuje receptory kyseliny retinové vyvolávající transkripční aktivaci genů reagujících s kyselinou retinovou, což vede ke specifické odezvě. Retinoidy jsou schopné vázat se na intranukleární retinoidní receptory a působit jako transkripční faktory. Přírodně se vyskytující retinoidy obsahují *all-trans*-retinol (vitamín A), *trans*-retinaldehyd (retinal) a kyselinu *all-trans*-retinovou (kyselina retinová, tretinoin). [24]

Retinol (Vitamín A):

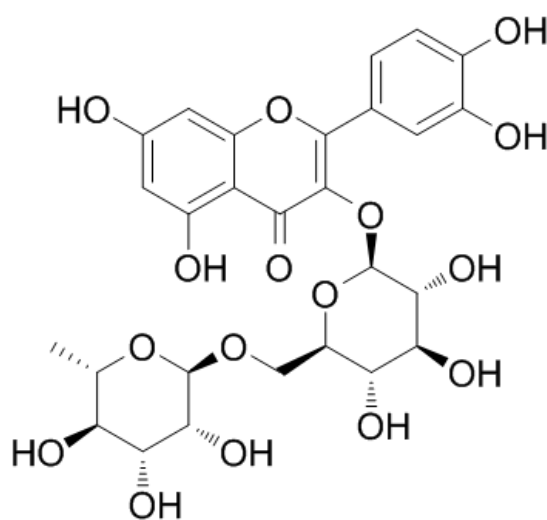
Vitamín A je dostupný ve volně dostupných kosmetických přípravcích. V kosmetických přípravcích jsou v koncentraci od 0,1 % do 1 %. Ve srovnání s kyselinou retinovou je retinol při nízkých koncentracích poměrně nedráždivý. Existují četné klinické studie, které prokazují klinické zlepšení kůže po aplikaci přípravků s různými koncentracemi retinolu, ale není jasné, zda má retinol v komerčně dostupných dávkách vlastnosti, které by působily na kolagen, a tím zlepšovali vzhled kůže. [24]

Kyselina retinová:

Je nejprobádanějším lokálním retinoidem a působí proti vzniku vrásek a proti stárnutí pleti. Kyselina retinová se váže a aktivuje receptor RAR- γ a vzniká při enzymatických reakcích, kde se jako první přeměňuje retinol na retinal reverzní oxidací a posléze dochází k jeho další oxidaci na kyselinu retinovou. V USA je k dispozici na lékařský předpis a existuje v krémových a gelových přípravcích. V komerčně dostupných dávkách existuje v koncentracích 0,025 %, 0,05 % a 0,1 %. Snižuje drsnost povrchu kůže, hyperpigmentaci a jemné vrásky a to díky histologickým změnám kompaktnosti ve *stratum corneum* a *stratum spongiosum* v epidermis. Vyšší koncentrace kyseliny retinové jsou však spojeny se zvýšeným podrážděním. [24]

2.1.3 Rutin

Rutin je chemická sloučenina patřící mezi bioflavonoidní glykosidy. Patří mezi flavonoidy (polyfenolické sloučeniny), jednu z důležitých tříd rostlinných chemikálií, které obsahují benzopyronovou skupinu, Obr. 2. V rostlinách je přítomno asi 4000 typů flavonoidů. Rutin (vitamín P) se nachází v rostlinách jako jsou mučenka, čaj a jablko, přičemž mezi nejvýznamnější zdroje rutinu patří pohanka. Jméno rutin pochází z rostliny Routy vonné, která také obsahuje rutin. Rutin je důležitou složkou potravy s řadou farmakologických účinků, včetně antioxidačních, cytoprotektivních, vazoprotektivních, antikarcinogenních, neuroprotektivních a kardioprotektivních.



Obr. 2. Chemická struktura rutinu

Rutin má řadu využití:

- léčba apoptózy vlasových folikulárních buněk za pomoci rutinu, spermidinu a zeaxantinu. Apoptóza vlasových folikulárních buněk je hlavní příčinou degradace vlasových folikulů. [25]
- antibakteriální účinky proti různým kmenům bakterií, prokázal například vysoký stupeň inhibice růstu bakterií *Escherichia coli*. Rutin obsažený v medu pak vykazuje inhibiční účinky na *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* a *Klebsiella sp.*. Byla rovněž zdokumentována antimikrobiální účinnost proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis* a antivirová účinnost pro léčbu infekcí způsobené retroviry, orthomyxoviry, herpes viry, hepatitidou B a C. [26] [25]
- účinky proti slunečnímu záření – účinky rutinu proti kožním zánětům indukovaným UVB byly zkoumány na myších *in vivo*. Rutin snížil epidermální hyperplazii a hladiny bílkovin a způsobil snížení UVB indukované exprese cyklooxygenázy-2 (COX-2) u myší. Ve studii, kterou provedli Choquet a kol. (2008), byl rutin zaveden do emulze olej-voda (koncentrace 10 % w/w). Hodnoty SPF (ochranný sluneční faktor) byly srovnatelné s chemickým slunečním filtrem homosalátem. Spolu s anorganickým TiO₂ se hodnoty přiblížily na 30. [27] [25]
- Atopická dermatitida – bylo prokázáno, že rutin potlačil alergickou kontaktní dermatitidu a také prokázal účinky proti stárnutí pokožky. Rutin by tedy mohl být považován za jednu z nejúčinnějších topicky aplikovaných sloučenin vzhledem k její antioxidační aktivitě a pronikání do kůže. [28] [25]
- hojení ran – rutin obsažený v hydrogelu byl aplikován na snížil velikost kožních lézí potkanů a oxidativního stresu v oblasti rány. Chitosanové hydrogely, které uvolňovaly rutin byly připraveny ve formě obvazu. Hydrogely byly použity pro hojení dermálních ran, protože podporují tvorbu neo-epitelu a silnější granulaci, která je podobná původní epitelární tkáni. [29] [25]

2.1.4 Vitamin C (kyselina L-askorbová)

Je ve vodě rozpustný vitamín, který je nezbytným přirozeným antioxidantem. Přestože většina rostlin a zvířat si dokáží syntetizovat vitamin C sami, lidé jej musí získat formou potravy. Je nejvíce obsažen v citrusových plodech a v listové zelenině. Je dobře vstřebáván ve střevech, ovšem při podání vysokých dávek vitaminu C se nezvyšuje jeho absorpce. Kosmetické přípravky obsahující vitamin C patřily mezi první, které vstoupili na trh. Jejich problém

byl v tom, že po vystavení vzduchu docházelo k rychlé oxidaci kyseliny L-askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a produkty zežloutly. Novější formulace obsahují chemicky modifikované formy kyseliny askorbové produkované esterifikací hydroxylové skupiny. Mezi tyto deriváty patří askorbylfosfát hořečnatý askorbylfosfát sodný, askorbyl-6-palmitát a askorbyltetraisopalmitát. Tyto deriváty jsou stabilnější než kyselina L-askorbová a z tohoto důvodu jsou pro kosmetické aplikace upřednostňovány. Produkty obsahující vitamin C zahrnují séra, pleťové vody a krémy. V mnoha produktech se vitamin C nachází v kombinacích s jinými antioxidačními látkami. Zvyšují fotoprotekci, snižují photoaging, zlepšují hyperpigmentaci a léčí akné. [24]

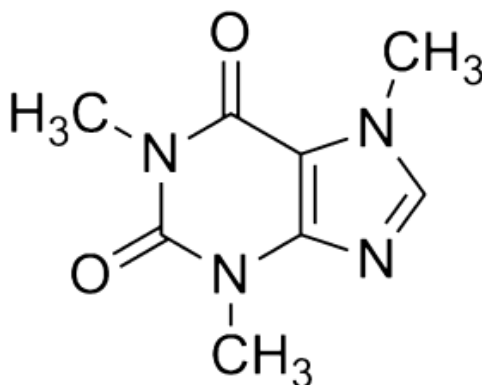
2.1.5 Nikotinamid (B₃)

Nikotinamid (niacinamid) je znám jako vitamín B₃. V těle se přeměňuje na kofaktory NADH a NADPH, které se podílejí na mnoha biochemických reakcích. Je přítomen v mnoha zdrojích jako například maso, ořechy, celozrnné výrobky, luštěniny, kvasnice. Existuje samozřejmě i několik komerčních zdrojů čistého vitamínu B₃. Nedostatek ve vodě rozpustného vitamínu způsobuje pelagru, což je chronické onemocnění, které zahrnuje dermatitidu a červené léze. Hladina NAD⁺ a NADPH v kožních buňkách klesá s věkem, proto doplnění tohoto vitamínu poskytuje zdravý vzhled pokožky. Nikotinamid ovlivňuje širokou škálu metabolických cest a některé z nich ovlivňují kožní funkce. Například NADPH je kofaktor v syntéze mastných kyselin a složitějších lipidů, jako jsou ceramidy. Bylo zjištěno, že NADH inhibuje některé enzymy podílející se na syntéze glykosaminoglykanů (GAG) *in vitro*. Proto je úloha nikotinamidu je důležitá v souvislosti s nárůstem ceramidů ve *stratum corneum*, zlepšení kožní bariéry a snížení přebytku dermálních GAG a tím zabránění tvorby vrásek. Dochází také ke snížení výskytu hyperpigmentovaných skvrn, zarudnutí, žloutnutí, tvorby povrchového kožního mazu, zmenšení velikost pórů, a zlepšení struktury povrchu kůže a redukci vrásek. Kromě toho dochází ke zlepšení hydratace, integrity a elasticity bariéry *stratum corneum*. Dermatologické účinky nikotinamidu byly pozorovány při testování na člověku a výsledkem bylo zlepšení akné a bulózního pemfigoidu a zlepšení bariérových vlastností kůže u *rosacei* neboli růžovky. Nikotinamid může být použit ve vyšších dávkách topicky (nejméně do 5 %) a je dobře snášen, avšak v některých vzácných případech bylo pozorováno mírné podráždění kůže. [24]

2.1.6 Rostlinné extrakty

Rostlinné přípravky jsou obsaženy v široké škále výrobků pro péči o pokožku a osobní péči. Používají se na léčebné terapie u poruch jako je akné, melasma a růžovka. Mezi nejčastěji používanými rostlinami jsou extrakty z borové kůry, *Coffea arabica*, granátové jablko, tea tree olej, extrakty ze semen hroznů. [24]

Kofein: (1,3,7-trimethylpurin-2,6-dion) je alkaloid methylxanthinu, Obr. 3, který je konzumován jako nápoj, podáván jako lék nebo aplikován pro kosmetické účely. Hlavní cestou proniknutí aktivní látky kůží je prostřednictvím obsahu lipidů ve *stratum corneum*. Kofein nemá ideální vlastnosti pro penetraci kůží do organismu, protože je hydrofilní, vykazuje neobvyklé chování při rozpouštění v nevodných rozpouštědlech a tvoří agregáty ve vodných rozpouštědlech. Na druhou stranu, kofein výborně permeuje přes potní žlázy, vlasové folikuly s mazovými žlázami a póry vytvářejícími různé otvory (kanálky) na vnějším povrchu kůže. Vlasové folikuly jsou protkány krevním řečištěm a lymfatickým systémem, který zajišťuje penetraci aktivní látky a poskytuje přístup k dermální mikrocirkulaci. Výsledky permeace kofeinu lidskou kůží v oblasti hrudníku potvrdily, že téměř jedna třetina sloučeniny byla absorbována folikulární cestou. [30]



Obr. 3. Chemická struktura kofeinu

Kofein je stimulantem centrální nervové soustavy a může vyvolat bdělost a zvýšenou duševní aktivitu. Může také zvýšit rychlost a hloubku dýchání. Hlavní výhody pro použití kofeinu v topických kosmetických přípravcích spočívají v tom, že zabraňuje nadměrnému hromadění tuků v kůži, podporuje lymfatický systém a chrání pokožku před světelným zářením (photodamage). Většina těchto studií je podložena na modelech buněčných kultur nebo na myších. [31]

3 METODY STUDIA HYDROGELŮ

Hydrogely mohou být charakterizovány pomocí řady technik, především mikroskopických, spektroskopických a kalorimetrických. Při charakterizaci hydrogelů je zásadní charakterizovat jejich morfologii, parametry sítě, mechanické a viskoelastické vlastnosti a také jeho biokompatibilitu/cytotoxicitu, je-li hydrogel využíván jako biomateriál. Je-li navíc využíván i pro transport biologicky aktivních látek jako v této práci, je nutné charakterizovat také kinetiku jejich uvolňování.

3.1 Morfologie

Morfologické studie hydrogelů poskytují informace o jejich struktuře a povrchových charakteristikách jako je přítomnosti pórů jejich tvar a velikost.

3.1.1 Specifický povrch

Pro měření specifické plochy povrchu materiálů se používá BET izoterma, formulovaná v roce 1938 S. Brunauerem, P.H. Emmettem a E. Tellerem. [32] Měření je založeno na absorpci plynu na povrchu odplyněného pevného materiálu sledováním absorbovaného množství plynu o známých parametrech za různého tlaku. V průběhu času je tak zaznamenávána adsorpční (desorpční) izoterma jako závislost adsorbovaného (desorbovaného) množství plynu na změně tlaku při konstantní teplotě. Nejčastěji se měření provádí s dusíkem. [32] [33] Tuto metodu lze považovat za první stupeň v charakteristice mikroporézních a mezoporézních pevných látek. Principem je předpoklad, že sorpce molekul plynu na povrch uvolní adsorpční teplo. Každá následující vrstva molekul plynu, která dosedne na vrstvu pod sebou vyvolá interakci molekula-molekula a uvolní kondenzační teplo. BET izoterma má rovnici [34] [35] :

$$\frac{\rho}{a(\rho_0 - \rho)} = \frac{1}{a_{max} \times C} + \frac{C-1}{a_{max} \times C} \times \frac{\rho}{\rho_0} \quad (1)$$

Kde ρ a ρ_0 je rovnovážný a saturační tlak (Pa), a je absorbované množství molekul při dané teplotě a tlaku (mol/g), a_{max} je absorbované množství plynu po vytvoření monovrstvy (mol/g), C je tzv. BET konstanta.

3.1.2 Porozita

Přítomnost pórů v hydrogelových matricích umožňuje přenos velkého množství biologicky aktivních látek a současně určuje rychlost uvolňování dané látky. V této souvislosti by měla být velikost pórů volena podle zamyšlené aplikace. [4]

Měření velikosti pórů lze provádět pomocí různých metod. Nejčastějším způsobem je rastrovací elektronová mikroskopie SEM (Scanning Electron Microscopy), někdy také nazývaná jako řádkovací elektronový mikroskop. Principem metody je vysílání urychleného primárního elektronového svazku na vzorek řádek po řádku, přičemž odražený paprsek generuje signály, jejichž matematickou úpravou lze získat informace o povrchu vzorku. Charakter povrchu vzorku ovlivňuje úroveň signálu v detektoru. Rozlišujeme čtyři skupiny elektronů, které opouštějí povrch vzorku. Prvními z nich jsou zpětně odražené elektrony, které poskytují informaci o topografii vzorku a o materiálovém složení. Jejich rozlišovací schopnost je 50-200 nm. Druhou skupinou jsou sekundární elektrony, které poskytují informaci převážně topografickou a jejich rozlišovací schopnost je 5-15 nm. Třetí skupinou jsou Augerovy elektrony, které jsou vyraženy z různých elektronových hladin materiálu a zjištěním jejich energie lze provádět prvkovou neboli kvalitativní analýzu. Poslední skupinou jsou primární elektrony, které mají rozlišovací schopnost 0,5 nm. [36] Před analýzou se vzorky obvykle upravují lyofilizační technikou, kryofrací nebo fixací v pryskyřici. Pokud je vzorek elektricky nevodivý, je nutné jej pokovit. [4]

Dalším způsobem měření velikosti pórů je tzv. rentgenová mikrotomografie. Je založena na prozařování zkoumaného vzorku paprsky rentgenového záření. Rentgenové záření vychází ze zdroje a prochází skrz zkoumaný vzorek do detektoru, který vyhodnocuje jeho intenzitu. Rotací zkoumaného objektu v tomografu a postupném prozařování objektu rentgenovým zářením pod jednotlivými úhly se získá rentgenová projekce vzorku ze všech úhlů. Z detektoru vychází elektrický signál, který je pomocí kamery převáděn na digitální a díky tomu můžeme vidět vnitřní strukturu zkoumaného vzorku. [37]

Termoporometrie s použitím diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) zase umožňuje stanovení velikosti pórů a distribuce kapaliny. Princip této techniky je založen na snížení teploty tání nebo krystalizace kapaliny uzavřené v póru. DSC odhaluje póry pod 200 nm, a to i když jsou v malém množství, zatímco větší póry jsou snadněji viditelné pomocí SEM. [4]

Metoda stanovení porozity pomocí rozpouštědla může být také použita pro analýzu porézности hydrogelu. Vysušené hydrogely se ponoří do rozpouštědla přes noc (např. absolutní

ethanol) a zváží se po odstranění přebytku rozpouštědla na povrchu. Porozita může být vypočtena z následující rovnice [4]:

$$\text{Porozita} = (M_2 - M_1) / \rho \times V \quad (2)$$

Kde M_1 a M_2 jsou hmotnosti hydrogelu před a po ponoření do rozpouštědla; ρ je hustota rozpouštědla a V je objem hydrogelu.

3.2 Parametry sítě

Schopnost hydrogelů zadržet vodu je dána přítomností hydrofilních skupin v polymerních řetězcích, např. aminoskupin, karboxylových nebo hydroxylových skupin. Množství vody přítomné v hydrogelu se může pohybovat od několika procent až do mnohonásobku jeho vlastní hmotnosti. Způsob bobtnání se liší v závislosti na chemické struktuře polymeru podle typu polymeru, stupně zesílení a kompatibility. [4]

Bobtnání, stejně jako další vlastnosti hydrogelů závisí na parametrech hydrogelní sítě. Mezi ně patří například průměrná molekulová hmotnost mezi uzly sítě (M_c) a hustota sítě (ρ_c), kterou lze vypočítat pomocí rovnovážné teorie bobtnání (equilibrium swelling theory), kterou navrhl Flory a Rehner. [38] Nejdůležitější parametry jsou vyjádřeny v následujících rovnicích: [15]

- 1) Procentuální zbobtnání, kde M_t je hmotnost zbobtnalého hydrogelu v čase t , a M_0 je počáteční hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu.

$$\text{Procentuální zbobtnání (\%)} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

- 2) Obsah vody v rovnovážném stavu zbobtnání (equilibrium water content, EWC), který popisuje maximální množství vody absorbované hydrogelem. M_s je hmotnost vzorku zbobtnaného při rovnovážných podmínkách a M_0 je hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu.

$$\text{EWC (\%)} = \frac{M_s - M_0}{M_s} \times 100 \quad (4)$$

- 3) Gelová frakce, kde M_0 je hmotnost vysušeného hydrogelu po extrakci rozpustné frakce v hydrogelu a M_{int} je hmotnost suchého a nevypraného hydrogelu.

$$\text{Gelová frakce (\%)} = \frac{M_0}{M_{int}} \times 100 \quad (5)$$

- 4) Průměrná molekulová hmotnost mezi uzly sítě M_c , kde M_n je průměrná číselná molekulová hmotnost výchozího nezesítěného polymeru, \bar{v} je specifický objem polymeru, V_1 je molární objem vody, $V_{2,s}$ je objemový podíl polymeru a χ_1 je parametr interakce polymer-rozpouštědlo.

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\left(\frac{\bar{v}}{V_1}\right) \left[\ln(1-V_{2,s}) + V_{2,s} + \chi_1(V_{2,s})^2 \right]}{\left[(V_{2,s})^{\frac{1}{3}} - \frac{V_{2,s}}{2} \right]} \quad (6)$$

- 5) Objemová frakce polymeru ($V_{2,s}$), kde M_s/M_0 je hmotnostní poměr suchého a nabobtnaného hydrogelu při rovnováze, ρ_p je hustota polymeru a ρ_w je hustota vody.

$$V_{2,s} = \left[1 + \frac{\rho_p}{\rho_w} \left(\frac{M_s}{M_0} - 1 \right) \right]^{-1} \quad (7)$$

- 6) Výpočet hustoty sítě (ρ_c)

$$\rho_c = \frac{1}{\bar{v}M_c} \quad (8)$$

- 7) Velikost ok sítě (ξ)

$$\xi = V_{2,s}^{-1/3} (\bar{r}_0^2)^{1/2} \quad (9)$$

3.3 Viskoelastické vlastnosti

Hydrogely mohou vykazovat při napětovém namáhání jak elasticitu (vratnou deformaci) tak plasticitu (nevratnou deformaci). Informace o tom, jak se materiály deformují při působení vnějších sil poskytují reologická měření. Zjednodušeně řečeno, charakterizují nakolik je hydrogel „tekutý“ nebo naopak „tuhý“. Z reologického hlediska jsou hydrogely typickým příkladem tzv. viskoelastických materiálů. Přístroj na měření viskoelastických vlastností se nazývá reometr. Reometr je schopen měřený vzorek mechanicky deformovat otáčením rotujícího senzoru o různé geometrii (válec, kužel, deska) s různou rychlostí a silou, nebo je mechanický podnět vyvolán oscilačním pohybem senzoru s různou intenzitou. [39] [40]

Reologické vlastnosti hydrogelů se hodnotí hlavně technikou oscilačního smyku s malou amplitudou. Malé množství vzorku je umístěno mezi paralelní disky a torzní kmitání s malou amplitudou vytváří smykový tok ve vzorku. [39]

Chování viskoelastických materiálů popisují tyto rovnice [41]:

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \cos(\omega t + \delta) \quad (10)$$

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega t) \quad (11)$$

Kde σ je napětí, σ_0 je amplituda napětí, $\varepsilon(t)$ je poměrná deformace v čase, ε_0 je poměrná deformace, t je čas, ω je kruhová frekvence a δ je fázový posun.

Viskoelastický materiál se nachází mezi ideálně elastickými a viskózními materiály. Při harmonickém namáhání se část vložené mechanické energie spotřebuje při odlehčení materiálu a zbytek mechanické energie se nevratně přemění na jinou formu energie. Fázový posun mezi napětím a poměrné deformaci leží v intervalu $\delta = (0, \pi/2)$. [41]

Rovnici (10), které popisuje časovou závislost napětí při harmonickém namáhání u viskoelastických materiálů, lze upravit na: [41]

$$\sigma = G' \cdot \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) + G'' \cdot \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega \cdot t + \pi/2) \quad (12)$$

Kde G' je reálná složka komplexního (dynamického) modulu pružnosti v tahu materiálu (Youngův model pružnosti v tahu) a G'' je imaginární složka komplexního modulu pružnosti v tahu materiálu, neboli ztrátový modul. Dynamický modul charakterizuje pevnostní vlastnosti materiálů, ztrátový modul tlumící vlastnosti materiálů. Obě složky jsou funkcí frekvence kmitání při harmonickém namáhání a jsou vyjádřeny rovnicemi [41]:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cdot \cos\delta, \quad (13)$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cdot \sin\delta \quad (14)$$

Z těchto rovnic můžeme vyjádřit komplexní modul pružnosti G^* , který se skládá z dynamické a ztrátové složky [41]:

$$G^* = G' + i \cdot G'' \quad (15)$$

Pokud je modul G' vyšší než G'' , hydrogelová struktura je neporušená, materiál se chová pevně, což naznačuje, že je vysoce strukturovaný. Naopak viskóznější chování je definováno hodnotami G'' vyššími než jsou hodnoty G' . Poměr těchto dvou modulů určuje míru převahy elastického resp. viskózního charakteru a jeho deformační chování. [4] [42]

Dále můžeme určit činitele vnitřního tlumení η [41]:

$$\eta = \frac{G''}{G'} = \operatorname{tg}\delta \quad (16)$$

Činitel vnitřního tlumení η je vyjádřen jako poměr ztrátového modulu k jeho dynamického modulu pružnosti. Je to bezrozměrná veličina, která slouží k popisu materiálů z hlediska schopnosti tlumení mechanických vibrací. Velikost činitele vnitřního tlumení závisí na velikosti fázového posunu. Při fázovém posunu, který se přibližuje k hodnotě 0 převažují elastické vlastnosti a při hodnotách fázového posunu, který se přibližuje k hodnotě $\pi/2$ převažují tlumící vlastnosti viskoelastických materiálů.

3.4 Uvolňování látek z hydrogelu

Povrch hydrogelů je podobný k živé tkáni, může absorbovat a zadržovat biologické tekutiny, je permeabilní pro malé molekuly, jako je kyslík, živiny a metabolity. Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti hydrogelů proto umožňují jejich aplikaci v lokálních systémech podávání léčiv nebo biologicky aktivních látek. Uvolňování léků nebo bioaktivních látek může být řízeno přizpůsobením struktury a velikosti pórů hydrogelu, což určuje rychlost difúze látek z hydrogelové matrice. Hydrogely složené z polymerů obsahujících iontové skupiny jsou nejpoužívanější složkou systémů reagujících na stimuly, přičemž jejich stupeň nabobtnání závisí na faktorech jako je pH, iontová síla či teplota.

Existuje celá řada metod jak sledovat proces uvolňování aktivní látky, především pomocí změny složení média do kterého je vzorek ponořen a látka uvolňována. Změna složení může být stanovena například pomocí metody UV-VIS za předpokladu, že uvolňující látka absorbuje v této oblasti. [43]

UV-VIS spektrofotometrie

Je fyzikálně-chemická metoda, která se řadí mezi molekulovou absorpční spektrometrii. Rozsah sledovaných vlnových délek je v rozmezí 200-800 nm. Pokud látky absorbují záření o vlnové délce menší než 380 nm, jedná se o ultrafialové záření, které je pro lidské oko neviditelné, protože oblast viditelného světla se nachází v rozsahu vlnových délek 380-770 nm. Metoda je založená na principu měření energie záření pohlcené při jeho průchodu vzorkem. Při absorpci elektromagnetického záření molekulou dochází ke změně elektronového stavu daného vzorku a molekula přejde ze základního stavu do stavu excitovaného. [44]

Měření absorpce v oblasti UV-VIS spektra je možné pomocí různých typů přístrojů, které mají různé způsoby měření. Patří sem kolorimetrie, fotometrie a spektrofotometrie. Nejčastěji se používá spektrofotometrie, která umožňuje získat spektra ve viditelné i ultrafialové

oblasti. Měřením jsou získána absorpční spektra, která graficky znázorňují závislost absorpance na vlnové délce záření. Závislost absorpance na koncentraci a tloušťce kyvety je popsána rovnicí odvozená z Lambertova-Beerova zákona [45]:

$$A = \varepsilon \times c \times d \quad (17)$$

Kde A je absorpance, ε je molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c je látková koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a d je délka kyvety (cm).

3.5 Biokompatibilita

Hlavním účelem provádění zkoušek biokompatibility je stanovit vhodnost hydrogelů pro medicínské či farmakologické použití. Testy cytotoxicity hydrogelů se provádějí dle směrnice ČSN EN ISO 10993. V této směrnici jsou uvedeny tři kategorie zkoušek: zkouška extraktu, zkouška přímého kontaktu a zkouška nepřímého kontaktu. Typ testu se volí na základě materiální povahy a místa aplikace zkoušeného hydrogelu. Výsledky, které jsou obvykle vyjádřeny hodnotou tzv. inhibiční koncentrace IC_{50} (inhibition concentration), což je koncentrace látky při níž dochází k omezení růstu buněk *in vitro* z 50 %, jsou interpretovány podle ČSN EN ISO 10993. Jednou z metod vyhodnocování buněčné viability je MTT test. Principem této metody je, že na rozdíl od neživých buněk, živé buňky dokáží pomocí enzymů mitochondriální dehydrogenázy přeměnit thiazolovou sůl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na ve vodě nerozpustné fialovo-modré krystalky formazanu, který se následně rozpustí v DMSO (dimethylsulfoxid). Množství formazanu se stanoví za použití spektrofotometru při absorpanci 570 nm. [4] [46]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit PVA/DAC hydrogely a optimalizovat jejich vlastnosti pro případné kosmetické aplikace pomocí PVA o různé molekulové hmotnosti a různého množství síťovacího činidla a charakterizovat je na základě fyzikálně-chemických metod, především stanovením parametrů sítě, porozity a stupně bobtnání. Kromě toho byly hydrogely nasyceny biologicky aktivními látkami – rutinem a kofeinem. Byla také studována kinetika jejich uvolňování a provedeny testy cytotoxicity a transdermální absorpce přenášených látek.

5 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE DAC A PVA/DAC HYDROGELŮ

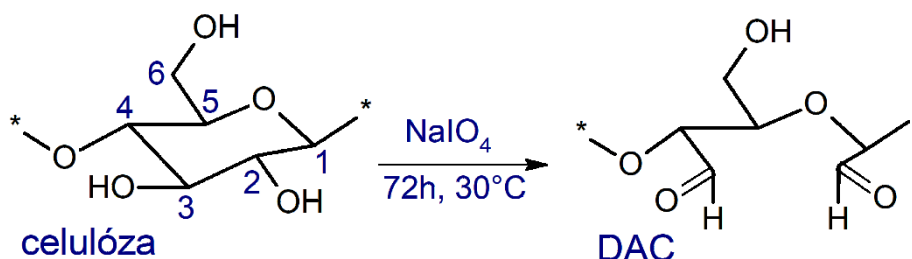
5.1 Použité materiály

Polyvinylalkohol se stupněm hydrolyzy 88 % (Mowiol 18-88) a $M_w = 130$ kDa, polyvinylalkohol se stupněm hydrolyzy 88 % (Mowiol 4-88) a $M_w = 31$ kDa. α -celulóza (Sigma Aldrich Co.), jodistan sodný (NaIO_4) (Penta, Česká republika), ethylenglykol, hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, Česká republika). Připravené PVA/DAC hydrogely byly nasyceny rutinem a kofeinem (Sigma Aldrich Co.). Pro testy cytotoxicity byly použity buňky myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA). Jako kultivační médium pro NIH/3T3 bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko. 100 U/ml Penicilin/Streptomycinu (GE Healthcare HyClone, Spojené království) bylo přidán do médií. Pro promývání buněk byl použit fyziologický roztok (PBS, Invitrogen, USA). Buňky byly kultivovány na plastiku Techno (TPP, Švýcarsko), pro stanovení životaschopnosti buněk byl použit Tetrazolium kit (test proliferace buněk pomocí MTT, Duchefa Biochemie, Nizozemsko).

5.2 Příprava DAC a PVA/DAC hydrogelů

5.2.1 Příprava DAC

2,3-dialdehyd celulózy (DAC) byl připraven pomocí oxidace α -celulózy NaIO_4 za použití molárního poměru reaktantů 1:1,2 (DAC : jodistan). V prvním kroku bylo 10 g α -celulózy dispergováno ve 250 ml destilované vody obsahující 16,5 g NaIO_4 . Poté byla směs míchána na 250 RPM ve vodní lázni při 30 °C po dobu 72 h za nepřístupu světla (Obr. 4). Po uplynutí této doby byla oxidace zastavena přidávkem 10 ml ethylenglykolu a směs byla důkladně promyta a zfiltrována.



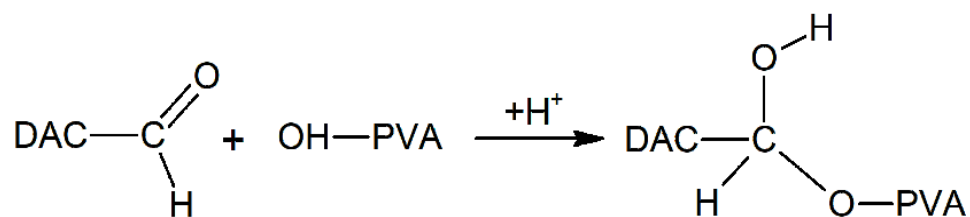
Obr. 4. Schéma syntézy DAC

Výsledná suspenze DAC byla rozpuštěna ve 175 ml destilované vody a solubilizována při 80 °C po dobu 7 h, [13] přičemž tříhrdlá baňka se směsí byla vybavena zpětným chladičem a ponořena do lázně ethylenglykolu. Teplota reakční směsi byla řízena teplotním čidlem. Po uplynutí doby byl téměř kompletně solubilizovaný DAC zchlazen, centrifugován (10 min, 10 000 RPM) a roztok převeden do 200 ml odměrné baňky. Hmotnostní koncentrace (c) solubilizovaného DAC byla stanovena na 42,3 mg/ml pomocí hmotnostní analýzy (3x3ml roztoku byly odpařeny a residuum zváženo). Následně bylo takto připravené DAC o známé koncentraci použito k síťování zvolených PVA matic.

5.2.2 Příprava PVA/DAC hydrogelů

V prvním kroku bylo po 10 g PVA o různé střední molekulové hmotnosti (M_w) rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Bylo použito PVA s $M_w = 31\,000$ g/mol a $M_w = 130\,000$ g/mol. Roztoky byly krátce zahřívány při 90 °C pro úplné rozpuštění PVA. Následně byl přidán katalyzátor (10 ml 1,33 M HCl) a definované množství DAC odpovídající 0,25 % a 1 % hmotnosti PVA.

Takto připravená reakční směs byla důkladně promíchána, aby byla dosažena úplná homogenizace všech reaktantů, a odlita do Petriho misek (d = 140 mm). Poté byla sušena při 30 °C do konstantní hmotnosti. Síťovací reakce mezi PVA a DAC totiž probíhá během sušení reakční směsi, kdy dehydratace DAC-CHO skupin umožní tvorbu hemiacetalů s hydroxylovými skupinami PVA. Schéma reakce mezi -CHO a -OH v kyselém prostředí je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5. Reakční rovnice mezi -CHO a -OH v kyselém prostředí

Po zesíťování byla větší část připravených xerogelů ve formě filmů vypírána destilovanou vodou po dobu dvou týdnů a následně z nich byly vysekány vzorky kruhového tvaru o průměrech 15 a 50 mm. Vysekaná tělíska byla dále uchována v aseptickém prostředí (70% roztok ethanolu). Menší část PVA/DAC byla ponechána v nevypraném stavu pro stanovení parametrů sítě. Přehled vzorků PVA/DAC připravených z PVA o různém M_w (31 kDa a 130 kDa) a s různým množstvím síťovadla (A = 0,25 hm% a B = 1 hm%) je uveden v Tab. 2.

Tab. 2. Připravené vzorky PVA/DAC

Značení	PVA (g)	Mw PVA (kDa)	DAC (hm%)	DAC (g)
A-31	10	31	0,25	0,025
B-31	10	31	1	0,1
A-130	10	130	0,25	0,025
B-130	10	130	1	0,1

U připravených hydrogelů byly následně zkoumány parametry sítě, provedeno měření viskoelastických vlastností, BET a SEM analýza, studována kapacita pro navázání léčiva a kinetika jeho uvolňování, testy toxicity a transdermální testy.

5.3 Stanovení parametrů sítě

Pomocí vysekávacího nože o průměru 15 mm bylo z každého z nevypraných xerogelů vyseknuto pět tělísek. Nevypraná tělíska byla zvážena a poté důkladně vyprána v destilované vodě po dobu jednoho týdne s pravidelným vyměňováním vody. Následně byla zbobtnalá tělíska zvážena a sušena při 30 °C do konstantní hmotnosti. Parametry sítě byly stanoveny na základě rovnovážné teorie bobtnání (equilibrium swelling theory), jejíž popis je uveden v kapitole 3.2. V případě PVA je specifický objem polymeru (\bar{v}) 0,788 cm³/g, molární objem vody (V_1) při 25 °C je 18,069 cm³/mol a parametr interakce polymer-rozpouštědlo (χ_1) je 0,464. [47]

5.4 Měření viskoelastických vlastností

Vyseknutá tělíska o průměru 15 mm byla v rovnovážném zbobtnalém stavu měřena pomocí reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Rakousko) vybaveného 15 mm zdrsňným hliníkovým plátem D-PP15 a na spodní podkladní desku byl přilepen brusný papír, aby bylo zamezeno prokluzování tělísek při měření. Měření se provádělo za laboratorní teploty. Rozmezí testovaných úhlových rychlostí bylo 1 až 10 Hz při konstantní deformaci 1 %. Měření bylo opakováno třikrát.

5.5 BET a SEM analýza

Lyofilizované PVA kryogely byly odplyněny při teplotě 75 °C po dobu 24 hodin. Specifický povrch (α_{BET}) PVA kryogelů byl stanoven s použitím povrchového analyzátoru Belsorp-mini II (BEL Japan Inc., Japonsko) analýzou vícebodových BET adsorpčních a desorpčních izo-

term zaznamenaných při teplotě 77 K. Stejně vzorky byly také analyzovány rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) za použití mikroskopu Nova NanoSEM 450 (FEI, Česká republika) při 5 kV urychlovacím napětí. Před SEM analýzou byly PVA hydrogely poprášeny nanočásticemi zlata-palladia, aby byl potlačen účinek akumulace náboje.

5.6 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a její uvolňování

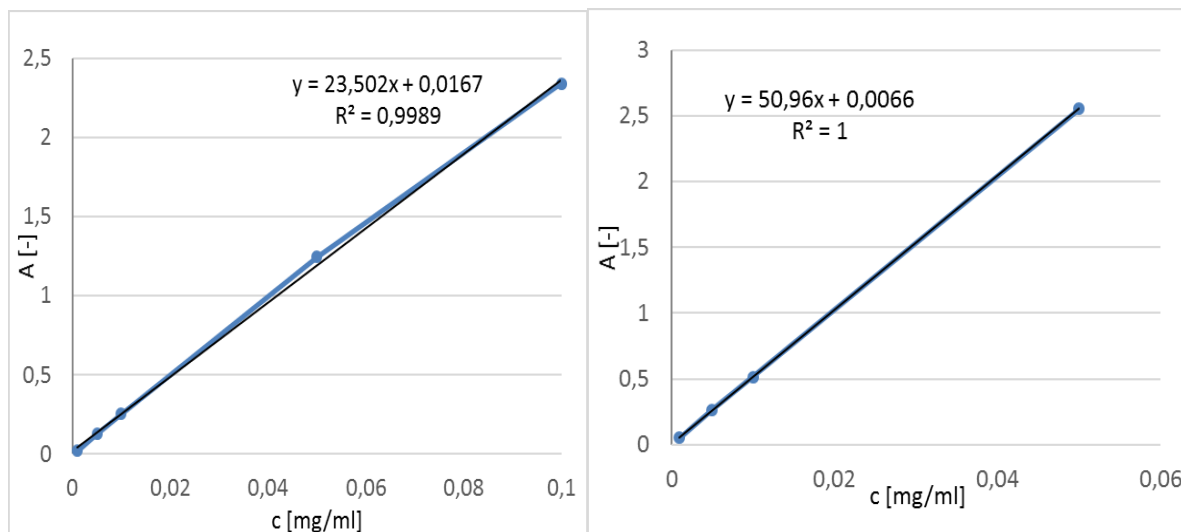
PVA hydrogely (B-31, A-130, B-130) o hmotnosti cca 500 mg a průměru 15 mm byly nasyceny roztokem zvolené biologicky aktivní látky, tedy buď rutinem a nebo kofeinem. V prvním kroku byl připraven zásobní roztok (500 ml) rutinu o koncentraci 0,1 mg/ml (rutin) nebo 10 mg/ml (kofein). Poté se PVA hydrogely umístily do reakčních nádob obsahujících 50 ml daného roztoku a byly třepány při 37 °C po dobu 72 h aby došlo k co nejvyššímu nasycení hydrogelů.

Takto připravené vzorky byly použity pro studium uvolňování biologicky aktivní látky. Pro tento účel byly tři vzorky z každého hydrogelu vloženy do uzavíratelných zkumavek s 10 ml destilované vody, které byly třepány při 37 °C za nepřístupu světla. V daných časových intervalech (po 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h a 96 h) se odebíralo 1 ml roztoku. Následně byl vždy přidán 1 ml destilované vody pro zachování konstantního objemu. Poté byly jednotlivé vzorky analyzovány pomocí UV-VIS spektrometru Perkin Elmer Lambda 1050 (Perkin Elmer 219 Inc., USA). Rozpětí vlnových délek rutinu bylo od 180 do 450 nm, u kofeinu od 200 do 325 nm. Kinetika uvolňování byla studována sledováním intenzity absorpčních pásů při 353 nm rutinu a u 273 nm kofeinu.

Pro zjištění množství uvolněné aktivní látky z připravených hydrogelových matric byly sestrojeny kalibrační křivky (Obr. 6), které byly získány pomocí roztoků rutinu a kofeinu o různých koncentracích (Tab. 3).

Tab. 3. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku

Rutin		Kofein	
c [mg/ml]	A 353 nm	c [mg/ml]	A 273 nm
0,1	2,3402	0,05	2,5545
0,05	1,2464	0,01	0,5148
0,01	0,2521	0,005	0,2659
0,005	0,1262	0,001	0,0546
0,001	0,02		



Obr. 6. Kalibrační křivky rutinu (vlevo) a kofeinu (vpravo)

5.7 Cytotoxicita

Pro stanovení cytotoxicity byla použita buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA). Extrakty ze vzorků A-130, B-130, B-31 byly připraveny podle ISO normy 10993-12 za použití 0,1 g hydrogelu na 1 ml média. Testované vzorky byly extrahovány v kultivačním médiu po dobu 24 hodin při 37 °C. Extrakty se pak zředily v kultivačním médiu na 75 %, 50 %, 25 %, 10 % a 1 % původní koncentrace. Samotné testování pak proběhlo podle postupu definovaného v ČSN EN ISO 10 993-5. Před zahájením experimentu byly buňky kultivovány po dobu 24 h. Připravená koncentrace buněk byla rozpipetována do 96-jamkových destiček (každá jamka obsahovala 100 μ l buněčné suspenze o koncentraci 10^5 buněk/ml). Extrakty byly aplikovány na buňky a destičky inkubovány po dalších 24 hodin. Celkem byly připraveny čtyři 96-jamkové destičky. Stanovení životaschopnosti buněk po expoziční době bylo provedeno pomocí MTT analýzy.

5.8 Transdermální uvolňování

V prvním kroku byla připravena receptorová kapalina (2 l), která se skládala z PBS (Phosphate-Buffered Saline) pufru (Biosera) a 0,05 % gentamicyn sulfátu (HiMedia Laboratories). Pro testování byla použita kůže z ušního boltce prasete. Vnitřní část boltce byla oholena a pomocí skalpelu oddělena od podkladové chrupavky. Z oddělené kůže byly následně vystříženy vzorky čtvercového tvaru o velikosti 3x3 cm. Vzorky kůže byly následně vloženy do cel a pomocí multimetru UNI-T UT71D byl měřen jejich odpor. Pomocí tohoto měření byla stanovena integrita kůže - byly vyloučeny vzorky s odporem pod 5 m Ω .

K takto připraveným vzorkům kůže byly přidány vzorky jednotlivých hydrogelů (A-130, B-130, B-31). Před vložením byly hydrogely vyjmuty z roztoku etanolu ve kterém byly dlouhodobě skladovány (aseptické prostředí) a intenzivně vypírány po dobu 1 týdne. Poté byly hydrogely nasyceny roztokem kofeinu (10 mg/ml) po dobu 120 h při 37 °C. Část loadovacího roztoku byla použita pro přípravu standardu pro transdermální testy – byl připraven roztok obsahující celkem 250 μ g kofeinu (25 μ l loadovacího roztoku bylo naředěno na objem 0.2ml). Testování proběhlo na přístroji PermeGear Fraction Collector FC33 (Německo), který je uveden na Obr. 7. Roztok byl jímán po dobu 24 h při konstantním průtoku 2ml/h.



Obr. 7. Přístroj na měření transdermální absorpce (vlevo), detail na permeační cely s prasečí kůží a vloženými vzorky (vpravo).

Po ukončení měření byly získané frakce (1 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h a 24 h) uchovávány při teplotě -20 °C až do doby analýzy. Poté byly jednotlivé vzorky zfiltrány přes 0,22 μ m

teflonový filtr. Takto připravené vzorky byly analyzovány metodou kapalinové chromatografie. Byl použit analytický přístroj HPLC chromatograf Breeze 1525 (Waters), analytická kolona Kinetex C18 100A (150 x 4,6 mm, 2,6 μm), mobilní fáze methanol (0,2 %), teplota 30 °C, průtok 0,7 ml/min, detektor UV-VIS při vlnové délce 272 nm.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na základě M_w PVA a množství DAC byly připraveny čtyři typy hydrogelů. U vzorků značených jako A-31 (Tab. 3) bylo provedeno jen stanovení parametru sítě, protože kombinace nízké koncentrace síťovadla a PVA s nízkou M_w vedla k přípravě jen velmi málo zesíťovaných hydrogelů, jejichž materiálové charakteristiky nedovolovaly jejich úplnou charakterizaci (hydrogely se při manipulaci rozpadaly). Ostatní tři typy hydrogelů byly následně charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických metod.

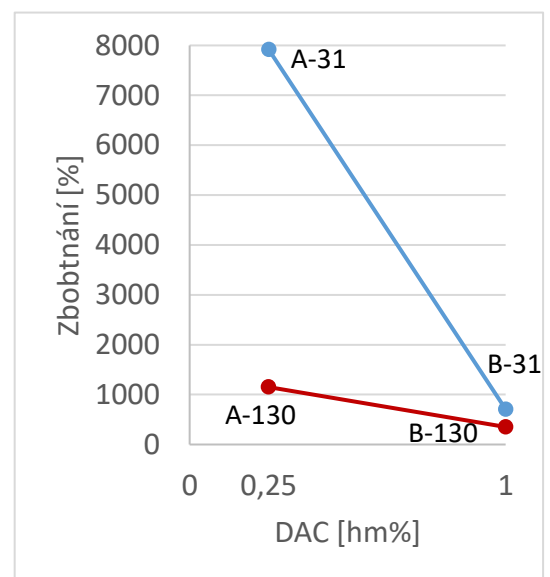
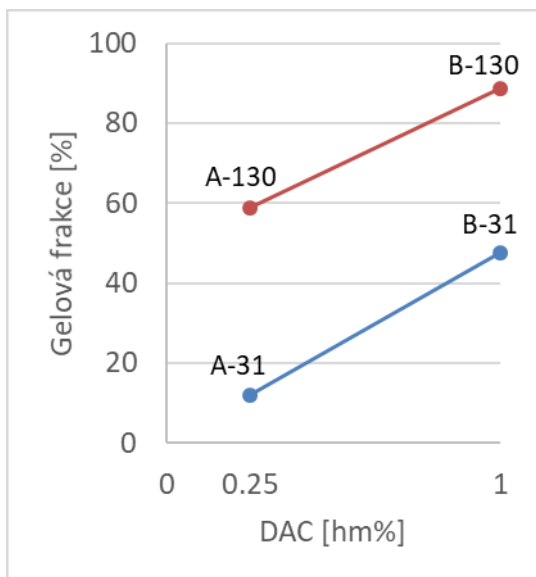
6.1 Parametry sítě

Na základě rovnic v kapitole 3.2 byly vypočítány parametry sítě různých typů PVA/DAC hydrogelů (A-130, B-130, A-31, B-31). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4. a jednotlivých grafech (Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10). Zbobotnění hydrogelových matic závisí na množství DAC a velikosti M_w PVA. Čím nižší je množství síťovadla a M_w PVA, tím více je hydrogel schopen vázat na sebe vodu a tím více zbobotňuje. To samé platí pro EWC (equilibrium water content), protože čím je daný hydrogel zesíťován méně a čím nižší je molekulová hmotnost použitého PVA, tím je obsah vody v rovnovážném stavu zbobotnění větší. Největší zbobotnění a EWC má tedy vzorek A-31, který je schopen zbobotnat do téměř 80-ti násobku své suché hmotnosti. Následují vzorky A-130, B-31 a nejméně bobtnající B-130, který nabyde jen přibližně 3.5x.

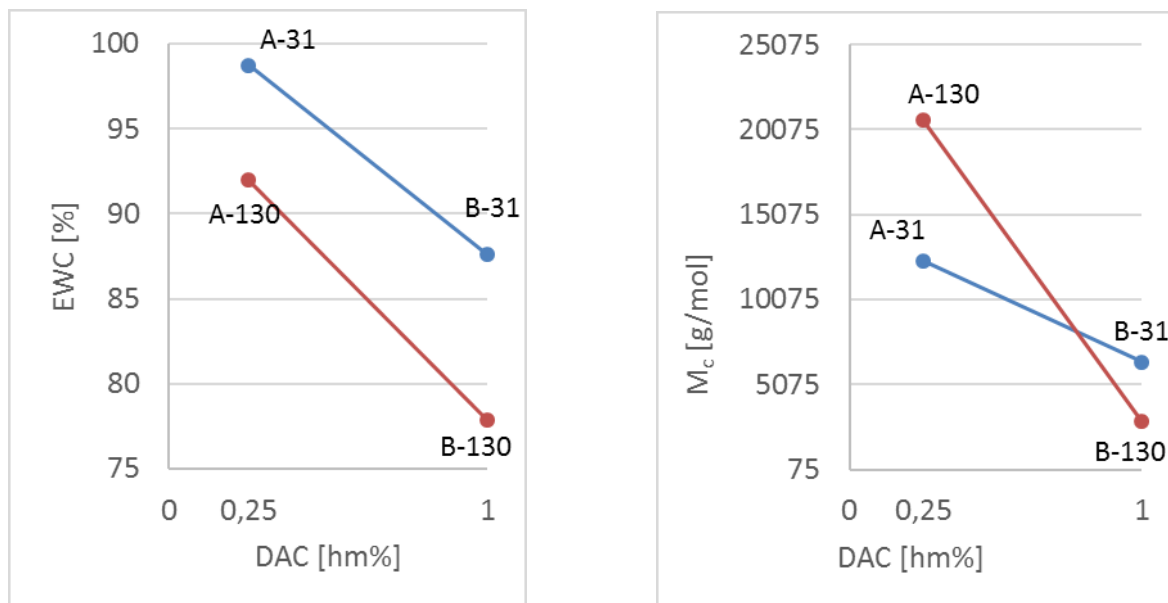
Se vzrůstajícím množstvím DAC a M_w PVA se naopak zvyšuje gelová frakce. V tomto případě vykazuje největší gelovou frakci vzorek B-130 a nejmenší vzorek A-31. Průměrná molekulová hmotnost mezi uzly sítě, M_c , roste se snižujícím se množstvím DAC. Tedy největší M_c bude mít vzorek A-31 oproti vzorku B-31 a vzorek A-130 oproti B-130. Hustota sítě ρ_c roste s použitím vyššího množství DAC (vzorek B-130 a B-31) ale také se snižujícím se M_w PVA. Velikost ok sítě PVA hydrogelu roste s nižší M_w PVA a se sníženým množstvím použitého DAC. Největší velikost ok sítě tedy vykazuje vzorek A-31, následuje vzorek A-130, B-31 a B-130.

Tab. 4. Vypočítané průměrné hodnoty parametru sítě

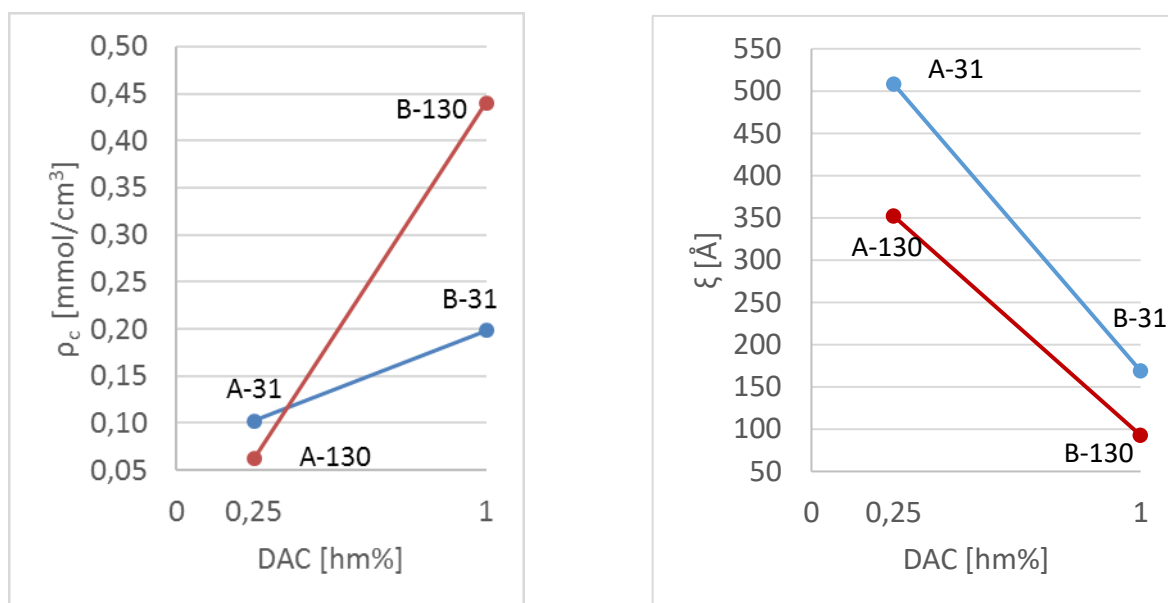
Vzorek	Zbobtnání [%]	EWC [%]	Gelová frakce [%]	M_c [g/mol]	ρ_c [mmol/cm ³]	Velikost ok sítě ξ [Å]
A-31	7918	99	12	12375	0,1025	508
B-31	707	88	48	6408	0,1981	169
A-130	1151	92	59	20659	0,0619	352
B-130	351	78	89	2886	0,4401	93



Obr. 8. Závislost gelové frakce a zbobtnání na množství DAC



Obr. 9. Závislost EWC a M_c na množství DAC



Obr. 10. Závislost hustoty sítě a velikost ok na množství DAC

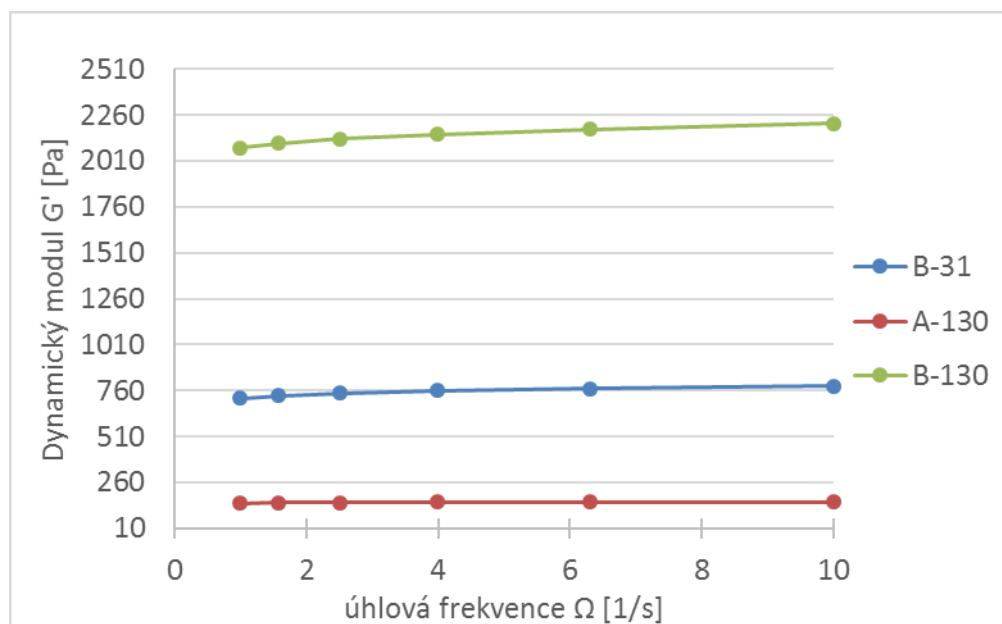
Celkově vzato, výsledky studia parametrů sítě ukazují vysokou závislost na použité PVA matici. V kombinaci s jejich závislostí na množství síťovadla pak také dovolují ovlivnit vlastnosti sítě hydrogelů ve velmi širokém rozsahu, což by měly reflektovat také jejich viskoelastické vlastnosti.

6.2 Viskoelastické vlastnosti

Vzorky A-130, B-130 a B-31 byly analyzovány pomocí reometru s frekvencí 1 Hz až 10 Hz při konstantní deformaci 1 %. Na Obr. 11 a Obr. 12 jsou znázorněny závislosti dynamického a ztrátového modulu na úhlové frekvenci. Číselné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 5 a 6.

Tab. 5. Naměřené hodnoty dynamického modulu

frekvence ω [1/s]	B-31		A-130		B-130	
	G' [Pa]	chyba [Pa]	G' [Pa]	chyba [Pa]	G' [Pa]	chyba [Pa]
1	718	4	147	2	2083	57
1,58	733	3	149	1	2107	58
2,51	747	3	151	1	2130	59
3,98	760	2	152	2	2157	56
6,31	772	2	154	2	2183	60
10	784	2	155	2	2213	68



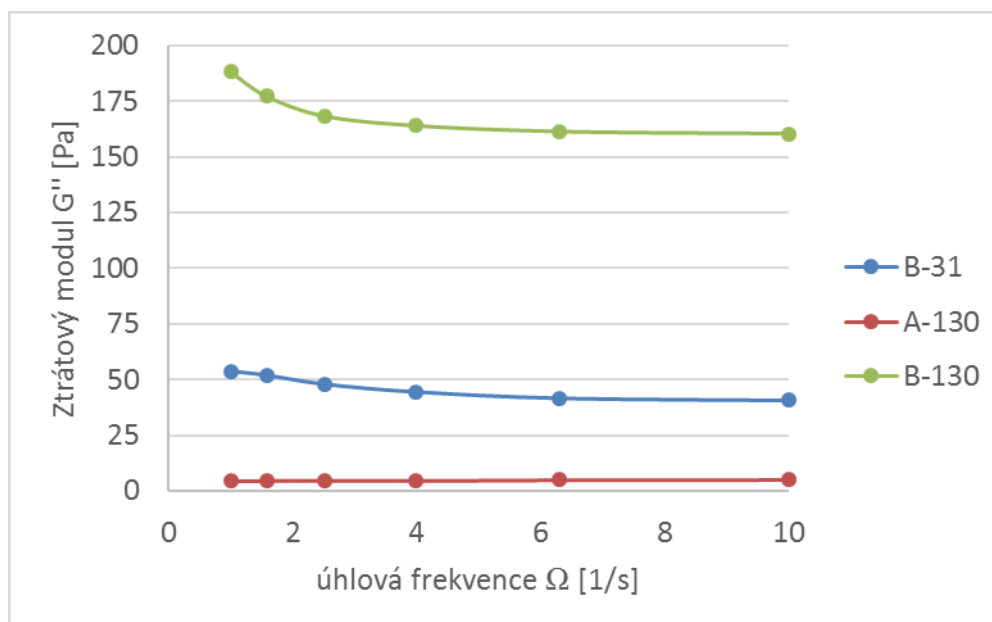
Obr. 11. Závislost elastického modulu na úhlové frekvenci

Jde vidět, že zdaleka nejvyšší dynamický G' modul je u vzorku typu B-130, který má také nejvyšší hustotu sítě (viz předchozí sekce). Mezní hodnoty dynamického modulu G' u PVA hydrogelů se pohybují v závislosti na frekvenci od (2213 ± 68) Pa u B-130 až po (147 ± 2) Pa u vzorku A-130. Totéž platí u ztrátového modulu G'' (Obr. 12) jejichž mezní hodnoty se pohybují v závislosti na frekvenci od (188 ± 8) Pa u B-130 až po (4,36 ± 0,01) Pa u vzorku A-130 (Tab. 5). Výsledky do jisté míry odpovídají očekáváním že G' (dynamický modul) a G'' (ztrátový modul) budou vyšší u hydrogelů, které obsahují větší množství síťovadla (řada

B). Hustší síť totiž bude mít vyšší elasticitu oproti řidší síti, která naopak bude více viskóznější. Opět byl tedy pozorován značný vliv M_w PVA.

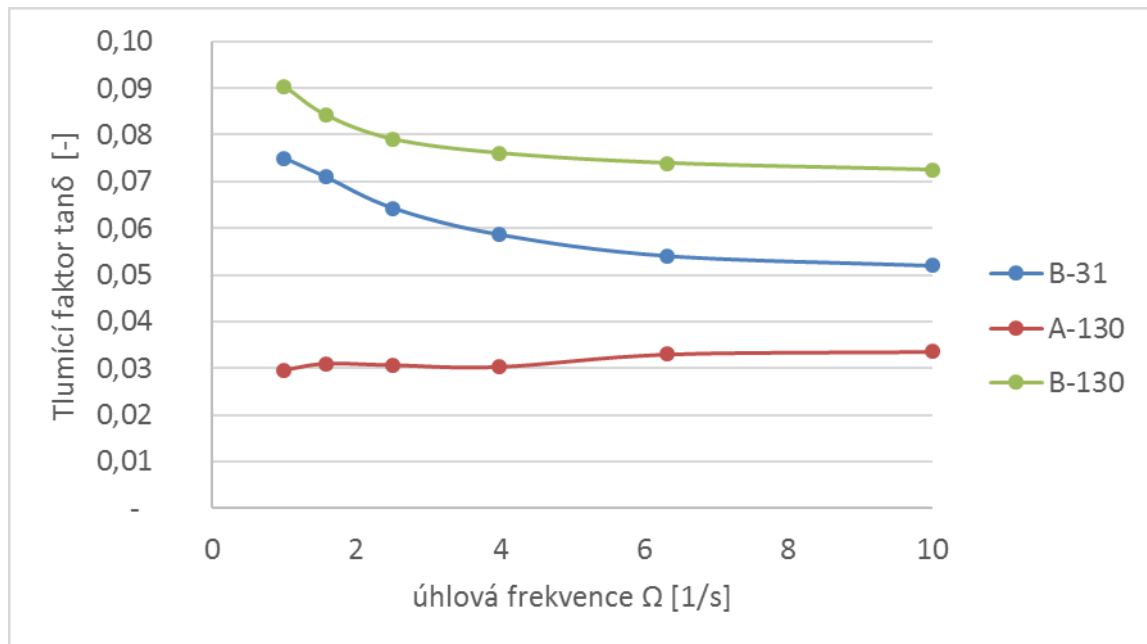
Tab. 6. Naměřené hodnoty ztrátového modulu

frekvence ω [1/s]	B-31		A-130		B-130	
	průměr G'' [Pa]	chyba [Pa]	průměr G'' [Pa]	chyba [Pa]	průměr G'' [Pa]	chyba [Pa]
1	54	2	4,36	0,01	188	8
1,58	52	2	4,61	0,34	177	7
2,51	48	2	4,62	0,47	168	6
3,98	45	1	4,61	0,54	164	5
6,31	42	1	5,07	0,36	161	5
10	41	1	5,21	0,73	160	6



Obr. 12. Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci

Závislost damping faktoru na úhlové frekvenci je zobrazena na Obr. 13. Damping faktor byl vypočítán jako poměr mezi ztrátovým G'' a dynamickým modulem G' . Udává míru tlumení mechanických vibrací materiálem. Hodnoty damping faktoru se pohybují od $(0,090 \pm 0,002)$ u vzorku B-130 až po hodnoty $(0,0296 \pm 0,0004)$ u vzorku A-130 (Tab. 7.)



Obr. 13. Závislost damping faktoru na úhlové frekvenci

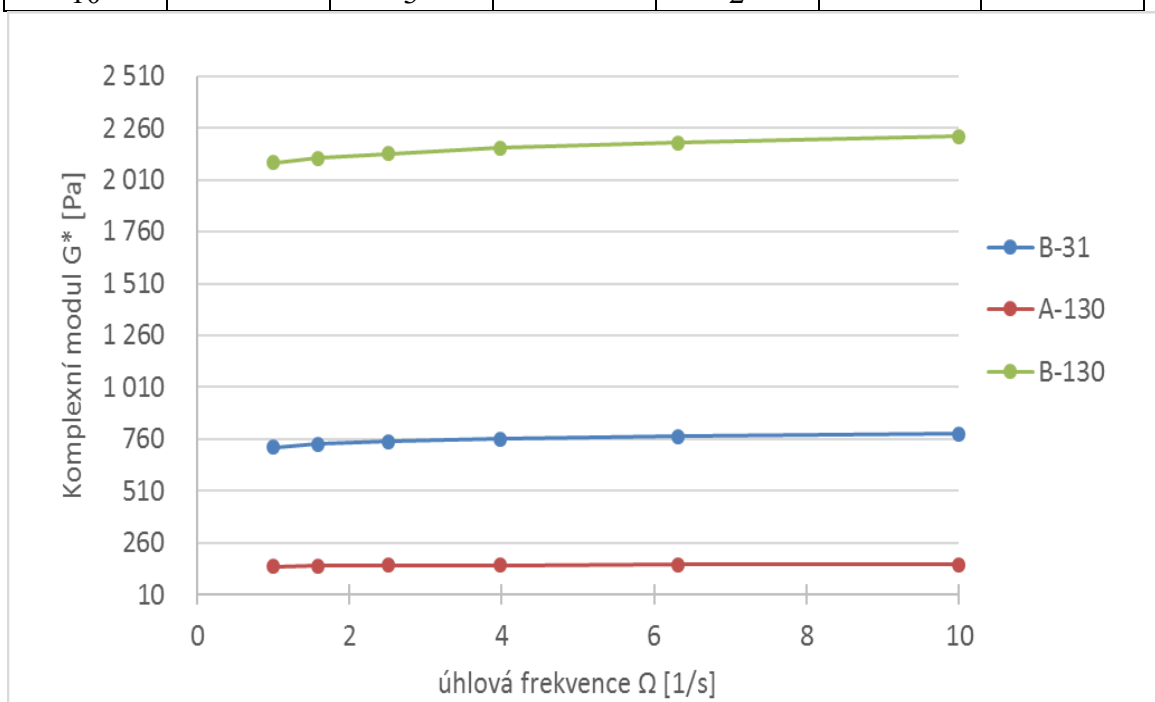
Tab. 7. Dopočítané hodnoty damping faktoru (tlumící faktor)

frekvence ω [1/s]	B-31		A-130		B-130	
	průměr tan δ [-]	chyba [-]	průměr tan δ [-]	chyba [-]	průměr tan δ [-]	chyba [-]
1	0,075	0,002	0,0296	0,0004	0,090	0,002
1,58	0,071	0,003	0,0310	0,0020	0,084	0,002
2,51	0,064	0,002	0,0307	0,0029	0,079	0,001
3,98	0,059	0,001	0,0303	0,0032	0,076	0,001
6,31	0,054	0,001	0,0330	0,0020	0,074	0,001
10	0,052	0,001	0,0336	0,0046	0,072	0,001

Závislost komplexního modulu G^* na úhlové frekvenci je znázorněna na Obr. 14. Komplexní modul byl vypočítán jako čtverec odmocniny součtu dynamického a ztrátového modulu. Výsledky jsou podobné těm získaným pro elastický modul (Obr. 11). Rozsah hodnot komplexního modulu G^* se pohybuje od (2219 ± 68) Pa u B-130 až po (147 ± 2) Pa u vzorku A-130 (Tab. 8). To znamená, že pružnost hydrogelů závisí hlavně na množství síťovadla a koreluje s vypočtenými hodnotami hustoty sítě.

Tab. 8. Dopočítané hodnoty komplexního modulu

frekvence ω [1/s]	B-31		A-130		B-130	
	průměr G^* [Pa]	chyba [Pa]	průměr G^* [Pa]	chyba [Pa]	průměr G^* [Pa]	chyba [Pa]
1	720	4	147	2	2 092	58
1,58	735	3	149	1	2 114	58
2,51	749	3	151	1	2 137	59
3,98	761	2	152	2	2 163	56
6,31	773	2	154	2	2 189	60
10	785	3	155	2	2 219	68



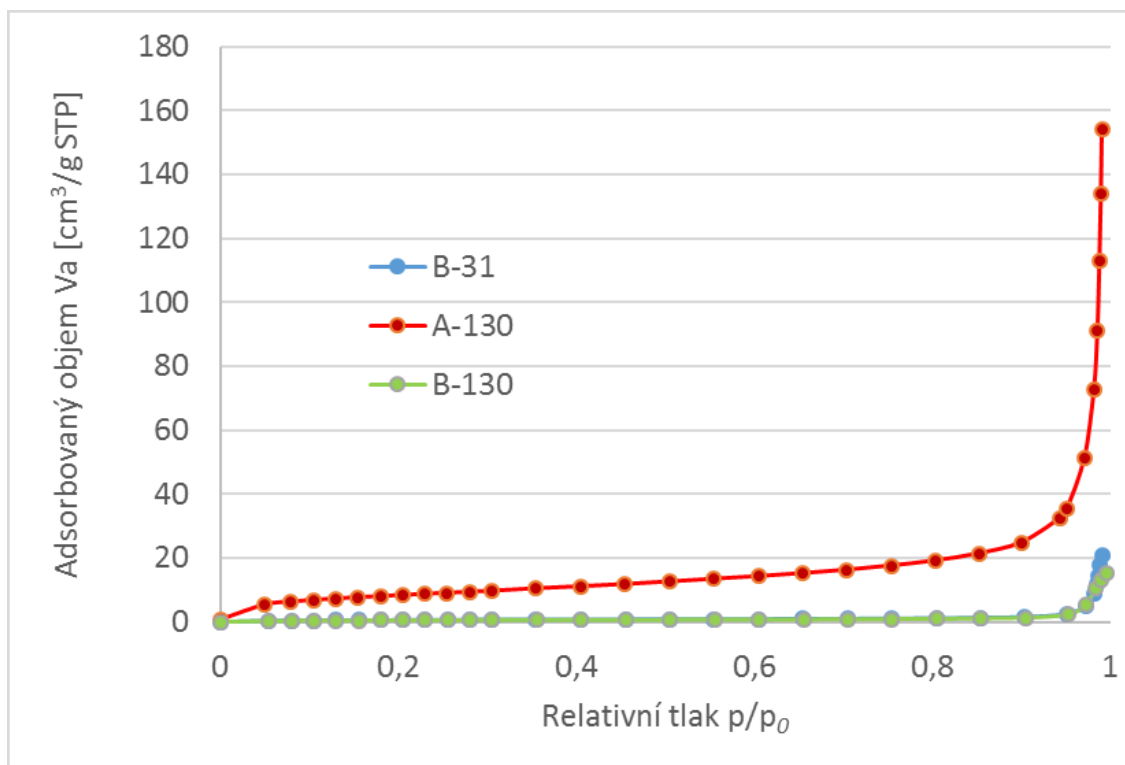
Obr. 14. Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci

Na základě zjištěných údajů můžeme konstatovat, že nejvíce viskózním a nejméně elastickým materiálem se jeví vzorek A-130, který je z testovaných vzorků nejméně zesítěný. Naopak nejvíce zesítěný vzorek B-130 je nejvíce elastický. Vzorek B-31 se pohybuje mezi vzorkem A-130 a B-130 a svým chováním má často blíže k A-130 než k B-130, který byl připraven se stejným množstvím síťovadla. Výsledky tak dokládají značný vliv použité PVA matrice na vlastnosti hydrogelu.

6.3 BET a SEM analýza

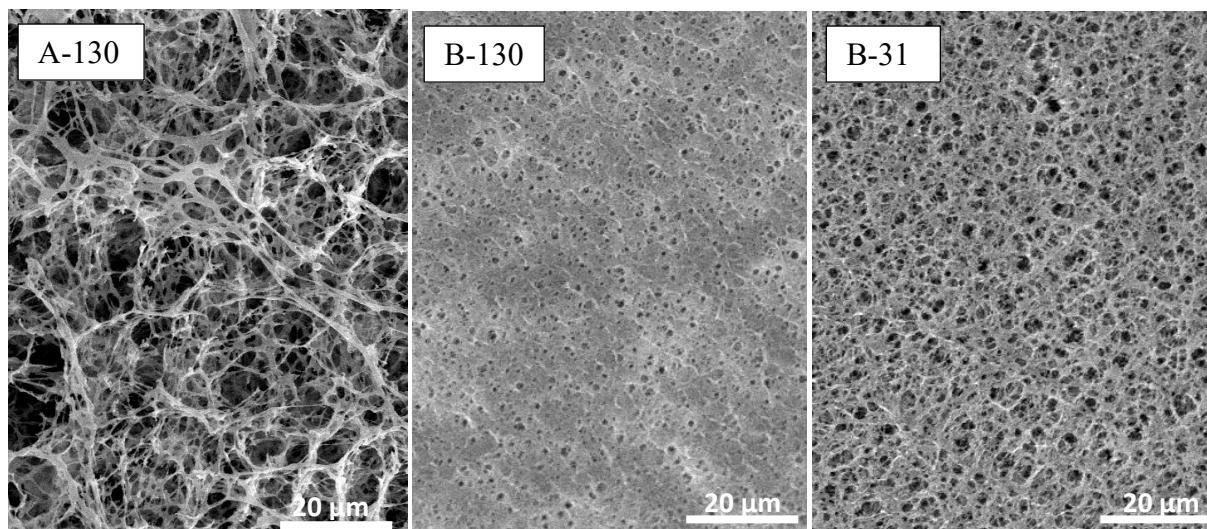
Vzorky PVA/DAC kryogelů získané lyofilizací byly analyzovány z hlediska jejich specifického povrchu (α_{BET}), viz Obr.15. Specifický povrch a množství adsorbovaného objemu dusíku (V_a) roste s klesajícím množstvím síťovadla DAC. Hodnota α_{BET} pro vzorek A-130

(31,1 m³/g) je řádově větší než hodnoty pro vzorky B-130 (2,0 m³/g) a B-31 (2,2 m³/g). Souvisí to s množstvím adsorbované vody, které ovlivňuje rozsah kavitace vyvolané lyofilizací a která je největší právě u A-130. Je zajímavé, že u vzorku B-130 a B-31 nebyl naměřen významný rozdíl jejich specifických povrchů, přestože bylo použita jiná PVA matrice.

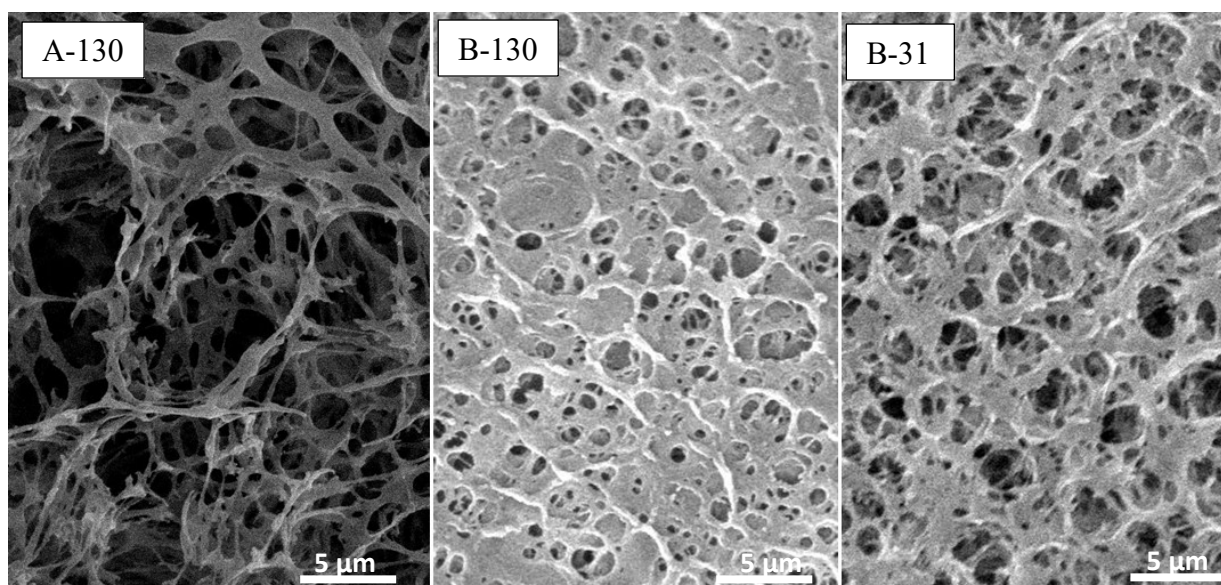


Obr. 15. Závislost množství adsorbovaného objemu dusíku na hmotnost jednotlivých typů hydrogelů V_a na relativním tlaku p/p_0 získaném BET analýzou

Kryogely byly následně analyzovány rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM), při zvětšení 10 000 x a 30 000 x. Bylo zjištěno, že vzorek hydrogelu A-130 vykazuje nejvyšší porozitu, jak lze vidět na obr. 16 a obr. 17. Při porovnání struktury hydrogelu B-130 a B-31 vykazuje vzorek B-31 o něco vyšší porozitu než vzorek B-130, což odpovídá naměřeným hodnotám α_{BET} , ale tento rozdíl není nijak významný v porovnání s velmi řídkou sítí A-130.



Obr. 16. Mikrofotografie jednotlivých PVA/DAC vzorků pořízené pomocí SEM při zvětšení 10 000x



Obr. 17. Mikrofotografie jednotlivých PVA/DAC vzorků pořízené pomocí SEM při zvětšení 30 000 x

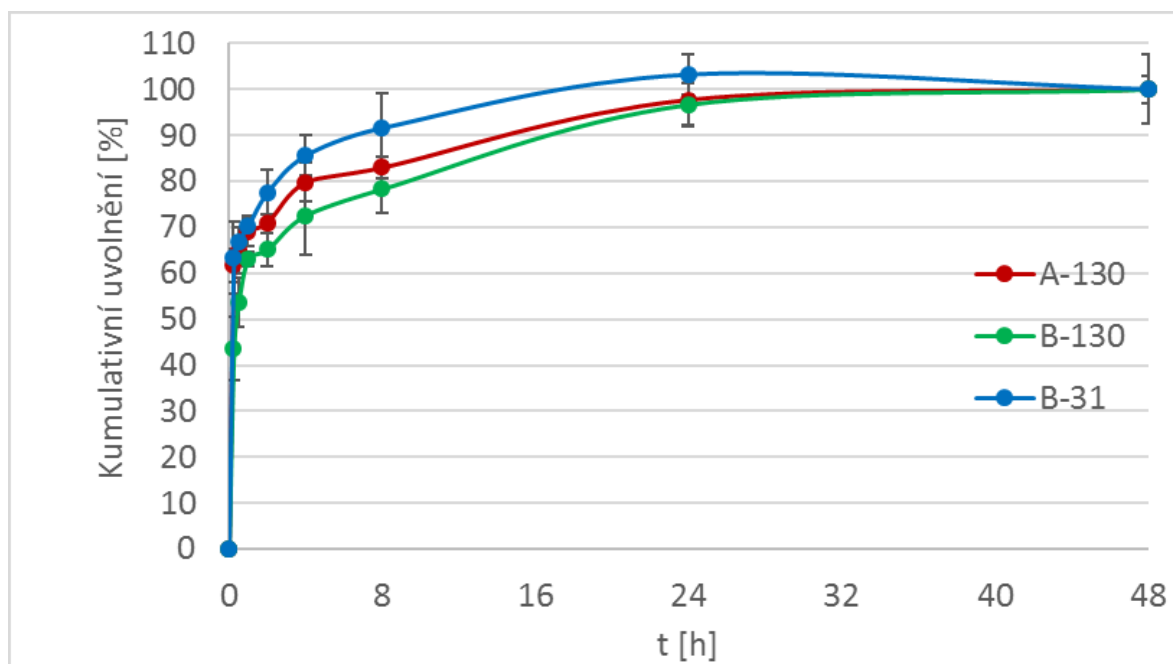
Na rozdíl od parametrů sítě a viskoelastických vlastností, které byly do značné míry ovlivněny M_w PVA, je porozita gelu určena v zásadě pouze množstvím použitého síťovacího činidla.

6.4 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a její uvolňování

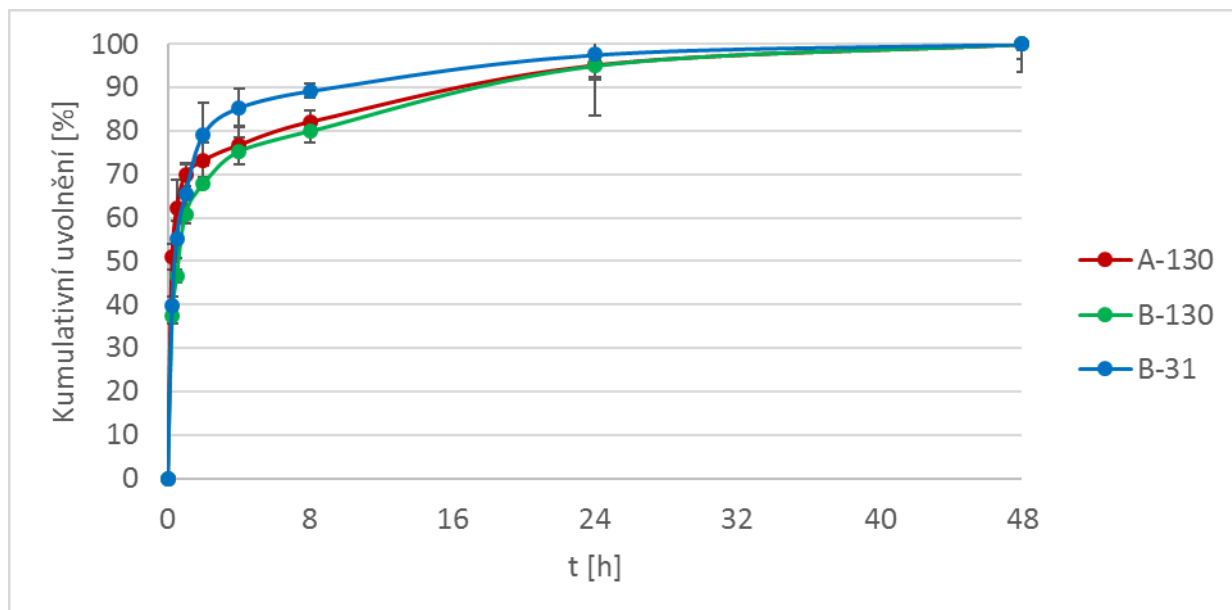
Z řady biologicky aktivních látek používaných v kosmetice (viz. kapitola 2.1) byly pro studium rychlosti uvolňování v závislosti na typu materiálu vybrány dvě, kofein a rutin. Rutin

má celou řadu blahodárných účinků (viz. kap. 2.1.3), mimo jiné také vazoprotektivní vlastnosti. Hydrogel nasycený rutinem by tedy mohl mít pozitivní vliv na stabilizaci cévních stěn a bránit tak jejich praskání a působit proti projevům rozšířených žilek. Hydrogel nasycený kofeinem by zase mohl zabráňovat nadměrné hromadění tuku v kůži a pomáhat chránit pokožku před slunečním zářením. Kofein je také často využíván jako modelová látka pro studium penetrace hydrofilních látek přes kožní bariéru, viz kap. 6.6.

Uvolňování rutinu a kofeinu bylo zkoumáno u vzorků B-31, A-130 a B-130. Rychlost uvolňování biologicky aktivních látek z hydrogelů by měla být ovlivněna právě velikostí ok sítě, hustotou zesílení hydrogelů a velikostí molekuly biologicky aktivní látky. Průběh uvolňování rutinu a kofeinu u různě zesílených vzorků hydrogelů je znázorněn na Obr. 18 pro kofein a na Obr. 19 (rutin).



Obr. 18. Kinetika uvolňování kofeinu u různě zesílených vzorků hydrogelů



Obr. 19. Kinetika uvolňování rutinu u různě zesíťovaných vzorků hydrogelů

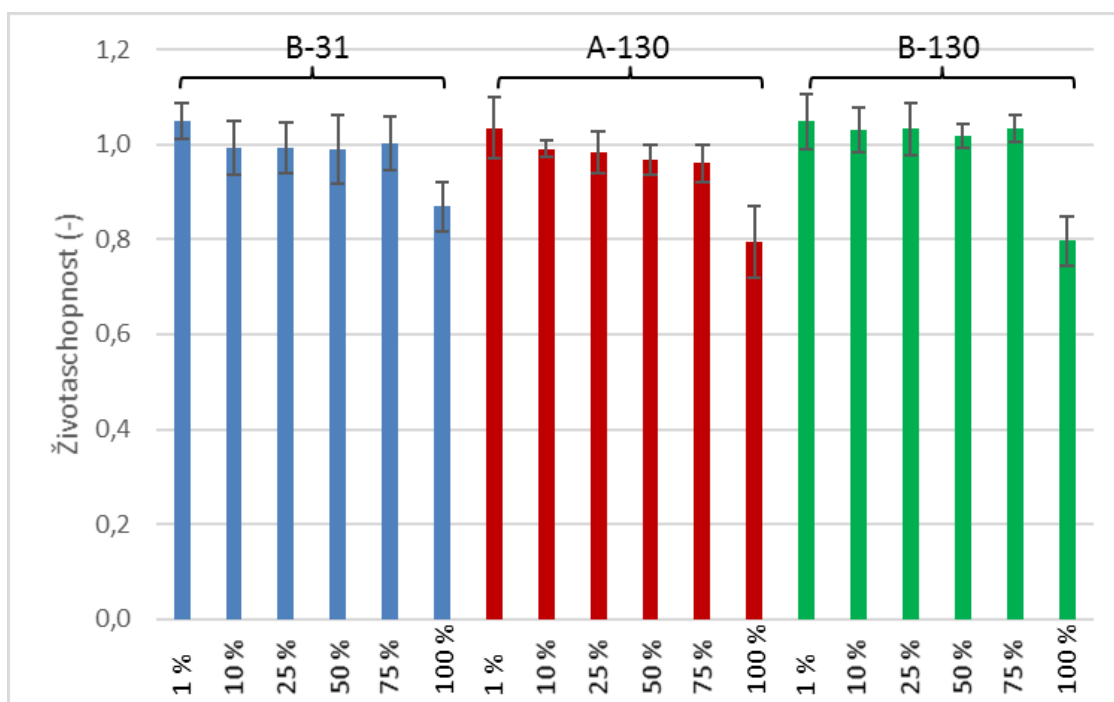
Zřejmě díky tomu, že vzorky měly tvar tenkých filmů a většina látek tedy byla adsorbována na povrchu či v jeho těsné blízkosti, je průběh uvolňování velmi podobný, a rozdíly mezi materiály jsou minimální. Obecně vzato je úvodní rychlost uvolňování ve všech případech velmi vysoká. Během první hodiny dojde k uvolnění 61 – 71 % nesených látek, během 8 h je uvolněno už 82 – 92 %, a k úplnému uvolnění látky dojde přibližně za 24 h a to jak u kofeinu, tak rutinu. V případě relativně malé molekuly kofeinu (194 g/mol), Obr. 18, je rychlost uvolňování po celou dobu téměř shodná (v rámci chyby měření) u všech tří testovaných materiálů. Vliv parametrů sítě na rychlost uvolňování biologicky aktivní látky je lépe pozorovatelný až v případě rutinu (610 g/mol), rozdíly jsou ovšem stále velmi malé. Nejvyšší množství rutinu uvolněného po osmi hodinách (89 %) překvapivě nebylo pozorováno u nejméně zesíťovaného hydrogelu A-130, jak se dalo očekávat, ale u B-31, jediného z hydrogelů připraveného pomocí PVA o nižší M_w . Oba hydrogely založené na PVA s vyšší M_w přitom vykazovaly téměř shodnou rychlost uvolňování (82 % u A-130 a 80 % u B-130 po 8 h), bez ohledu na různé množství síťovadla a velmi rozdílnou porozitu. Důvod tohoto chování je nejasný.

Souhrnem lze říci, že rychlosti uvolňování látek z materiálů jsou velmi podobné, přičemž pozorované drobné rozdíly se zdají být způsobeny spíše typem PVA matrice, než stupněm síťování. To může být způsobeno faktem že velikost ok sítě hydrogelů je v rozsahu 100 – 350 Å (Tab. 3) a je tedy mnohem větší než je velikost testovacích látek. V kombinaci s nízkou tloušťkou materiálu je tak potenciální vliv vyššího stupně zesíťování značně omezen.

Zároveň je ale potřeba podotknout, že pozorovaná vysoká počáteční rychlost uvolňování je velmi vhodná pro kosmetické prostředky jako jsou například pleťové masky, u nichž se předpokládá doba aplikace v řádu maximálně jednotek hodin.

6.5 Testy cytotoxicity

Cytotoxicita hydrogelových extraktů byla zkoumána v kultivačním médiu podle ISO EN 10993 za použití buněčné linie myších embryonálních fibroblastů (NIH/3T3), Obr. 20.



Obr. 20. Znárodnění životaschopnosti buněk pro všechny PVA hydrogelové extrakty v různých koncentracích

Na Obr. 20 můžeme vidět mírný pokles buněčné životaschopnosti u 100 % extraktů ze všech typů připravených PVA/DAC hydrogelů. I přes toto snížení buněčné životaschopnosti se podle ISO 10933-5 takový materiál stále považuje za netoxický. Připravené materiály by tedy měly být vhodné pro kosmetické aplikace. Proto bylo přistoupeno ke studiu transdermálního uvolňování.

6.6 Transdermální uvolňování

Transdermální uvolňování látek z hydrogelů bylo studováno pomocí kofeinu, který slouží jako modelová látka pro studium transdermální absorpce hydrofilních sloučenin. [31]

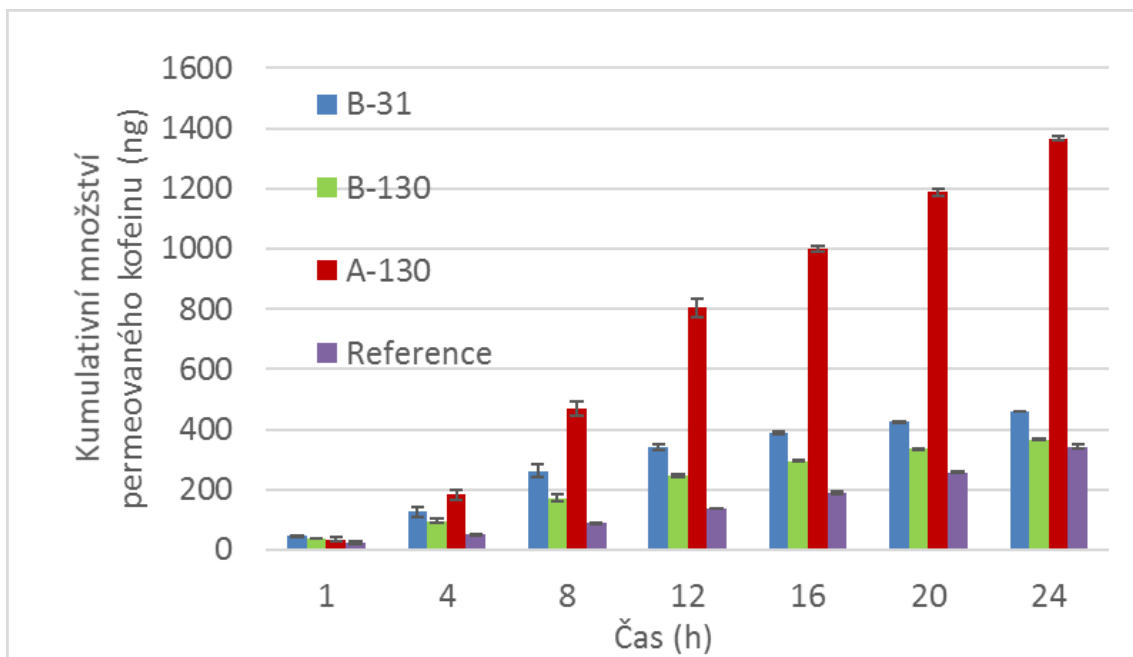
Na základě známé hodnoty EWC hydrogelů, hmotnosti jednotlivých nasycených vzorků hydrogelů a známé koncentrace roztoku kofeinu byl vypočítán obsah kofeinu ve vzorcích a spočítána jeho dávka na 1 cm² kůže. (Tab. 9) Veškerá měření probíhala v triplikátech. Nejvyšší množství přeneseného kofeinu bylo ve vzorku A130 (cca. 900 µg), naopak nejmenší v B130 (cca. 500 µg).

Tab. 9. Obsah kofeinu ve vzorku a na kůži

vzorek	kofein ve vzorku [µg]	kůže [µg/cm ²]
A-130	896	1134
B-31	657	831
B-130	494	626
Reference	250	316

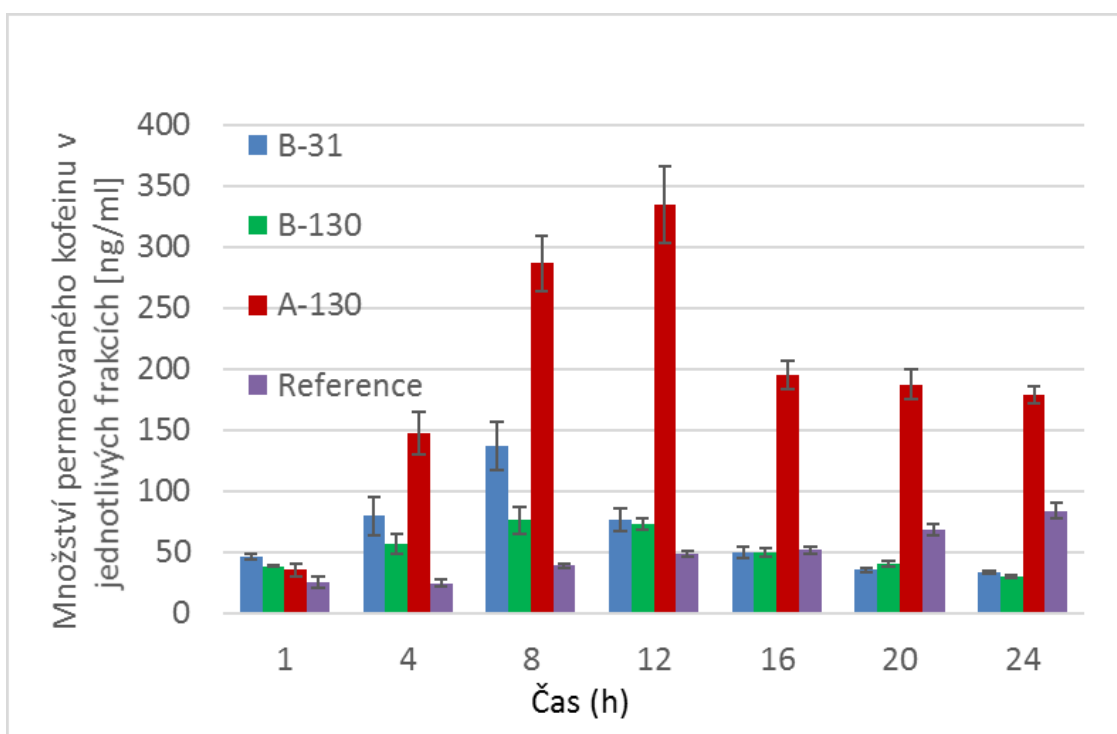
Celkové množství permeovaného kofeinu je znázorněno na Obr. 21, kde můžeme vidět, že po celý sledovaný časový interval množství permeovaného kofeinu neustále narůstá. Kofein tedy permeuje poměrně pomalu. Dle Trauera et. al.,[48] je toto zřejmě důsledek absence krevního zásobení kůže během *in vitro* studie. Trauer et al. totiž pozorovali mnohonásobně rychlejší penetraci kofeinu kůží u živého organismu v porovnání s *in vitro* studií.

Z naměřených dat také vyplývá že během 24h také projde přes kožní bariéru jen velmi malé množství kofeinu, přibližně 0,1 % až 0,2 %. I toto odpovídá zjištěním jiných autorů, jako jsou Bonina et. al. (1992) [49], Santander-Ortega et al. (2010) [50] a Piloni et al. (2013) [51], kteří pozorovali penetraci kofeinu v řádu desetin až jednotek procent aplikované dávky. V našem případě je nízké množství permeovaného kofeinu ještě umocněno relativně nízkou celkovou dávkou kofeinu obsaženou v hydrogelech (0,5 – 0,9 mg) .



Obr. 21. Závislost kumulativní penetrace kofeinu na čase

Přes relativně nízké množství permeovaného kofeinu jsou jasně viditelné rozdíly mezi jednotlivými materiály, Obr. 22.



Obr. 22. Množství permeovaného kofeinu v jednotlivých frakcích

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že nejvíce kofeinu penetruje kůží u vzorku A-130, naopak nejméně u B-130.

Toto do jisté míry odpovídá celkové dávce kofeinu, viz Tab. 9. Při bližším pohledu je ale patrné, že penetrace kofeinu je u vzorku A-130 efektivnější než u obou ostatních. Pro srovnání, průměrná rychlost penetrace kofeinu byla u A-130 = 72,10 ng/cm²/h zatímco u B-31 = 24,26 ng/cm²/h a u B-130 jen 19,33 ng/cm²/h. Vztáhneme-li tyto hodnoty na celkovou dávku kofeinu obsaženou v jednotlivých gelech, zjistíme, že rychlost penetrace kofeinu z A-130 je v porovnání s B-130 přibližně dvakrát vyšší než by odpovídalo pouhému rozdílu v dávce. Vyšší efektivita penetrace kofeinu ze vzorku A-130 pravděpodobně souvisí s materiálovými vlastnostmi daného hydrogelu. Podle viskoelastických studií je totiž hydrogel A-130 zdaleka nejméně elastický a nejvíce viskózní, tudíž je vysoce pravděpodobné, že při transdermální absorpci má nejlepší adhezi ke kůži. To zřejmě umožnilo dosáhnout výrazně vyšší rychlosti penetrace. Díky tomu je hydrogel A-130 ze všech testovaných materiálů nejslibnějším kandidátem pro transdermální podání biologicky aktivních látek, a tedy i pro případné pro kosmetické aplikace.

Na rozdíl od referenčního roztoku kde množství permeovaného kofeinu neustále lineárně narůstá (Obr. 22), vykazuje absorpce kofeinu uvolněného z hydrogelu maximum po 8-12h, což může souviset s pozorovanou vysokou počáteční rychlostí uvolňování kofeinu z hydrogelu (kap. 6.4). Data tak naznačují možnou vyšší počáteční efektivitu absorpce kofeinu obsaženého v nasycených hydrogelech, než ve vodném roztoku, což představuje další potenciální výhodu připravených materiálů pro kosmetické aplikace.

ZÁVĚR

V práci byla připravena čtveřice PVA/DAC hydrogelů s různými vlastnostmi. Toho bylo dosaženo kombinací různých PVA matic s různým množstvím síťovadla DAC. Díky tomu bylo možné modifikovat jak parametry sítě hydrogelů, tak viskoelastické a povrchové vlastnosti připravených PVA matic ve velmi širokém rozsahu a díky tomu stanovit nejvhodnější kombinaci vlastností pro případné kosmetické aplikace.

Výsledky studia parametrů sítě ukazují na značný vliv použité PVA matrice, který je srovnatelný s vlivem různého množství síťovadla. Největší zbožtnání a EWC vykazoval vzorek A-31, který měl nejnižší zesítnění a M_w PVA, jeho mechanické vlastnosti ovšem nedovolovaly další testy. Gelová frakce se zvyšovala u vzorků, které měly vyšší podíl DAC a vyšší M_w PVA. Největší gelovou frakci měl tak vzorek B-130. Průměrná molekulová hmotnost mezi uzly sítě (M_c) rostla se snižujícím se množstvím DAC. Hustota sítě (ρ_c) rostla s hlavně s použitím vyššího množství DAC ale také s nižším M_w PVA. Vyšší hustotu sítě tedy vykazovaly vzorky z řady B. Velikost ok sítě PVA hydrogelu rostla s nižší M_w PVA a s nízkým množstvím použitého DAC. Největší velikost ok sítě tedy měl vzorek A-31.

Rozdílné parametry sítě hydrogelů se projevily také v jejich viskoelastických vlastnostech. Dynamický (G') a ztrátový modul (G'') byly vyšší u hydrogelů připravených s vyšším množstvím síťovadla (řada B). Hustší síť vykazovala vyšší elasticitu a řidší síť naopak větší viskozitu. Komplexní modul G^* byl podobný dynamickému modulu, to znamená, že pružnost hydrogelů závisí hlavně na množství síťovadla a koreluje tak s vypočtenými hodnotami hustoty sítě. Na základě zjištěných údajů byl nejvíce viskózním a nejméně elastickým vzorek A-130, který je také z testovaných vzorků nejméně zesítněný. Naopak největší elasticitu projevovat vzorek B-130.

Naopak specifický povrch, porozita a množství adsorbovaného objemu dusíku je ovlivněná M_w PVA jen málo a závisí hlavně na množství použitého síťovadla. Hodnota specifického povrchu pro vzorek A-130 ($31,1 \text{ m}^3/\text{g}$) byla řádově vyšší než u hodnot vzorků B-130 ($2,0 \text{ m}^3/\text{g}$) a B-31 ($2,2 \text{ m}^3/\text{g}$), což je způsobeno nejvyšším množstvím adsorbované vody u A-130, která ovlivňuje rozsah kavitace vyvolané lyofilizací. U vzorku B-130 a B-31 nebyl naměřen významný rozdíl jejich specifických povrchů, i přesto, že byla použita jiná PVA matrice. Při porovnání mikrofotografií jednotlivých PVA/DAC vzorků pořízené pomocí SEM vykazoval vzorek A-130 také nejvyšší porozitu, což odpovídá naměřeným hodnotám α_{BET} .

Průběh uvolňování biologicky aktivních látek (rutin a kofein) z hydrogelů byl velmi podobný a rozdíly mezi materiály byly minimální. Úvodní rychlost uvolňování byla ve všech případech velmi vysoká. Již během prvních hodin došlo k uvolnění 61–71 %, po osmi hodinách se jednalo už o 80–90% a k úplnému uvolnění došlo do 24 h. Vliv parametru sítě na rychlost uvolňování aktivní látky byl lépe pozorovatelný u rutinu, ale rozdíly byly velmi malé. Nejvyšší množství rutinu uvolněného po 8 h bylo překvapivě zpozorováno u vzorku B-31 (89 %). Rychlost uvolňování látek z PVA/DAC hydrogelů se tak zdá být určená spíše typem PVA matrice než stupněm síťování, jejíž vliv byl nejspíše značně omezen nízkou tloušťkou materiálu a relativně velkou velikostí ok sítě. Vysoká počáteční rychlost uvolňování, pozorovaná u všech materiálů, je ovšem vhodná pro některé kosmetické přípravky, jako například pleťové masky.

Všechny testované vzorky se ve zkouškách cytotoxicity hydrogelových extraktů stanovovaných podle ISO EN 10993 projeví jako netoxické, a tedy by měly být vhodné pro kosmetické aplikace.

Transdermální uvolňování látek z hydrogelů bylo studováno pomocí kofeinu na prasečí kůži. Průměrná rychlost penetrace kofeinu byla u A-130 = 72,10 ng/cm²/h, zatímco u B-31 = 24,26 ng/cm²/h a u B-130 jen 19,33 ng/cm²/h. Na rozdíl od referenčního roztoku kofeinu vykazovaly kofeinem nasycené hydrogely maximální rychlost absorpce (penetrace) kofeinu kůži po 8 – 12 h, což zřejmě souvisí s vysokou počáteční rychlostí uvolňování látek z hydrogelu. Vyšší efektivita penetrace kofeinu ze vzorku A-130 je pravděpodobně způsobena jeho materiálovými vlastnostmi, jmenovitě jeho nejvyšší viskozitou ze všech testovaných materiálů. Vzorek A-130 tudíž měl při transdermální absorpci zřejmě nejlepší adhezi ke kůži, což zajistilo nejvyšší efektivitu přenosu kofeinu.

Závěrem lze tedy konstatovat, že vzorek A-130, připravený z PVA o nižší M_w a s použitím 0.25 hm.% DAC, je pravděpodobně nejvhodnější pro transdermální podání biologicky aktivních látek či pro kosmetické aplikace.

Kromě přípravy a optimalizace vlastností materiálů vhodných pro kosmetické aplikace, tato diplomová práce také demonstrovala značný, ovšem v literatuře také velmi často opomíjený, potenciál vlivu použité matrice na výsledné vlastnosti hydrogelu. Modifikací matrice lze značně rozšířit spektrum dosažitelných vlastností hydrogelů, lépe je optimalizovat pro dané využití a dosáhnout tak mnohem lepších výsledků než pouhou změnou množství síťovadla.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PEPPAS, N. A., B. V. SLAUGHTER a M. A. KANZELBERGER. 9.20 - Hydrogels. In: Krzysztof MATYJASZEWSKI a Martin MÖLLER, ed. *Polymer Science: A Comprehensive Reference* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2012, s. 385–395. ISBN 978-0-08-087862-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0
- [2] BARBUCCI, Rolando, ed. *Hydrogels: biological properties and applications*. Milan ; New York: Springer, 2009. ISBN 978-88-470-1103-8.
- [3] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105–121. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [4] ARGENTA, Débora F., Talitha C. DOS SANTOS, Angela M. CAMPOS a Thiago CAON. Hydrogel Nanocomposite Systems. In: *Nanocarriers for Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 , s. 81–131. ISBN 978-0-12-814033-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814033-8.00003-5
- [5] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, **04**(02). ISSN 2254609X. Dostupné z: doi:10.4172/2254-609X.100013
- [6] ROSIAK, Janusz M a Fumio YOSHII. Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 1999, **151**(1–4), 56–64. ISSN 0168583X. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-583X(99)00118-4
- [7] HENNINK, W E a C F VAN NOSTRUM. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, **24**.
- [8] MÜNSTER, Lukáš. Příprava, charakterizace a využití dialdehydu celulózy jako síťovacího činidla pro PVA [online]. Zlín, 2018 Dostupné z: <<https://theses.cz/id/99kmrl/>>. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. Ing. et Ing. Ivo Kuřitka, Ph.D. et Ph.D..
- [9] KAMOUN, Elbadawy A., Xin CHEN, Mohamed S. MOHY ELDIN a El-Refai S. KENAWY. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2015, **8**(1), 1–14. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2014.07.005
- [10] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAR, Anna HURAJOVÁ a Ivo KUŘITKA. Dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels: Influence of catalyst and crosslinker shelf life. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **198**, 181–190. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.035
- [11] POTTHAST, Antje, Mirjana KOSTIC, Sonja SCHIEHSER, Paul KOSMA a Thomas ROSENAU. Studies on oxidative modifications of cellulose in the periodate system: Molecular weight distribution and carbonyl group profiles. *Holzforschung* [online]. 2007, **61**(6). ISSN 1437434X, 00183830. Dostupné z: doi:10.1515/HF.2007.099

- [12] KIM, Ung-Jin, Shigenori KUGA, Masahisa WADA, Takeshi OKANO a Tetsuo KONDO. Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose. *Biomacromolecules* [online]. 2000, **1**(3), 488–492. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm0000337
- [13] KIM, Ung-Jin, Masahisa WADA a Shigenori KUGA. Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2004, **56**(1), 7–10. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2003.10.013
- [14] MÜNSTER, Lukáš, Michaela FOJTŮ, Zdenka CAPÁKOVÁ, Tomáš VACULOVÍČ, Michaela TVRDOŇOVÁ, Ivo KUŘITKA, Michal MASAŘÍK a Jan VÍCHA. Selectively Oxidized Cellulose with Adjustable Molecular Weight for Controlled Release of Platinum Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* [online]. 2019, **20**(4), 1623–1634. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01807
- [15] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAŘ, Pavel KUCHARCZYK a Ivo KUŘITKA. Stability and aging of solubilized dialdehyde cellulose. *Cellulose* [online]. 2017, **24**(7), 2753–2766. ISSN 0969-0239, 1572-882X. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-017-1314-x
- [16] SULAEVA, Irina, Karl Michael KLINGER, Hassan AMER, Ute HENNIGES, Thomas ROSENAU a Antje POTTHAST. Determination of molar mass distributions of highly oxidized dialdehyde cellulose by size exclusion chromatography and asymmetric flow field-flow fractionation. *Cellulose* [online]. 2015, **22**(6), 3569–3581. ISSN 0969-0239, 1572-882X. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-015-0769-x
- [17] NAAHIDI, Sheva, Mousa JAFARI, Megan LOGAN, Yujie WANG, Yongfang YUAN, Hojae BAE, Brian DIXON a P. CHEN. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, **35**(5), 530–544. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006
- [18] ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafī OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan Md. AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, **57**, 414–433. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.07.053
- [19] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAŘ, Anna HURAJOVÁ a Ivo KUŘITKA. Dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels: Influence of catalyst and crosslinker shelf life. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **198**, 181–190. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.035
- [20] WILLIAMS, P.A A M. HICKEY. Fluid Gels Based On Natural Polymers For Cosmetic Applications. *COSMETICS & TOILETRIES* [online]. Dostupné z: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/viscositymod/2672031.html>
- [21] LOCHHEAD, R.Y. The Use of Polymers in Cosmetic Products. In: *Cosmetic Science and Technology* [online]. B.m.: Elsevier, 2017, s. 171–221. ISBN 978-0-12-802005-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00013-6
- [22] PARENTE, M. E., A. OCHOA ANDRADE, G. ARES, F. RUSSO a Á. JIMÉNEZ-KAIRUZ. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *International Journal of*

- Cosmetic Science* [online]. 2015, **37**(5), 511–518 . ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12227
- [23] YU, Ruey J a Eugene J VAN SCOTT. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2004, **3**(2), 76–87. ISSN 1473-2130, 1473-2165. Dostupné z: doi:10.1111/j.1473-2130.2004.00059.x
- [24] FARRIS, Patricia K. *Cosmeceuticals and cosmetic practice*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2014. ISBN isbn978-1-118-38483-1.
- [25] GANESHPURKAR, Aditya a Ajay K. SALUJA. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, **25**(2), 149–164. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025
- [26] PIMENTEL, Renah Boanerges de Queiroz, Cristovão Alves DA COSTA, Patrícia Melchionna ALBUQUERQUE a Sergio Duvoisin JUNIOR. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2013, **13**(1), 151. ISSN 1472-6882. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6882-13-151
- [27] CHOQUENET, Benjamin, Céline COUTEAU, Eva PAPARIS a Laurence J. M. COIFFARD. Quercetin and Rutin as Potential Sunscreen Agents: Determination of Efficacy by an in Vitro Method. *Journal of Natural Products* [online]. 2008, **71**(6), 1117–1118. ISSN 0163-3864, 1520-6025. Dostupné z: doi:10.1021/np7007297
- [28] CHOI, Jin Kyeong a Sang-Hyun KIM. Rutin suppresses atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2013, **238**(4), 410–417 . ISSN 1535-3702, 1535-3699. Dostupné z: doi:10.1177/1535370213477975
- [29] TRAN, Ngoc Quyen, Yoon Ki JOUNG, Eugene LIH a Ki Dong PARK. In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels As Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(8), 2872–2880 . ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm200326g
- [30] NAFISI, S. a H.I. MAIBACH. Nanotechnology in Cosmetics. In: *Cosmetic Science and Technology* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 , s. 337–369. ISBN 978-0-12-802005-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00022-7
- [31] LUO, Lin a Majella E. LANE. Topical and transdermal delivery of caffeine. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **490**(1–2), 155–164 . ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.050
- [32] ROUQUEROL, Françoise, Jean ROUQUEROL a Kenneth SING. Introduction. In: *Adsorption by Powders and Porous Solids* [online]. B.m.: Elsevier, 1999, s. 1–26. ISBN 978-0-12-598920-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012598920-6/50002-6
- [33] PECHOŮŠEK, Jiří. Měření plochy povrchu pevných látek a určování jejich porozity metodou sorpce plynu [online]. 2010, Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z: <https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/ostatni/BET.pdf>

- [34] BARTOVSKÁ Lidmila, ŠIŠKOVÁ Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav (strana 073/245)* [online]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/073.html
- [35] ISO 9277:2010. *ISO* [online]. Dostupné z: <http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/04/49/44941.html>
- [36] KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK. Elektronová mikroskopie. nedatováno, **2011**, 51. ISSN 978-80-244-2739-3.
- [37] GAJDOŠÍK, Radek. Charakterizace porézních materiálů pomocí RTG mikrotomografie [online]. Zlín, 2014 . Dostupné z: <<https://theses.cz/id/yiuvb7/>>. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Antonín Minařík, Ph.D..
- [38] FLORY, Paul J. a John REHNER. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1943, **11**(11), 521–526. ISSN 0021-9606, 1089-7690. Dostupné z: doi:10.1063/1.1723792
- [39] PAVLICOVÁ, Renata. Příprava hydrogelů s obsahem huminových látek pro kosmetické aplikace [online]. Brno, 2014 Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/31461>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Centrum materiálového výzkumu. Vedoucí práce Petr Sedláček.
- [40] GARGULÁK, Tomáš. Viskoelastické vlastnosti materiálů [online]. Zlín, 2010 Dostupné z: <<https://theses.cz/id/1cyakt/>>. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Martin Vašina, Ph.D..
- [41] Neuveden. Fyzika polymerů. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Fakulta technologická. Ústav fyziky a materiálového inženýrství [online]. 2009 . Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=fyzika_pol
- [42] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: Angelo CARPI, ed. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. B.m.: InTech, 2011. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: doi:10.5772/24553
- [43] KLOFÁČ, Jiří. Studie bobtnání a uvolňování vybraného polymerního materiálu pro řízené uvolňování látek v medicíně [online]. Zlín, 2013 Dostupné z: <<https://theses.cz/id/xpnqd7/>>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Pavel Bažant.
- [44] HEJSKOVÁ, Veronika. UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie [online]. Praha, 2016 Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120223757>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta. Vedoucí práce Ing. Hana Kotoučová, Ph.D.
- [45] MARÁKOVÁ, Nela. Příprava, charakterizace a biokompatibilita koloidního polyani-
linu [online]. Zlín, 2015 Dostupné z: <<https://theses.cz/id/lcpfkf/>>. Diplomová práce.

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc..

- [46] KAŠPAROVÁ, Martina. Materiály v zubním lékařství [online]. Zlín, 2017 Dostupné z: <<https://theses.cz/id/f9tbsm/>>. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D..
- [47] PEPPAS, Nikolaos A. a Edward W. MERRILL. Determination of interaction parameter χ_1 , for poly(vinyl alcohol) and water in gels crosslinked from solutions. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* [online]. 1976, **14**(2), 459–464. ISSN 03606376, 15429369. Dostupné z: doi:10.1002/pol.1976.170140216
- [48] TRAUER, Sindy, Alexa PATZELT, Nina OTBERG, Fanny KNORR, Christel ROZYCKI, Gabor BALIZS, Rolf BÜTTEMEYER, Michael LINSCHIED, Manfred LIEBSCH a Jürgen LADEMANN. Permeation of topically applied caffeine through human skin – a comparison of in vivo and in vitro data. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2009, **68**(2), 181–186. ISSN 0306-5251. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x
- [49] BONINA, F., S. BADER, L. MONTENEGRO, C. SCROFANI a M. VISCA. Three phase emulsions for controlled delivery in the cosmetic field. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 1992, **14**(2), 65–74. ISSN 0142-5463, 1468-2494. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-2494.1992.tb00040.x
- [50] SANTANDER-ORTEGA, M.J., T. STAUNER, B. LORETZ, J.L. ORTEGA-VINUESA, D. BASTOS-GONZÁLEZ, G. WENZ, U.F. SCHAEFER a C.M. LEHR. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **141**(1), 85–92. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.08.012
- [51] PILLONI, Martina, Guido ENNAS, Mariano CASU, Anna Maria FADDA, Francesca FRONGIA, Francesca MARONGIU, Roberta SANNA, Alessandra SCANO, Donatella VALENTI a Chiara SINICO. Drug silica nanocomposite: preparation, characterization and skin permeation studies. *Pharmaceutical Development and Technology* [online]. 2013, **18**(3), 626–633. ISSN 1083-7450, 1097-9867. Dostupné z: doi:10.3109/10837450.2011.653821

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

IPN	Interpenetrující polymerní síť
PVA	Polyvinylalkohol
PHEMA	Poly (2-hydroxyethyl metakrylát)
PNIPAAm	Poly (N-isopropyl-2-akrylát)
DAC	Dialdehyd celulózy
AHA	Alfa- hydroxykyseliny
PHA	Polyhydroxykyseliny
BA	Bionické kyseliny
RAR- γ	Gama receptor kyseliny retinové
SPF	Ochranný sluneční faktor
UV-VIS	Ultrafialové a viditelné záření
UVB	Středněvlonné záření
NADH	Nikotinamiddinukleotid
NADPH	Nikotinamiddinukleotid fosfát
GAG	Glykosaminoglykany
SEM	Řádkový elektronový mikroskop
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
EWC	Obsah vody v rovnovážném stavu zbobtnání
M_w	Střední molekulová hmotnost
MTT	Thiazolová sůl (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid)
BET	Adsorpční izoterma (Brauer, Emmett, Teller)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Různé typy hydrogelových struktur [1]</i>	13
<i>Obr. 2. Chemická struktura rutinu</i>	19
<i>Obr. 3. Chemická struktura kofeinu</i>	22
<i>Obr. 4. Schéma syntézy DAC</i>	32
<i>Obr. 5. Reakční rovnice mezi -CHO a -OH v kyselém prostředí</i>	33
<i>Obr. 6. Kalibrační křivky rutinu (vlevo) a kofeinu (vpravo)</i>	36
<i>Obr. 7. Přístroj na měření transdermální absorpce (vlevo), detail na permeační cely s prasečí kůží a vloženými vzorky (vpravo).</i>	37
<i>Obr. 8. Závislost gelové frakce a zbobtnání na množství DAC</i>	40
<i>Obr. 9. Závislost EWC a M_c na množství DAC</i>	41
<i>Obr. 10. Závislost hustoty sítě a velikost ok na množství DAC</i>	41
<i>Obr. 11. Závislost elastického modulu na úhlové frekvenci</i>	42
<i>Obr. 12. Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci</i>	43
<i>Obr. 13. Závislost damping faktoru na úhlové frekvenci</i>	44
<i>Obr. 14. Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci</i>	45
<i>Obr. 15. Závislost množství adsorbovaného objemu dusíku na hmotnost jednotlivých typů hydrogelů V_a na relativním tlaku p/p_0 získaném BET analýzou</i>	46
<i>Obr. 16. Mikrofotografie jednotlivých PVA/DAC vzorků pořízené pomocí SEM při zvětšení 10 000x</i>	47
<i>Obr. 17. Mikrofotografie jednotlivých PVA/DAC vzorků pořízené pomocí SEM při zvětšení 30 000 x</i>	47
<i>Obr. 18. Kinetika uvolňování kofeinu u různě zesíťovaných vzorků hydrogelů</i>	48
<i>Obr. 19. Kinetika uvolňování rutinu u různě zesíťovaných vzorků hydrogelů</i>	49
<i>Obr. 20. Znárodnění životaschopnosti buněk pro všechny PVA hydrogelové extrakty v různých koncentracích</i>	50
<i>Obr. 21. Závislost kumulativní penetrace kofeinu na čase</i>	52
<i>Obr. 22. Množství permeovaného kofeinu v jednotlivých frakcích</i>	52

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Klasifikace hydrogelů na základě jejich vlastností.....</i>	<i>12</i>
<i>Tab. 2. Připravené vzorky PVA/DAC</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 3. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 4. Vypočítané průměrné hodnoty parametru sítě</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 5. Naměřené hodnoty dynamického modulu</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 6. Naměřené hodnoty ztrátového modulu</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 7. Dopočítané hodnoty damping faktoru (tlumící faktor)</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 8. Dopočítané hodnoty komplexního modulu</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 9. Obsah kofeinu ve vzorku a na kůži</i>	<i>51</i>