

Formulace a vlastnosti mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů

Bc. Ivana Slovákova

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Slováková**
Osobní číslo: **T12417**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Formulace a vlastnosti mikroemulzí s obsahem
esenciálních olejů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma. Věnujte se esenciálním olejům, jejich vlastnostem a složení, zejména ve vztahu k obsahu aktivních látek vykazujících antimikrobní aktivitu. Dále se soustředte na problematiku mikroemulzí, jejich složení, přípravu a charakterizaci.

II. Praktická část

1. V experimentální části se věnujte nalezení vhodné formulace pro přípravu stabilních mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů a jejich aktivních složek. Pro jednotlivé oleje určete optimální složení mikroemulze. Připravené mikroemulzní systémy charakterizujte a stanovte jejich antimikrobní účinky. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BASER, K a Gerhard BUCHBAUER. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press/Taylor, c2010, xii, 975 p., [4] p. of plates. ISBN 14-200-6315-4.

[2] STUBENRAUCH, Cosima. Microemulsions: background, new concepts, applications, perspectives. Ames, Iowa: Wiley, 2009, xxiii, 375 p. ISBN 978-140-5167-826.

[3] BOWLES, E. Joy. The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd ed. Crows Nest, N.S.W: Allen, 2003. ISBN 17-411-4051-X.

[4] KHAN, I a Ehab A ABOURASHED. Leung's encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, 2009, xxix, 810 p. ISBN 9780-471-46743-4.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: SLOVÁKOVÁ IVANA

Obor: CHTP-ICS

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 22.5.2014

.....
.....

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 nevdělečně 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 díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlastnostmi a formulací mikroemulzí obsahujících esenciální oleje. Teoretická část je zaměřena na esenciální oleje, jejich složení, způsoby získávání, vlastnosti a možnosti jejich antimikrobního testování. V této části práce jsou rovněž popsány mikroemulze, surfaktanty a metody charakterizace těchto systémů. Praktická část se věnuje přípravě mikroemulzí s citronovým, hřebíčkovým, skořicovým a tymiánovým olejem a dále s hlavními aktivními složkami těchto esenciálních olejů. Testované oleje byly rovněž analyzovány plynovou chromatografií. Dále je zkoumán vliv přítomnosti propylenglykolu ve vodné fázi na složení mikroemulzí a jejich stabilitu. K tomuto účelu byly použity fázové diagramy tříložkových systémů. Připravené mikroemulze byly charakterizovány pomocí fotonové korelační spektroskopie a zároveň byly zkoušeny jejich biologické vlastnosti, konkrétně antimikrobní a cytotoxický účinek.

Klíčová slova: esenciální olej, antimikrobní aktivita, mikroemulze, surfaktant.

ABSTRACT

The thesis deals with properties and formulations of microemulsions containing essential oils. The theoretical part focuses on the essential oils, their formulation, sources, production, properties and possibilities of antimicrobial testing. In the theoretical part, microemulsions, surfactants and characterization methods of these systems are also described. The experimental part deals with the preparation of microemulsions containing lemon, clove, cinnamon and thyme oil and as well as their active substances. Used oils were also analysed by gas chromatography. In addition, the influence of propylene glycol presence in aqueous phase on composition and stability of microemulsions was investigated. Phase diagrams of three-component system were used for this purpose. Prepared microemulsions were characterized by photon correlation spectroscopy and tested on their biological properties, namely antimicrobial and cytotoxic effects.

Keywords: essential oil, antimicrobial effect, microemulsion, surfactant.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za pomoc, důkladné vedení, připomínky, čas a hlavně za trpělivost a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce. Dále patří můj dík všem doktorandům a laborantkám, kteří mně pomáhali v experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji rodině a blízkým za podporu v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 22. 5. 2014

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 ESENCIÁLNÍ OLEJE	13
1.1 AKTIVNÍ SLOŽKY OBSAŽENÉ V EO	13
1.1.1 Terpenoidy	14
1.1.2 Šikimáty	16
1.2 ZÍSKÁVÁNÍ EO	16
1.2.1 Průmyslová výroba.....	16
1.2.2 Laboratorní příprava.....	17
1.2.3 Mikrodestilace	17
1.2.4 Mikroextrakce tuhou fází	18
1.3 VLASTNOSTI EO.....	18
1.3.1 Antimikrobní aktivita	18
1.3.2 Antioxidační aktivita	19
1.4 ZDROJE A CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH EO	19
1.4.1 Citronový olej.....	19
1.4.2 Hřebíčkový olej	20
1.4.3 EO z kůry skořice.....	20
1.4.4 Tymiánový olej	21
1.5 METODY PRO CHARAKTERIZACI SLOŽENÍ EO	21
1.5.1 Tenkovrstvá chromatografie	21
1.5.2 Plynová chromatografie	22
2 EMULZNÍ SYSTÉMY	24
2.1 KLASIFIKACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ.....	24
2.2 ROZPAD EMULZNÍCH SYSTÉMŮ.....	25
2.2.1 Krémování a sedimentace	26
2.2.2 Flokulace	26
2.2.3 Ostwaldovo zrání	26
2.2.4 Koalescence.....	27
2.2.5 Fázová inverze	27
2.3 MIKROEMULZE.....	28
2.3.1 Popis chování mikroemulzí.....	28
2.3.2 Typy mikroemulzí	30
2.4 SURFAKTANTY	31
2.4.1 Rozdělení surfaktantů.....	31
2.4.2 Neionické surfaktanty	32
2.4.3 HLB	33
2.5 CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ.....	34
2.5.1 Fotonová korelační spektroskopie.....	34
2.5.2 Teorie rozptylu světla.....	35
2.5.3 Výhody a nevýhody PCS	36
2.6 STUDIUM ANTIMIKROBNÍCH VLASTNOSTÍ	36
2.6.1 Agarová difúzní metoda	36

2.6.2	Diluční metoda	37
2.7	CYTOTOXICITA	37
2.7.1	Průtoková cytometrie	38
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	39
4	CÍLE PRÁCE	42
II	PRAKTICKÁ ČÁST	43
5	MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	44
5.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	44
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	45
5.3	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	46
5.4	BUNĚČNÉ LINIE	46
5.5	DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU	46
5.6	METODIKA	46
5.6.1	Příprava mikroemulzí – nalezení vhodného složení mikroemulze	46
5.6.2	Mikroemulze pro testování biologických vlastností esenciálních olejů	48
5.6.3	Grafické znázornění tříložkových soustav	48
5.6.3.1	Výpočet hodnot pro sestavení fázových diagramů	49
5.6.4	Analýza esenciálních olejů pomocí plynové chromatografie	49
5.6.5	Charakterizace mikroemulzí	50
5.6.6	Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí obsahujících esenciální oleje	50
5.6.6.1	Složení a příprava mikroemulzí pro zkoušení antimikrobních vlastností 50	
5.6.6.2	Kultivační médium	51
5.6.6.3	Příprava bakteriální suspenze	51
5.6.6.4	Sledování účinku mikroemulzí obsahujících esenciální oleje na vybrané bakterie 52	
5.6.7	Cytotoxicita mikroemulzí obsahujících esenciální oleje.....	53
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
6.1	FÁZOVÉ DIAGRAMY – GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ SOUSTAV O TŘECH SLOŽKÁCH.....	55
6.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	62
6.3	CHARAKTERIZACE MIKROEMULZÍ – VELIKOST ČÁSTIC	68
6.4	ANTIMIKROBNÍ TESTOVÁNÍ MIKROEMULZÍ S ESENCIÁLNÍMI OLEJI.....	72
6.4.1	Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií	73
6.4.2	Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.....	74
6.4.3	Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií	75
6.4.4	Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.....	76
6.4.5	Srovnání mikroemulzí olejů Nobilis Tilia a Biomedica	77
6.4.5.1	Citronový olej	77
6.4.5.2	Hřebíčkový olej.....	78
6.4.5.3	Skořicový olej	80
6.4.5.4	Tymiánový olej	81
6.4.5.5	Porovnání inhibice jednotlivých bakterií	82
6.4.6	Vliv referenčního vzorku na růst vybraných bakterií	83
6.5	CYTOTOXICITA	84
ZÁVĚR	90	

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	92
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	98
SEZNAM OBRÁZKŮ	100
SEZNAM TABULEK.....	103
SEZNAM PŘÍLOH.....	104

ÚVOD

Esenciální oleje jsou komplexy těkavých látek vzniklých sekundárním metabolismem rostlin. Z přírodního materiálu jsou získávány vodní nebo parní destilací, případně lisováním. Vykazují řadu pozitivních účinků, mezi něž patří například antimikrobní, antifungální, anti-oxidační nebo protizánětlivé účinky. Vzhledem k těmto zajímavým biologickým účinkům by esenciální oleje (i v mikroemulzích) mohly nahradit syntetická aditiva kosmetických nebo potravinářských produktů.

Mikroemulze nacházejí v průmyslové výrobě využití především díky svým vhodným vlastnostem, mezi které patří spontánní vznik nenáročný na energii, transparentnost, stabilita a nízká viskozita. Jsou to čtyřsložkové systémy složené z olejové a vodné fáze, surfaktantu a ko-surfaktantu, jehož přítomnost je typická pouze pro tyto systémy. Termodynamické vlastnosti a nanostruktura je odlišuje od běžných emulzí, které jsou termodynamicky nestabilní. Oproti běžným emulzím, které vyžadují při přípravě intenzivní homogenizaci, vznikají mikroemulze spontánně po promíchání všech složek. Jsou transparentní díky velikosti částic, která se pohybuje v rozmezí 5 – 140 nm. Mikroemulzní částice jsou pak menší než bakterie a mohou být tedy bezpečně filtrovány tam, kde je nežádoucí bakteriální kontaminace.

Cílem diplomové práce, která navazuje na bakalářskou práci, bylo enkapsulovat esenciální oleje do mikroemulzí. Byl sledován vliv propylenglykolu a různých druhů neionických surfaktantů na množství enkapsulovaného oleje a na velikost mikroemulzní oblasti. Pro popis a studium těchto vlivů byly využity pseudo-ternární fázové diagramy. Dalším cílem práce bylo analyzovat použité esenciální oleje plynovou chromatografií. Připravené mikroemulzní systémy pak byly charakterizovány pomocí fotonové korelační spektroskopie a bylo provedeno testování jejich biologických vlastností, při kterém byla ověřena antimikrobní aktivita a cytotoxicita těchto systémů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO) jsou směsi těkavých složek produkované živými organismy, které jsou získávány lisováním nebo extrakcí z celých rostlin či jejich částí. Dá se říci, že všechny rostliny mají schopnost tvořit těkavé látky, avšak některé pouze ve stopovém množství. Základem porozumění vlastnostem EO je objasnění jejich chemického složení. Hlavní složky EO je možno řadit do tří základních skupin, a to do skupiny mono a diterpenů, seskviterpenů a fenylypropanoidů. Mimo tyto hlavní složky obsahují EO rovněž řadu dalších látek, jejichž výčet by byl dlouhý a přesahuje rámec této práce. [1], [2], [3]

Nejprve byly esenciální oleje studovány z hlediska organoleptických vlastností, zejména chutě a vůně. Později bylo zjištěno, že EO jsou ve vztahu k působení na organismus relativně nezávadné, a lze je využít nejen jako chuťových nebo vonných látek, ale i v jiných oblastech. Často jsou například využívány v parfumerii a kosmetice jako vonné komponenty kosmetických přípravků nebo jako aromatické látky v potravinářství. Bylo rovněž zjištěno, že řada olejů vykazuje farmakologické účinky a že mají antibakteriální a fungicidní vlastnosti, které umožňují jejich aplikace jako konzervačních složek. Toto široké využití EO v praxi souvisí s jejich rostoucí produkcí, která je uvedena v Tab. 1. [4], [5], [6]

Tab. 1. *Produkce esenciálních olejů, r. 2008.* [6]

Esenciální olej	Hmotnost [t]	Největší producent
Pomerančový olej	51000	USA, Brazílie, Argentina
Citronový olej	9200	Argentina, Itálie, Španělsko
Eukalyptový olej	4000	Čína, Indie, Austrálie
Mátový olej	3300	Indie, USA, Čína
Hřebíčkový olej	1800	Indonésie, Madagaskar

1.1 Aktivní složky obsažené v EO

Aktivní složky přítomné v EO mají původ ve dvou hlavních skupinách látek produkovaných rostlinami. První skupinou jsou primární metabolity, společné jak pro rostliny, tak pro živočichy, které představují jejich základní stavební látky. Čtyřmi podskupinami primárních metabolitů jsou proteiny, uhlovodíky, nukleové kyseliny a lipidy. Některé z EO jsou degradačními produkty jedné nebo několika těchto podskupin, nejvíce se však na tvorbě EO podílejí lipidy. Druhou skupinou látek, sloužících jako aktivní látky v EO, jsou sekundární metabolit

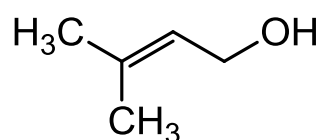
ty, které se vyskytují pouze u některých druhů rostlin. Jsou to například terpenoidy, šikimáty, polyketidy a alkaloidy. Pokud se jedná o EO, nejdůležitějšími sloučeninami jsou terpenoidy a šikimáty. [7]

1.1.1 Terpenoidy

V případě EO jsou terpenoidy vůbec nejvýznamnější skupinou látek. Skládají se z izoprenových (2-methylbutadienových) jednotek. Tato velká skupina látek se dále dělí podle počtu uhlíků v molekule. Nejnižší skupinou terpenů obsahující pět atomů uhlíku jsou hemiterpeny. Základní monoterpeny obsahují deset atomů uhlíků, seskviterpeny jich obsahují patnáct a skupina látek s dvaceti uhlíkovými atomy se označuje jako diterpeny. Obecně platí, že pouze hemiterpeny, monoterpeny a seskviterpeny jsou dostatečně těkavé, aby mohly být součástí EO. [7]

Hemiterpeny

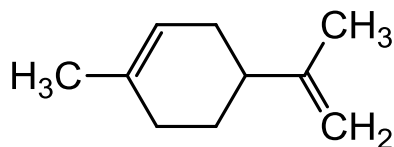
Hemiterpeny se v EO vyskytují spíše jako menšinové složky. Patří mezi ně mnoho alkoholů, aldehydů a esterů s 2-methylbutanovou kostrou. Ve většině případů hemiterpeny vznikají oxidací prenolu (Obr. 1.), což je 3-methylbut-2-en-1-ol. Např. acetát tohoto alkoholu se vyskytuje v ylang-ylang a v několika dalších olejích. Prenylacetát dává EO ovocný nádech. [7]



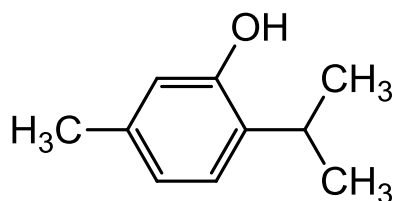
Obr. 1. Prenol. [7]

Monoterpeny

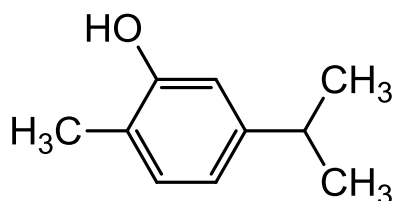
Monoterpeny vznikají z geranylpyrofosfátu. Neznámějšími monoterpeny jsou např. myrcen, limonen, α -pinen, p-cymen, thymol nebo karvakrol. Myrcen je v přírodě velmi rozšířeným monoterpenem. Ve vysokých koncentracích se vyskytuje např. v chmelu, v menších množstvích v běžných bylinách nebo koření. Limonen je složkou mnoha EO, avšak největší podíl je v olejích citrusových plodů, kde představuje až 90 %. Na Obr. 2, 3 a 4 jsou uvedeny konkrétní příklady monoterpenů vyskytujících se v esenciálních olejích použitých v experimentální části této práce. [7]



Obr. 2. Limonen. [7]



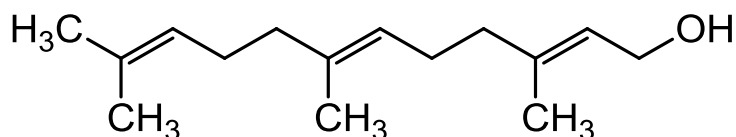
Obr. 3. Thymol. [7]



Obr. 4. Karvakrol. [7]

Seskviterpeny

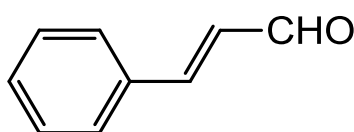
Jak bylo uvedeno výše, seskviterpeny obsahují patnáct uhlíků. To způsobuje jejich nižší těkavost a v porovnání s monoterpeny mají i vyšší bod varu. Z toho důvodu je nelze označit za hlavní vonné složky, ale doplňují pouze celkový vonný vjem kompozice. Prekursorem seskviterpenů je farnesol (Obr. 5.). Jeho pyrofosfát je v přírodě syntetizován adicí izopentenyl pyrofosfátového zbytku ke geranyl pyrofosfátu. Následnou hydrolýzou této sloučeniny vzniká samotný farnesol. [7]



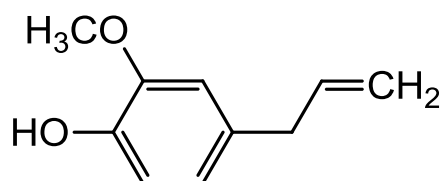
Obr. 5. Farnesol. [7]

1.1.2 Šikimáty

Kyselina šikimová je klíčovým meziproduktem rostlin, z něhož vznikají jak flavonoidy, tak lignin. Flavonoidy jsou v rostlinách významnými antioxidanty, barvivy nebo ochrannými prostředky proti UV záření. Lignin zase tvoří strukturní materiál rostlin, zvláště dřevního pletiva. Biosyntézou kyseliny šikimové vznikají také v EO hojně zastoupené fenypropanoidy. Zástupci této skupiny látek, kteří se vyskytují v esenciálních olejích použitých v experimentální části, jsou uvedeni na Obr. 6 a 7. [3], [7]



Obr. 6. Cinnamaldehyd. [7]



Obr. 7. Eugenol. [7]

1.2 Získávání EO

1.2.1 Průmyslová výroba

Naprostá většina esenciálních olejů pocházejících z rostlinného materiálu se vyrábí různými druhy destilací, nebo v případě citrusových plodů, lisováním jejich kůry za studena. [8]

Při parní destilaci je pára vedena potrubím na dno kotle, kde se rostlinný materiál umísťuje v perforovaném zásobníku nebo koši, aby bylo možno rostlinný materiál po extrakci co nejrychleji odstranit. Kromě parní destilace probíhající za atmosférického tlaku se používá i vysokotlaký způsob destilace, kdy zvýšená teplota výrazně snižuje celkový čas procesu. Ta se používá např. při destilaci máty peprné. Vzniklý destilát, což je prakticky směs vody a oleje, je rozdělován pomocí tzv. florentské baňky, která má vstup u dna a výstup u horní části. Destilát se oddělí na dvě vrstvy, olejovou a vodnou, které lze samostatně odseparovat. [8]

Destilace parou je nejrozšířenější průmyslovou metodou používanou k získávání esenciálních olejů. Tato metoda je zároveň nejméně šetrná, protože při ní dochází k rozpadu méně stabilních složek EO. [8], [9], [10]

Dalším možným způsobem je lisování za studena, které se používá u rostlin s vysokým obsahem silic, například u citrusů. Je to proces, kdy se pletiva citrusových plodů zbavují kůry obsahující olej, kůra je mechanicky rozrušována a olej z ní volně vytéká. Olej je zachycován do sběrné nádoby obsahující filtr. Lisování se provádí buď vymačkáním vlastní tíhou lisovaného materiálu, nebo strojovým lisováním. Lisování vlastní tíhou je tradičnější způsob získávání EO a výsledným produktem je olej vysoké kvality. [2], [11]

Mimo výše popsané způsoby mohou být extrakty z rostlinných zdrojů získávány rovněž extrakcí rozpouštědly, kdy se využívají různá organická rozpouštědla, například hexan, benzín nebo petroléter. Moderním postupem je extrakce oxidem uhličitým pomocí superkritické fluidní extrakce (SFE). Takto získané extrakty esenciálních olejů se používají spíše jako průmyslová aromata nebo jako aditiva v potravinářství, a to v případě, že použité rozpouštědlo a jeho případné zbytkové množství je vhodné pro tento typ použití. [8]

1.2.2 Laboratorní příprava

Tento způsob získávání esenciálních olejů se využívá především pro zachycení malého množství těkavých látek z aromatických rostlin pro výzkumné účely nebo pro stanovení obsahu esenciálních olejů v rostlinném materiálu. Nejpoužívanější způsob je cirkulární extrakce. Destilát je kontinuálně extrahován s malým množstvím organického a s vodou nemísitelného rozpouštědla. Byly popsány dva způsoby destilace a to destilace s rozpouštědly o vysoké a nízké hustotě. [8]

1.2.3 Mikrodestilace

Mikrodestilací lze získat velmi malé množství esenciálních olejů z malých množství rostlinného materiálu. V minulosti bylo provedeno několik pokusů, jež vedly k minimalizaci běžných destilačních postupů. Např. 0.2 - 3 g rostlinného materiálu bylo smícháno s 50 ml vody a destilát byl jímán do pentanu nebo hexanu analytické čistoty. Výsledky práce ukázaly, že destiláty z mikrodestilace a běžné destilace mají identické vlastnosti. [8]

1.2.4 Mikroextrakce tuhou fází

Vzorkování headspace (z prostoru nad vzorkem) je jedním z dalších způsobů, jak izolovat silice ze vzorku. Takto lze získat silice bez dalších složek původní matrice. Tyto látky by mohly později komplikovat vlastní stanovení, kdy se nejčastěji využívá plynová chromatografie (GC). Alternativou výše zmíněného způsobu získávání EO pro GC analýzu je mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid Phase Microextraction). Tato metoda nevyžaduje použití organických rozpouštědel a velkou výhodou je i krátká doba extrakce. Dalšími výhodami SPME jsou jednoduchost, nízké ekonomické náklady, rychlost, selektivita a citlivost při použití vhodného detektoru [5]. SPME se provádí následujícím způsobem. Na vlákne z křemenného skla je nanášeno malé množství sorbentu. Asi jeden centimetr dlouhé vlákno se ponoří do vzorku (v případě analýzy těkavých látek je možno vzorkovat i plynnou fází nad vzorkem) a vyčká se na ustálení rovnováhy. Po dosažení rovnováhy (ca 2 – 30 min) se vlákno vytáhne z matrice a vloží se do nástřikového prostoru chromatografu. Látky zachycené na sorbentu se tepelně desorbují (v případě kapalinového chromatografu se desorbují mobilní fází) a jsou unášeny nosným plynem (mobilní fází) do kolony, kde dochází k jejich separaci. Při přechodu septy se vlákno zatáhne do jehly, aby bylo chráněno proti mechanickému poškození. Jinak je po dobu vzorkování a chromatografické analýzy vlákno z jehly vysunuto. [12], [13]

1.3 Vlastnosti EO

1.3.1 Antimikrobní aktivita

V posledních několika letech byl zaznamenán zvýšený zájem o přírodní složky izolované z rostlin, které inhibují růst patogenních mikroorganismů. Důvodem je především zvyšující se rezistence mikroorganismů proti klasickým antibiotikům i to, že se jedná o látky přírodního charakteru. [14], [15]

Řada syntetických látek se využívá jak konzervanty zamezující kažení potravin, kosmetických nebo farmaceutických přípravků. Tyto látky jsou však ostře sledovány kvůli svému toxickému potenciálu. Naopak, přírodní antimikrobní složky se staly více vyhledávanými a označují se jako bezpečná aditiva. Výsledky mnohých studií poukazují na antimikrobní vlastnosti některých EO, působících na širokou škálu bakteriálních kmenů, například *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* aj. Podle antimikrobních účinků uvedených v publikacích [14], [15] mohou být EO

seřazeny následovně: dobromysl > hřebíček > koriandr > skořice > tymián > máta > rozmarýn > hořčice > šalvěj. [14], [15]

Nejdůležitější podmínkou antimikrobního účinku je chemická struktura látky, především lipofilní charakter uhlovodíkového řetězce a hydrofilní charakter funkčních skupin. Nejvíce účinné skupiny látek jsou fenoly, aldehydy a ketony, menší účinek pak vykazují alkoholy, estery a uhlovodíky. [15]

1.3.2 Antioxidační aktivita

Skutečnost, že některé druhy esenciálních olejů mají antioxidační aktivitu, není překvapením, protože obsahují fenolické skupiny. Téměř všechny fenoly mohou fungovat jako antioxidydy lipidové peroxidace, protože vychytávají peroxylové radikály na konci lipidových řetězců. Rostlinné fenoly mohou působit jako redukční činidla nebo také jako donory vodíku. Antioxidační aktivitu vykazují mnohé EO a jejich složky, zabývá se jimi proto celá řada studií. Například bylo zjištěno, že γ -terpinen obsažený v citronovém oleji zpomaluje peroxidaci kyseliny linolové nebo eugenol vykazuje velmi dobrou schopnost vychytávat volné radikály. Vysoký potenciál fenolických sloučenin k vychytávání volných radikálů bývá objasňován na základě jejich schopnosti poskytnout vodík ze své hydroxylové skupiny. V některých případech nelze antioxidační aktivitu přičítat pouze hlavním složkám EO, ale velkou roli hrají i minoritní složky, popřípadě fungují synergicky se složkami hlavními. Z pětadvaceti EO testovaných v práci [10] vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu tymiánový olej. Dalšími oleji s obdobnými účinky jsou hřebíčkový olej z listů, skořicový olej z listů, bazalkový, eukalyptový nebo heřmánkový olej. [14], [15], [17]

Širší popis vlastností EO je uveden v práci [16].

1.4 Zdroje a charakteristika použitých EO

Z celé řady EO byly v návaznosti na bakalářskou práci vybrány níže popsané EO. Výběr byl proveden na základě informací z literatury o jejich možné antimikrobní aktivitě.

1.4.1 Citronový olej

Matečná rostlina: *Citrus limon* [4]

Popis: Citrusovník je menší, stále zelený strom s vonnými květy a tuhými trny. Dorůstá šesti metrů výšky a pochází z Asie. V dnešní době jsou rozšířené celosvětově, hlavně v USA, Itálii nebo Kypru. [4]

Chemické složení oleje: Citronový olej obsahuje kolem 90 % monoterpenových uhlovodíků, tvořených převážně limonenem (ca 70 %), menším množstvím aldehydů (2 – 6 %; citral, neral, geraniol), alkoholů a esterů (linalool, geraniol, geranylacetát). [4]

Farmakologické a biologické účinky: Mezi pozitivní účinky citronového oleje patří jeho antimikrobní účinky. Dále se využívají jednotlivé látky izolované z citronového oleje. Jednou z takových látek jsou kumariny, které se aplikují při léčbě lupénky. Další látkou je flavonoid diosmin. Ten se využívá při léčbě žilní nedostatečnosti. Mezi negativní účinky popsané u lidí lze jmenovat hlavně fototoxicitu a alergie. [4]

1.4.2 Hřebíčkový olej

Matečná rostlina: *Syzygium aromaticum* [4]

Popis: Je stálezelený strom s úzkými, eliptickými listy. Dosahuje výšky dvanácti metrů. Pochází z jihovýchodní Asie (východní Indonésie). Využívanými částmi stromů jsou pupeny (samotný hřebíček), kůra nebo listy, ze kterých se následně získávají esenciální oleje. [4]

Chemické složení oleje: Obsah oleje závisí na druhu použité suroviny. Pupeny obsahují 15 – 18 % oleje, kůra 4 – 6 % a listy 2 – 3 %. Olej z pupenů obsahuje 60 – 90 % eugenolu, 2 – 27 % eugenolacetátu a 5 – 12 % β -karyofylenu. Minoritními složkami jsou methylsalicylát, methyleugenol, benzaldehyd aj. [4]

Farmakologické a biologické účinky: Hřebíčková tinktura (obsahující až 70 % alkoholu) účinkuje v léčbě pásového oparu. Mimo to hřebíček účinkuje proti alergiím a křečím, pravděpodobně díky obsahu eugelyacetátu. Eugenol zajišťuje antiseptické a širokospektrální antimikrobní účinky na gram-pozitivní, gram-negativní bakterie a plísň. [4]

1.4.3 EO z kůry skořice

Matečná rostlina: *Cinnamomum verum*, syn. *Cinnamomum zeylanicum* [4]

Popis: Skořicovník je středně velký stálezelený strom. Dorůstá šestnácti metrů výšky. Má původ v jižní Indii a na ostrově Srí Lanka. Je popisován jako strom s tenkou, hladkou kůrou, světle růžovo-hnědé barvy. Listy jsou vstřícné, eliptické, oválné nebo kopinaté se světle žluto-zelenými květy. [4]

Chemické složení oleje: Kůra z *C. verum* obsahuje velmi malé množství oleje, ca 0,4 – 0,8 %. Nejvíce je v tomto oleji zastoupen cinnamaldehyd (obvykle 60 – 80 %), mezi ostatní složky patří seskviterpeny (4 – 5 %), eugenol, eugenolacetát, cinnamacetát, cinnamalkohol,

methyleugenol, monoterpeny aj. Olej z listů *C. verum* obsahuje ve srovnání s olejem z kůry velké množství eugenolu (80 – 90 %), obsah ostatních složek je srovnatelný. [4]

Farmakologické a biologické účinky: Extrakt ze sušené kůry *C. verum* inhibuje růst kvasinek *Candida albicans*. Bylo rovněž prokázáno, že EO z kůry *C. verum* inhibuje růst lidských patogenních plísní, např. *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Rhizopus oligosporus* a bakterií (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*) [4]

1.4.4 Tymiánový olej

Matečná rostlina: *Thymus vulgaris* [4]

Popis: Tymián se vyskytuje v několika druzích a odrůdách, jejichž klasifikace je velmi obtížná. Počet druhů tymiánu se odhaduje na 100 – 400. Nejpoužívanějším a nevyskytovanějším druhem je *Thymus vulgaris*. Je to vzpřímený, stále zelený polokeř s mnoha bílými chlupatými stonky a dřevnatým kořenem. Roste do výšky 45 centimetrů. Pochází ze Středozeří. [4]

Chemické složení oleje: Běžně dostupný olej z tymiánu obsahuje 0.8 – 2.6 % těkavých olejů složených z vysoce proměnlivého množství fenolů (20 – 80 %; thymol, karvakrol), monoterpenů (p-cymen, γ -terpinen) a alkoholů (linalool, α -terpineol). [4]

Farmakologické a biologické účinky: Tymiánový olej působí proti křečím, plynatosti. Uspodňuje vykašlávání a vykazuje antimikrobní vlastnosti proti bakteriím a plísním. Tyto účinky jsou přičítány konkrétně thymolu a karvakrolu. [4]

1.5 Metody pro charakterizaci složení EO

V průběhu druhé poloviny minulého století bylo vyvinuto a aplikováno několik metod pro charakterizaci EO. Většina z nich byla postupně nahrazena metodami novými a účinnějšími. Původní metody však mají stále svůj význam a využívají se v případech, kdy je potřebná orientační a rychlá analýza.

1.5.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla jednou z prvních metod pro charakterizaci EO a je využívána dodnes. Poskytuje cenné informace srovnatelné s jednoduchými měřeními

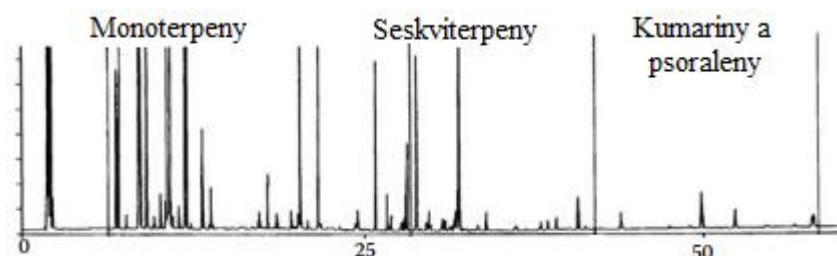
fyzikálních a chemických veličin, a proto byla zahrnuta mezi základní laboratorní metody pro hodnocení esenciálních olejů. [8]

1.5.2 Plynová chromatografie

Další metodou, která však ve srovnání s TLC poskytuje o EO výrazně obsáhlejší informace, je plynová chromatografie (GC). Historický vývoj této metody může být demonstrován na čtyřech příkladech separace esenciálních olejů Routy vonné (*Ruta graveolens*). Separace oleje provedená pomocí GC v roce 1961 S. Brunem vedla k jeho rozdělení na osm složek. O čtyři roky později byla provedena analýza stejného oleje na přístroji Perkin Elmer. Plynový chromatograf byl v tomto případě vybaven dvou metrovou kolonou, tepelně-vodivostním detektorem a za izotermických podmínek bylo výsledkem analýzy dvacet izolovaných látek. Další zlepšení separace složek obsažených v oleji z Routy bylo zaznamenáno po zavedení možnosti analýzy pomocí programovatelného teplotního gradientu, což vedlo k separaci přibližně 80 složek. A konečně v roce 1981, po zavedení plamenově-ionizačního detektoru, došlo k navýšení detekovaných složek na 150. [8]

Nejčastěji používanou stacionární fází k analýze esenciálních olejů je polární Carbowax 20M nebo nepochární Polydimethylsiloxan (PDMS). Nejpoužívanějším detektorem je plamenově-ionizační (FID), který je vysoce citlivý na organické látky. Látky obsahující dusík mohou být selektivně detekovány za pomoci detektoru citlivého na dusík a fosfor NPD (dusíko-fosforový detektor). Stále častěji se lze setkat i s kombinací GC s hmotnostním spektrofotometrem (MS), jež umožní rovněž strukturní analýzu separovaných analytů. [8]

Obecný příklad eluce jednotlivých složek EO je uveden na Obr. 8 a možné podmínky chromatografické analýzy v Tab. 2.



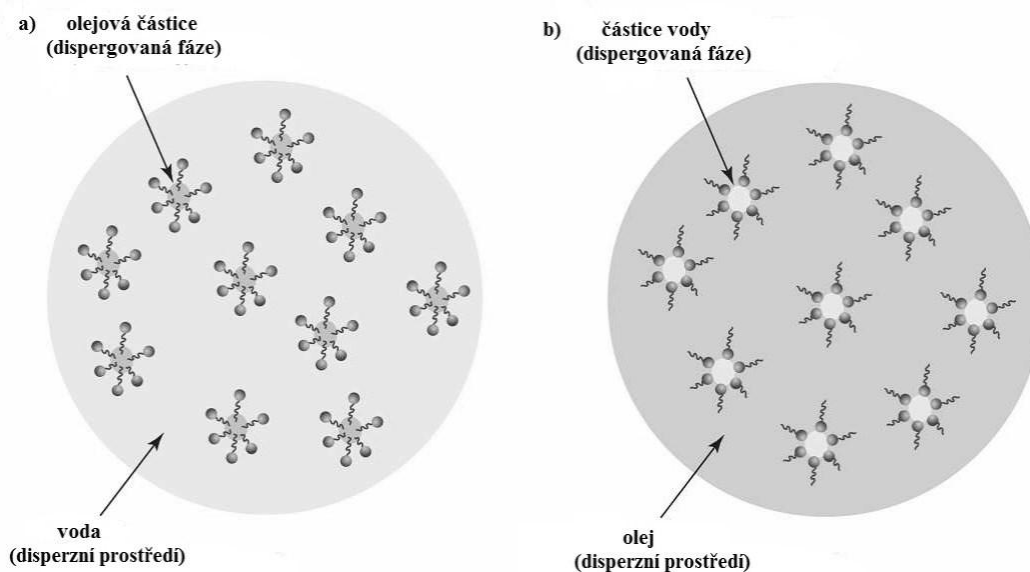
Obr. 8. Eluce typických složek zastoupených v EO pomocí plynové chromatografie. [8]

Tab. 2. Rámcové podmínky pro analýzu EO plynovou chromatografií. [8]

	Parametry
Kolona	Délka: 30 m Vnitřní průměr: 0.25 mm Tloušťka filmu: 0.25 μm
Teplota	Rozmezí teplot: 50 – 350 $^{\circ}\text{C}$ Rychlost ohřevu: 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Nosný plyn	Vodík Rychlost nosného plynu: 36 cm/s

2 EMULZNÍ SYSTÉMY

Emulze jsou druhem disperzních systému skládajících se ze dvou vzájemně nemísitelných kapalin, kdy jsou částice jedné kapaliny (dispergovaná, diskontinuální fáze) rozptýleny v disperzním prostředí (disperzní, kontinuální fázi) kapaliny druhé. Ve většině potravinářských emulzí se velikost částic pohybuje v rozmezí 0.1 – 100 μm . Nejběžnějšími typy emulzí jsou emulze přímé - typ olej ve vodě (o/v) a emulze obrácené - voda v oleji (v/o). Oba typy jsou schematicky znázorněny na Obr. 9. Tyto základní typy mohou být rozšířeny o emulze složené z polárního oleje (například propylenglykolu) rozptýleného v nepolárním oleji (například parafínovém oleji) a naopak. Dalším typem méně běžných emulzí jsou více-násobné emulze. Jde například o emulze typu v/o/v. V takových emulzích jsou malé částice vodné fáze rozptýleny ve větších částicích olejové fáze a ty jsou opět dispergovány ve vodné fázi. Aby byly tyto nemísitelné složky dispergovány, je třeba použít třetí složku, emulgátor. Volba emulgátoru hraje roli nejen při tvorbě samotné emulze, ale je také důležitá z hlediska její stability. [18], [19], [20]



Obr. 9. Struktura emulzí o/v (a), v/o (b). [18]

2.1 Klasifikace emulzních systémů

Emulze mohou být klasifikovány podle celé řady hledisek. Jednou z možností je i klasifikace podle povahy použitého emulgátoru nebo podle struktury systému. Příklady tohoto druhu klasifikace jsou uvedeny níže.

Rozdělení emulzních systémů

1. *Podle povahy emulgátoru:*

- jednotlivé molekuly a ionty;
- neionické surfaktanty;
- ionické surfaktanty;
- směsi surfaktantů;
- neionické polymery;
- polyelektrolyty;
- směsi polymerů a surfaktantů;
- pevné částice.

2. *Podle struktury systému:*

- olej ve vodě a voda v oleji (podle povahy vnitřní fáze);
- micelární emulze (mikroemulze);
- makroemulze;
- dvojfázové nebo vícefázové emulze;
- směsi emulzí. [18]

2.2 Rozpad emulzních systémů

Některé vlivy, například skladování, mohou zapříčinit rozpad emulzí, který se může projevit:

- změnou distribuce velikosti částic nebo rozdílu hustoty mezi disperzní a dispergovanou fází;
- změnou solubilizace dispergované fáze;
- rozrušením filmu stabilizujícího dispergované kapky v celém systému;
- fázovou inverzí. [18]

Než budou níže popsány jednotlivé typy rozpadu emulzí a jejich mechanismy, lze v souvislosti s touto problematikou hovořit mimo jiné také o termodynamické a kinetické stabilitě. Termodynamická stabilita popisuje pravděpodobnost, s jakou se daný typ emulze rozpadne. Zatímco kinetická stabilita vyjadřuje, kdy k rozpadu dojde. Emulze jsou kineticky stabilní, ale termodynamicky nestabilní. [21], [22]

Možné mechanismy rozpadu emulzí jsou graficky znázorněny na Obr. 10. Fyzikální vliv podílející se na každém z mechanismů rozpadu není zcela jednoznačný, vyžaduje posouzení jednotlivých dílčích povrchových vlivů, které daný typ rozpadu podněcují. Jednotlivé dílčí procesy pak probíhají většinou současně, nikoliv postupně za sebou, což komplikuje možnosti jejich podrobné analýzy. V následující části budou popsány jednotlivé typy rozpadu emulzí, jejich charakteristika a možnosti, jak jim předcházet. [18]

2.2.1 Krémování a sedimentace

Tyto procesy jsou zapříčiněny působením vnějších sil, a to především sil gravitačních nebo odstředivých. Pokud tyto síly překonají Brownův tepelný pohyb emulzních kapek, vytvoří se v systému koncentrační gradient tak, že se větší kapky začnou pohybovat nahoru k hladině (pokud je jejich hustota nižší, než hustota disperzního prostředí) nebo klesají ke dnu (v případě, že je hustota kapek vyšší, než hustota disperzního prostředí). V mezním případě se mohou emulzní kapky velmi těsně uspořádat (buď náhodně nebo řízeně) v horní nebo dolní části systému, přičemž zbytek systému tvoří pouze kontinuální, disperzní fáze. V důsledku tohoto velmi těsného uspořádání mohou vznikat vysoce koncentrované nebo gelovité emulze, které již nemohou sedimentovat a vykazují některé mechanické vlastnosti obdobné vlastnostem gelů. [18], [23]

2.2.2 Flokulace

Flokulace je jev, kdy emulzní kapky agregují bez jakékoli změny jejich velikosti do větších celků. Dochází k tomu při nedostatečné velikosti Van der Waalsových sil, kdy vzniká malý odpor mezi částicemi disperzní fáze, a tak se částice k sobě mohou přiblížit na malou vzdálenost. [18], [24]

2.2.3 Ostwaldovo zrání

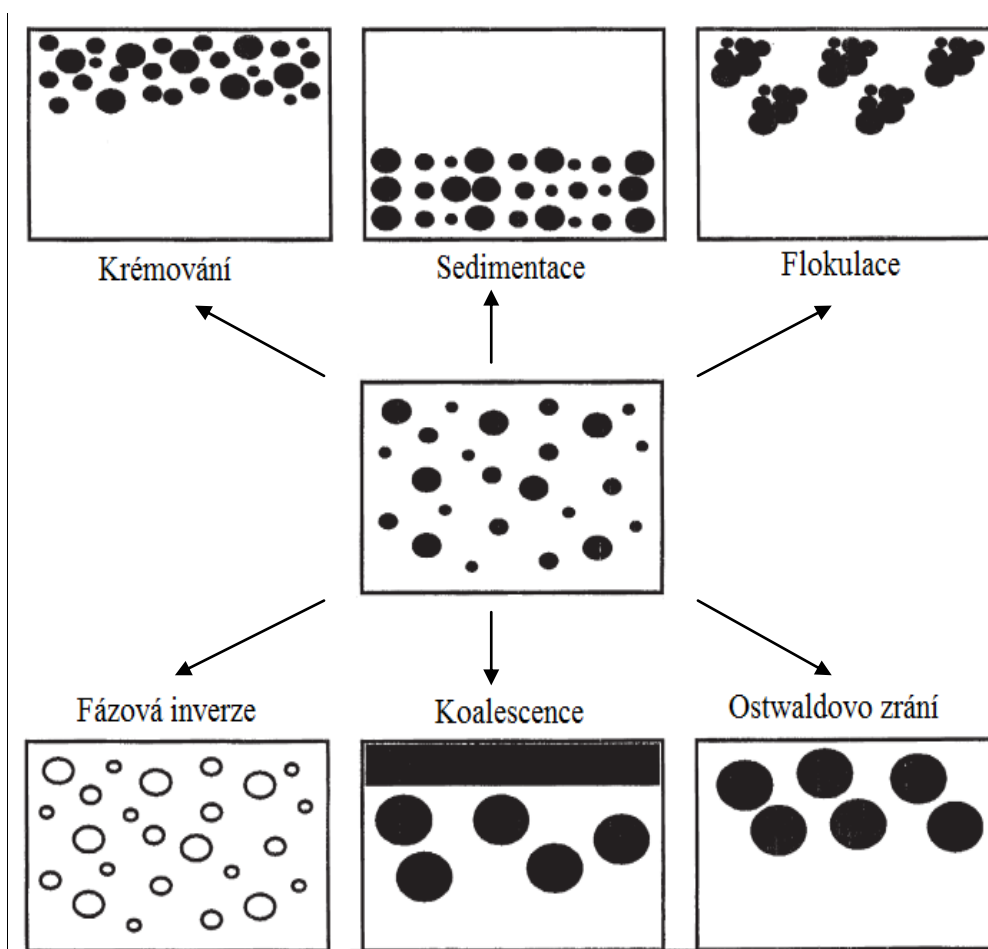
Tento jev vzniká jako důsledek vzájemné rozpustnosti obou kapalných fází tvořících emulzi. I když jsou tyto kapaliny obvykle označovány jako nemísitelné, jsou často vzájemně rozpustné, a tato vzájemná rozpustnost není nezanedbatelná. V emulzích, které jsou polydisperzní, pak budou mít menší emulzní kapky větší rozpustnost ve spojitě fázi (druhé kapalině) ve srovnání s kapkami většími. V průběhu času pak menší kapky postupně „mizí“, protože jejich molekuly difundují do celého objemu emulze a jsou pohlceny většími kapkami. S rostoucím časem se tedy distribuce velikosti kapek posouvá k vyšším hodnotám. [18]

2.2.4 Koalescence

Při koalescenci dochází ke ztenčení a narušení kapalného filmu stabilizujícího jednotlivé emulzní kapky, čímž dochází ke spojení dvou nebo více kapek a vytváří se jedna kapka (zmenšuje se plocha fázového rozhraní). Velké kapky pak mohou sedimentovat. Tento jev se vyskytuje především u koncentrovaných emulzí a je jedním z nejdůležitějších faktorů určujících jejich dobu životnosti. Limitním případem koalescence je úplná separace emulze na dvě oddělené kapalné fáze. [18], [23], [24]

2.2.5 Fázová inverze

Při fázové inverzi dochází k výměně vnitřní a vnější fáze. Emulze typu o/v může být vlivem času nebo změnou podmínek přeměněna na emulzi v/o. Fázová inverze bývá popisována jako přechodný stav, kdy jsou vyráběny vícefázové emulze. [18]



Obr. 10. Schematické znázornění možných mechanismů rozpadu emulzí. [18]

2.3 Mikroemulze

Již bylo uvedeno, že existuje více typů emulzních systémů. Z nich budou podrobněji popsány mikroemulze, kterým je jim věnována experimentální část této práce.

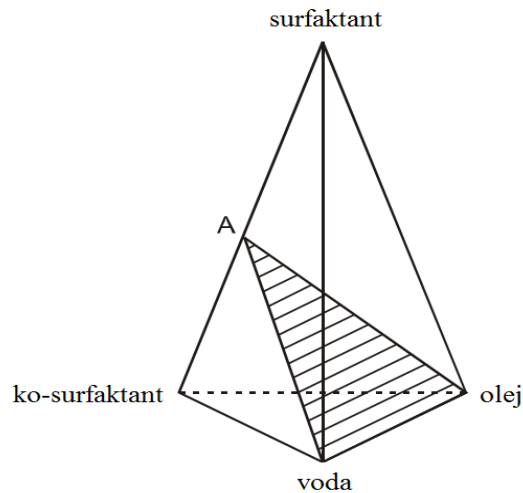
Mikroemulze mohou být definovány jako homogenní, transparentní, termodynamicky stabilní disperze vody a oleje stabilizované surfaktantem, obvykle v kombinaci s ko-surfaktantem, s velikostí částic v rozmezí 5 – 140 nm. Surfaktant je přidáván z důvodu předcházení separace olejové a vodné fáze, což bývá nejčastější důsledek rozpadu emulzních systémů. Molekula surfaktantu je složena z polárních i nepolárních skupin a vykazuje tedy amfifilní charakter. Adsorbuje se na rozhraní fází, kde snižuje mezifázové napětí. [25], [26], [27], [28]

2.3.1 Popis chování mikroemulzí

Studium fázového chování hraje klíčovou roli v rozšíření znalostí o koloidních nebo izotropních (emulzních) systémech. Komplexní série interakcí, jež nastanou po smíchání různých poměrů jednotlivých složek tvořících mikroemulzi, je možno popsat pomocí následujících typů fázových diagramů: kvartérní, ternární, pseudoternární a pseudobinární. Tyto diagramy mohou popisovat fázové projevy, které jsou klíčové pro studium mikroemulzí. Fázovými diagramy lze popsat nejen oblast výskytu jedno a vícefázových systémů, ale rovněž charakterizovat rovnováhu mezi jednotlivými fázemi. Solubilizace a mezifázové vlastnosti mikroemulzí závisí na tlaku, teplotě a především na povaze a koncentraci jednotlivých složek. Stanovení fázových diagramů (neboli fázových map) a rozmístění různě vytvořených struktur v tomto systému voda – olej – surfaktant – ko-surfaktant je pro popis emulzních systémů velmi důležité. [26]

Kvartérní fázové diagramy

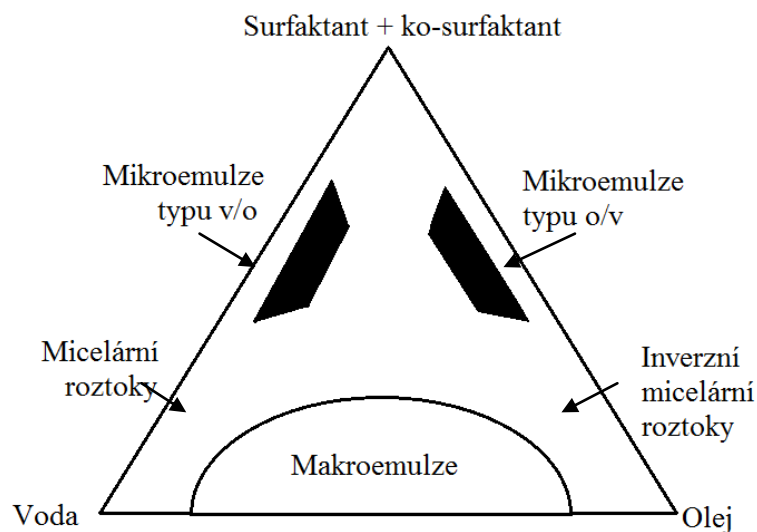
Tyto diagramy jsou vytvořeny z pravidelných čtyřstěnů složených ze čtyř rovnostranných trojúhelníků (schematické znázornění je uvedeno na Obr. 11). Takové diagramy jsou využívány ke znázornění složení jednotlivých složek systému, přičemž každý roh diagramu představuje 100% zastoupení každé složky a hrany znázorňují dvousložkové směsi. Sestrojení kvartérních fázových diagramů je však velmi časově náročné a jejich interpretace je často velmi složitá. [26]



Obr. 11. Znázornění fázového chování čtyřsložkového systému; šrafovaná oblast představuje pevný poměr surfaktantu a ko-surfaktantu. [26]

Pseudoternární fázové diagramy

Při popisu fázového chování disperzních systémů se v praxi mnohem více uplatňují rovinné řezy čtyřstěnnými diagramy, tzv. pseudoternární fázové diagramy. V tomto typu diagramů je zachováno neměnné složení jedné složky emulze a mění se ostatní tři, nebo je neměnný poměr dvou složek, nejčastěji to bývá surfaktant a ko-surfaktant. Při udržení konstantní teploty a tlaku je ternární fázový diagram jednoduchých, třísložkových mikroemulzí rozdělen do dvou nebo čtyř oblastí. Každý bod v diagramu, jenž leží v oblasti výskytu jediné fáze nad hranicí omezené mísitelnosti (binodální křivka), odpovídá mikroemulzi. Část pod touto hranicí představuje multifázovou oblast. Struktura pseudoternárního diagramu je popsána na Obr. 12. [26], [29]



Obr. 12. Hypotetické fázové oblasti mikroemulzních systémů. [30]

2.3.2 Typy mikroemulzí

Mikroemulze mohou být klasifikovány podle fázové rovnováhy na čtyři základní typy [26], [31]:

- *typ I (Winsor I)*: použitý surfaktant je přednostně rozpustný ve vodné fázi a vznikají tak mikroemulze olej ve vodě (o/v). Vodná fáze obsahující surfaktant se vyskytuje společně s olejovou fází, v níž je surfaktant přítomen v nízké koncentraci jako monomer;
- *typ II (Winsor II)*: použitý surfaktant je rozpustný převážně v olejové fázi a vznikají proto mikroemulze typu voda v oleji (v/o). Surfaktant se vyskytuje převážně v olejové fázi, zatímco vodná fáze je prakticky bez surfaktantu;
- *typ III (Winsor III)*: představuje třífázový systém, kdy se surfaktant vyskytuje ve „střední fázi“ (bikontinuální fáze). Ta obsahuje mikrodomény *O* a *W* a je v rovnováze s horní fází obsahující přebytek oleje i se spodní fází s přebytkem vody;
- *typ IV (Winsor IV)*: jednofázový izotropní micelární roztok, který vzniká po přidání dostatečného množství amfifilní látky (surfaktantu s alkoholem).

2.4 Surfaktanty

Surfaktanty látky jsou látky, které snižují povrchové napětí na fázovém rozhraní. Stejný význam má i v literatuře hojně využívaný výraz povrchově aktivní látky (PAL). Kromě těchto dvou označení se používá i termín tenzid. Obecně je termín tenzid používán pro látky, jež snižují povrchové napětí již v relativně nízkých koncentracích. [24]

Pro přípravu emulzních systémů, jak již bylo zmíněno výše, je nutné použití surfaktantů. Jsou to látky ovlivňující energetické poměry na rozhraní dvou fází. Výsledkem bývá nejčastěji snížení mezipovrchového napětí. Tyto specifické vlastnosti jsou dány chemickou a fyzikální strukturou jejich molekul. Hydrofilní a hydrofobní část molekuly bývá typicky ohraničená. Toto molekulové uspořádání je označováno jako antipatické nebo amfifilní. Velikost obou částí molekuly ovlivňuje chování surfaktantů v roztoku. V polárním rozpouštědle se surfaktanty snaží seskupit takovým způsobem, aby hydrofobní části molekuly byly co nejméně ve styku s rozpouštědlem. Hydrofilní část má naopak velkou afinitu k vodě a je orientována opačným směrem. [24]

2.4.1 Rozdělení surfaktantů

Surfaktanty tvoří širokou škálu látek, které lze klasifikovat podle několika hledisek. Například podle:

- hydrofilní skupiny (iontového charakteru);
- hodnoty HLB;
- systematiky organických sloučenin. [24]

Podle typu hydrofilní skupiny a její schopnosti disociovat na ionty jsou surfaktanty děleny do dvou velkých skupin na:

- Ionické
 - *Anionické* – hydrofilní část je záporně nabitá. Příkladem těchto skupin v anionických tenzidech jsou například karboxylová skupina ($\text{RCOO}^- \text{M}^+$), sulfo skupina ($\text{RSO}_3^- \text{M}^+$), sulfátová skupina ($\text{ROSO}_3^- \text{M}^+$) nebo fosfátová skupina ($\text{ROPO}_3^- \text{M}^+$). [32]
 - *Kationické* – hydrofilní skupina nese kladný náboj. Patří sem například kvarterní amoniové soli ($\text{R}_4\text{N}^+ \text{X}^-$), kdy čtyři substituenty R mohou, ale nemusí být stejné. V praxi jsou odvozené z jedné skupiny látek. [32]

- *Amfoterní (zwitterionické)* – molekula tenzidu obsahuje nebo může obsahovat jak kladně nabitou skupinu, tak záporně nabitou skupinu. Příkladem může být sulfobetain $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$. [32]
- Neionické - hydrofilní skupina vykazuje nulový náboj, ale od velikosti všech hydrofilních skupin je odvozována rozpustnost těchto tenzidů ve vodě. Jde například o polyoxyethylenové skupiny nebo skupiny polyolů obsahující cukry. [24], [32]

V další části práce bude pozornost věnována pouze neionickým tenzidům. Důvodem tohoto výběru je jejich praktické využití v experimentální části této diplomové práce.

2.4.2 Neionické surfaktanty

Neionické surfaktanty jsou sloučeniny, jejichž povrchová aktivita není vázána na kladně ani záporně nabitou část molekuly. Molekula tohoto typu tenzidů má přesto amfipatickou strukturu, kdy hydrofilní část molekuly představují například kyslíkaté můstky, hydroxylové skupiny nebo jejich vzájemná kombinace. [33]

Většina neionických PAL má o jeden řád nižší kritickou micelární koncentraci (CMC) než surfaktanty ionické. Vzhledem k povaze hydrofilní části molekuly nejsou citlivé na přítomnost iontů (především Ca^{2+} a Mg^{2+}) ani na pH roztoku. Mnoho neionických surfaktantů, zvláště polyoxyethylenového typu, disponuje zvláštní charakteristikou, kterou je inverzní závislost jejich rozpustnosti na teplotě. V praxi to znamená, že se zvyšující se teplotou spojitě fáze (obvykle vody), jejich rozpustnost klesá. Tento jev bývá objasňován narušením specifických interakcí, konkrétně vodíkových vazeb, mezi molekulami vody a molekulami polyoxyethylenu. Teplota, při níž dochází k vysrážení surfaktantu, je označována jako bod zákalu. Obecně platí, že bod zákalu dané skupiny surfaktantů (se stejným počtem hydrofobních skupin) se zvyšuje s přibývajícím počtem polyoxyethylenových skupin. [33], [32]

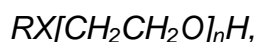
Neionické surfaktanty lze dělit podle několika hledisek, například podle HLB nebo podle povahy můstků, které spojují hydrofilní a hydrofobní části molekuly. [33]

Podle typu můstků lze surfaktanty dělit na:

- surfaktanty s etherickým můstkem;
- surfaktanty s esterickou skupinou;
- surfaktanty s amidovou skupinou;
- surfaktanty s dusíkatým můstkem [33].

Neionické surfaktanty polyoxyethylenového typu

Asi 80 % z neionických tenzidů jsou deriváty ethylenoxidu obsahující etherický můstek. Ethylenoxid je velmi reaktivní sloučenina, která snadno reaguje s každou látkou, která obsahuje aktivní vodík. Mezi takové látky patří například mastné kyseliny, alkoholy, aminy nebo fenoly. Surfaktanty tohoto typu mají následující obecný vzorec:



kde *R* představuje hydrofobní skupinu surfaktantu (obvykle C₁ až C₂₀) a *X* představuje heteroatom, například kyslík, dusík nebo jinou skupinu schopnou spojit polyoxyethylenový řetězec s hydrofobní částí molekuly. [32]

Příklady vlastností typických neionických surfaktantů, Tweenů, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3. Hodnoty vybraných vlastností několika druhů neionického surfaktantu (Tweenů). [34]

Surfaktant	Sumární vzorec	Hydrofobní skupina	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	CMC [mg·l ⁻¹]	HLB
Tween 20	C ₁₂ S ₆ E ₂₀	Laurát	1226	44 – 58	16.7
Tween 40	C ₁₆ S ₆ E ₂₀	Palmitát	1282	30 – 51	15.6
Tween 60	C ₁₈ S ₆ E ₂₀	Stearát	1310	26 – 55	14.9
Tween 80	C ₁₈ S ₆ E ₂₀	Oleát	1308	33 – 45	15.0

Kde: *C* – počet uhlíků, *S* – sorbitanový kruh, *E* – počet ethylenoxidových skupin.

2.4.3 HLB

Důležitou charakteristikou surfaktantů je hodnota HLB neboli hydrofilně-lipofilní rovnováha. Jde v podstatě o empirické vyjádření rovnováhy hydrofilních a hydrofobních skupin přítomných v molekule. Tento koncept byl poprvé uveden Griffinem [35], který na základě charakterizace řady surfaktantů odvodil pro stanovení HLB empirickou rovnicí (Rov. 1) pro neionické alkylnepolyglykoethery založenou na chemickém složení surfaktantu. [24], [36]

$$HLB = \frac{E_j wt\% + OHwt\%}{5}, \quad (1)$$

kde

$E_j wt\%$ - hmotnostní procenta etylenoxidových skupin;

$OHwt\%$ - hmotnostní procenta hydroxylových skupin [36].

Později byla rovnice Rov. 1 upravena a byla navržena obecnější empirická rovnice (Rov. 2), která pracuje s tabelovanými konstantami hydrofilních a hydrofobních skupin [24], [37]:

$$HLB = [(n_H \cdot H) - (n_L \cdot L)] + 7, \quad (2)$$

kde

H a L jsou konstanty hydrofilních a hydrofobních skupin;

n_H a n_L počty hydrofilních a hydrofobních skupin v molekule surfaktantu. [37]

Aby vznikla stabilní mikroemulze, musí být relativní poměr hydrofilních a hydrofobních skupin, tedy HLB surfaktantu, správně zvolen pro každý typ použitého oleje. Prostřednictvím svého vlivu na sbalení molekuly a zakřivení filmu určuje HLB rovněž typ mikroemulze, která vznikne (o/v, v/o, dvojité mikroemulze). [26]

2.5 Charakterizace emulzních systémů

Jednou z nejdůležitějších vlastností emulzí je velikost disperzních částic, které jsou v systému obsaženy. Pokud mají částice v emulzi stejnou velikost, jedná se o monodisperzní emulzi. Jestliže jsou částice různých velikostí, jde o emulzi polydisperzní. Velikost částic monodisperzní emulze může být charakterizována jedním parametrem, například průměrem částice. Monodisperzní emulze bývají někdy připravovány a využívány pro základní studie, protože interpretace experimentálních výsledků je mnohem jednodušší, než v případě emulzí polydisperzních. [19]

2.5.1 Fotonová korelační spektroskopie

Metodou, kterou lze stanovit velikost částic, je fotonová korelační spektroskopie, jinak označována jako dynamický rozptyl světla nebo také kvazielastický rozptyl světla. Fotonová

korelační spektroskopie (PCS z angl. photon correlation spectroscopy) měří Brownův pohyb, který má přímý vztah právě k velikosti částic. [38], [39], [40]

Čím větší částice jsou, tím je Brownův pohyb pomalejší. Menší částice jsou snadněji posunovány molekulami rozpouštědla a pohybují se tak rychleji, než částice větší. Jedním z parametrů při měření metodou PCS je viskozita, která je exponenciální funkcí teploty. Proto je důležité udržovat při celém procesu měření stálou teplotu. Teplota je důležitá nejen vzhledem k viskozitě, ale kolísání teploty by mohlo porušit náhodnost Brownova pohybu, čímž by mohlo dojít ke špatné interpretaci naměřených výsledků. [38], [39], [40]

Rychlost Brownova pohybu je popisována pomocí tzv. translačního difúzního koeficientu. Velikost částic je počítána právě z translačního difúzního koeficientu využitím Stokes-Einsteinova vztahu (3) [38]:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad (3)$$

kde:

$d(H)$ – hydrodynamický poloměr;

D – translační difúzní koeficient;

k – Boltzmannova konstanta;

T – absolutní teplota;

η – viskozita.

Translační difúzní koeficient není závislý pouze na velikosti částic, ale i na dalších povrchových vlastnostech, například na koncentraci nebo na druhu iontů v měřeném prostředí. [38]

2.5.2 Teorie rozptylu světla

Metoda rozptylu světla vychází z teorií Rayleigha a Mieho. První z nich se zabývá malými částicemi, jejichž velikost je menší, než vlnová délka použitého světla (laseru). Intenzita světla rozptýleného touto částicí bude v podstatě izotropní, tzn. stejná ve všech směrech. [38]

Rayleiho teorie je popsána dvěma vztahy, a to: 1) $I \propto d^6$ a 2) $I \propto 1/\lambda^4$, kde I je intenzita rozptýleného světla, d je průměr částice a λ je vlnová délka dopadajícího světla. První ze vztahů tedy vyjadřuje, že velikost rozptylující částice je úměrná d^6 , což znamená, že například 50 nm částice budou 10^6 krát (tedy milionkrát) více rozptýleny, než částice o velikosti 5 nm.

Proto při PCS analýze vzniká riziko, že světlo rozptýlené velkými částicemi „překryje“ světlo, které rozptylují částice malé. To představuje komplikaci v okamžiku, kdy při měření směsi velkých (například 1000 nm) a malých (ca 10 nm) částic bude příspěvek k celkové hodnotě rozptýleného světla, tvořený menšími částicemi, nepatrný. [38]

Pokud velikost částice přibližně odpovídá vlnové délce použitého světla nebo je větší, je rozptýlené světlo funkcí úhlu pozorování a rozptylová funkce vykazuje maxima a minima. V tomto případě pak platí Mieho teorie, která jako jediná správně popisuje tato minima a maxima intenzit a poskytuje výsledky bez ohledu na použitou vlnovou délku primárního paprsku, velikost částic nebo úhel měření. [38]

2.5.3 Výhody a nevýhody PCS

Stejně jako každá jiná metoda sloužící k charakterizaci emulzních systémů má i PCS několik výhod i nevýhod. Z výhod lze jmenovat například [41]:

- rychlé měření (v řádech sekund až minut),
- není nutná kalibrace pomocí standardů se známou velikostí částic,
- rozsah měření od 1 nm do několika, obvykle 4 μm .

Z hlavních nevýhod by neměla být opomenuta skutečnost, že jde o metodu citlivou na přítomnost nečistot. Samotnou interpretaci výsledků mohou ovlivnit například prach, vzduchové bubliny nebo taky mechanické poškrábání měřicí kyvety. Další nevýhodou může být měření pouze transparentních vzorků. [42]

2.6 Studium antimikrobních vlastností

Pro posouzení antimikrobních vlastností esenciálních olejů, ať už jako takových nebo enkapsulovaných v mikroemulzích, je možno použít běžné, konvenční metody stanovení antimikrobní účinnosti látek. Využívají se dva základní druhy testování. Jde o agarovou difúzní metodu a o diluční metodu. [43]

2.6.1 Agarová difúzní metoda

Principem této metody je inokulace mikroorganismů na povrch agaru (nejčastěji Mueller – Hintonův agar) deponovaného na Petriho miskách. Po odsátí přebytečného množství inokula jsou na povrch agaru kladeny disky s antimikrobní, zkoumanou látkou. Po předepsané době inkubace (v závislosti na druhu mikroorganismu) jsou změřeny velikosti inhibičních zón

vytvořených kolem jednotlivých disků. Velikost vytvořených inhibičních zón je přímo úměrná antimikrobnímu účinku testovaných látek. [44]

2.6.2 Diluční metoda

Cílem dilučních metod při stanovení antimikrobního účinku látek je sledování minimálních inhibičních koncentrací (MIC) sledovaných koncentračních řad zkoumaných látek. Většinou se připraví 12 – 15 roztoků, které jsou následně ředěny dvojkovou, geometrickou řadou. Na jednu Petriho misku s agarem obsahující jednu koncentraci antimikrobní látky se naočkuje testovaný počet bakteriálních kmenů. [44]

Po naočkování se misky inkubují při doporučené teplotě po stanovenou dobu (nejčastěji 18 – 20 hod při 35 °C). Současně s testovanými kmeny je nutné provést test citlivosti i pro daný referenční kmen, jehož hodnota MIC je známá. Ke kvantitativnímu stanovení MIC je agarová diluční metoda pozměněna na metodu, kde jsou bakterie kultivovány v bujónu. Stanovuje se MIC ve sterilních, plastových zkumavkách nebo mikrotitračních destičkách. Do jednotlivých jamek destičky obsahujících v bujónu naředěné roztoky antimikrobních látek jsou přidány bakteriální suspenze a je sledována viditelná inhibice růstu bakterií. [44], [45]

Praktické vyhodnocení je prováděno na základě měření turbidity. Mikrotitrační destičky se směsí bakterií a bujónem naředěné antimikrobní látky jsou po inkubaci nejprve několik sekund homogenizovány protřepáním a ihned proměřeny fotometrem při dané vlnové délce. Měří se intenzita zákalu v závislosti na bakteriálním růstu. Tato metoda je vhodná pro testování antimikrobního působení mikroemulzí, díky jejich transparentnosti a stabilitě. Nedochozí k jejich rozpadu, zakalení a tím pádem ke zkreslení výsledků. [43]

Jak bylo popsáno výše, způsobů, jak studovat bakteriostatické, případně baktericidní působení zkoumaných látek, je řada. Podrobnější popis jednotlivých metod je uveden v práci [16]. Další možností, jak lze studovat vliv těchto látek na mikroorganismy, potažmo jednotlivé buňky, je průtoková cytometrie.

2.7 Cytotoxicita

Sledování antimikrobních vlastností představuje v praxi odezvu prokaryotických organismů na působení sledované látky. V řadě případů jsou antimikrobní vlastnosti látek spojeny s jejich cytotoxicitou, tedy negativním efektem na buňky eukaryotické. Z tohoto důvodu je cytotoxicitě mikroemulzí věnována pozornost i v této práci.

2.7.1 Průtoková cytometrie

Jednou z metod, jak lze cytotoxicitu stanovit, je průtoková cytometrie. Je to rychlá technika, která je schopná simultánně měřit více fyzikálních vlastností jednotlivých částic, nejčastěji buněk, které jsou většinou značeny specifickými fluorochromy a které se pohybují v proudu kapaliny přes laserový paprsek. Množství navázaného barviva na sledované struktury pak odpovídá intenzitě fluorescence testovaných buněk. Měřenými vlastnostmi jsou například relativní velikost částic, relativní zrnitost, vnitřní složitost nebo intenzita fluorescence. Tyto vlastnosti jsou stanoveny spojením optického a elektronického systému, který zaznamenává, jak buňky nebo částice rozptylují dopadající laserové světlo a jak intenzivně fluoreskují. Získané informace jsou kvalitativní i kvantitativní. [46], [47], [48], [49], [50]

Průtokový cytometr je složen z tří důležitých částí: fluidika, optika a elektronika. [46], [49]

- Fluidní systém transportuje částice proudem kapaliny do paprsku laseru.
- Optika obsahuje jako zdroj záření obvykle dva nebo tři lasery, které v proudu vzorku ozařují jednotlivé částice a optické filtry usměrňují výsledné světelné signály do příslušných detektorů.
- Elektronika pak převádí světelný signál na signál elektronický, který může být zpracován pomocí softwaru.

V průtokovém cytometru jsou částice unášeny do laserového průsečíku. Pro analýzu jsou vhodné jakékoliv nerozpustné částice nebo buňky o velikosti 0.2 – 150 μm . Část proudu tekutiny, kde se nachází částice nebo buňky, je označována jako jádro vzorku. Když částice nebo buňky procházejí průsečíkem laserových paprsků, dochází k rozptylu záření. Toto rozptýlené a fluoreskující záření je pak zachyceno a shromažďováno vhodně sestavenou soustavou čoček a odesláno do detektoru. Detektor přijatý signál vyhodnotí a výstupem je elektronický signál. [46]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V následující části práce budou představeny informace dostupné z literatury, jež se zabývají santimikrobním působením esenciálních olejů na vybrané bakteriální kmeny, případně informace věnované analýze samotných esenciálních olejů.

Antimikrobním působením esenciálních olejů proti bakteriálním kmenům se zabývali Rusenova a Parvanov, kteří sledovali účinek dvanácti esenciálních olejů na čtrnáct bakteriálních kmenů [51]. Mezi testovanými oleji jsou všechny oleje studované v předložené diplomové práci. Účinnost olejů byla sledována, mimo jiné, na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. K samotnému hodnocení antimikrobního působení použili dvě metody, a to agarovou difúzní a diluční metodu. Difúzní metodou byly testovány tymiánový, skořicový a citronový olej, zatímco diluční metodou olej tymiánový, hřebíčkový a skořicový.

Největší inhibiční zóny, tedy nejlepší antimikrobní účinnost byla pozorována u tymiánového oleje, který byl účinný proti bakterii *Escherichia coli*. Tyto výsledky jsou uvedeny v Tab. 4. V případě skořicového oleje byly vytvořené inhibiční zóny největší u *Staphylococcus aureus*. Citronový olej u všech tří mikroorganismů netvořil žádné inhibiční zóny. V případě stanovení minimální inhibiční koncentrace (Tab. 5) byla nejcitlivější bakterií *Escherichia coli*, kdy ve srovnání se *Staphylococcus aureus* byla MIC použitých olejů vždy poloviční.

Tab. 4. Velikosti inhibičních zón v mm vybraných EO na použité mikroorganismy. [51]

Mikroorganismus	Tymiánový olej	Skořicový olej	Citronový olej
<i>S. aureus</i>	30.7 ± 2.3	36.0 ± 1.7	0
<i>E. coli</i>	39.2 ± 1.2	35.0 ± 1.0	0
<i>P. aeruginosa</i>	14.0 ± 2.6	20.0 ± 1.7	0

Tab. 5. Minimální inhibiční koncentrace použitých olejů v % obj. [51]

Mikroorganismus	Tymiánový olej	Hřebíčkový olej	Skořicový olej
<i>S. aureus</i>	0.50	0.250	0.030
<i>E. coli</i>	0.25	0.125	0.015
<i>P. aeruginosa</i>	2.00	>2.00	0.125

Francouzsko-belgický tým se v práci [52] zabýval podobnou tématikou jako autoři práce [51] s tím rozdílem, že místo agarové difúzní metody sledovali růstovou křivku bakterií v přítomnosti studovaných olejů. Mimo tato antimikrobní testování byly esenciální oleje analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem. Použili následující chromatografické podmínky: 60 m dlouhá kapilární kolona měla vnitřní průměr 0.25 mm s tloušťkou filmu 0.5 μm . Jako nosný plyn bylo použito helium. Termostat byl zahříván 5 min při 50 °C a následně byl naprogramován ohřev 2 °C za minutu až do konečné teploty 250 °C. Tato teplota byla udržována 20 min. Injektor a detektor byly vytemperovány na 250 a 280 °C. Nástřikový objem byl 1 μl roztoku oleje v hexanu (v poměru 5/100). Naměřené výsledky byly vyhodnoceny pomocí knihovny spekter a jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6. Procentuální zastoupení jednotlivých složek studovaných EO. [52]

Analyzovaná složka	Skořicový olej	Hřebíčkový olej	Tymiánový olej
Limonen	0.19	n	n
Cinnamaldehyd	68.79	n	n
Eugenol	6.96	65.28	n
Eugenolacetát	n	12.25	n
Linalool	0.80	n	5.39
β -karyofylen	1.16	8.73	10.93
Thymol	n	n	13.54
Karvakrol	n	n	2.21

n - neidentifikováno.

Cílem práce [53] bylo sledovat antimikrobní účinky hřebíčkového oleje (samotného a v kombinaci s rozmarýnovým olejem). Dříve než byl hřebíčkový olej testován, byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Při daných podmínkách byl v oleji identifikován eugenol (68.5 %), β -karyofylen (19.0 %) a α -karyofylen (1.9 %). Podmínky byly nastaveny následovně: 30 m kolona z taveného křemene (fused silica) s vnitřním průměrem 0.25 mm a tloušťkou filmu 0.25 μm ; nosný plyn byl helium s průtokem 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; kolona byla naprogramována z 50 na 240 °C s ohřevem 8 °C za minutu. Jednotlivé složky oleje byly identifikovány a srovnávány s knihovnou hmotnostních spekter. Antimikrobní vlastnosti byly testovány pomocí agarové difúzní a diluční metody. Při diluční metodě byly roztoky esenciálních olejů rozpuštěny ve vysterilizovaném fyziolo-

gickém roztoku (0.9 % NaCl) s přidavkem Tweenu 80 do výsledné koncentrace 0.5 %. Oleje byly naředěny do koncentrací 0.156 – 4.000 %. [53]

Velikost inhibičních zón se pohybovala v rozmezí 9.5 – 19.5 mm. Testování bylo provedeno na následujících bakteriích: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Rozmezí minimálních inhibičních koncentrací hřebíčkového oleje na týž bakteriích bylo stanoveno na 0.125 – 0.500 % obj. [53]

Co se týká výsledků stanovení MIC esenciálních olejů, jsou srovnatelné s výsledky v práci [51]. I když jde o látky přírodní, a tedy s možným proměnlivým obsahem, řádově se jejich MIC neliší.

Z výše uvedených poznatků lze říci, že ze všech testovaných bakterií je vůči působení esenciálních olejů nejvíce citlivou bakterií gram–negativní *Escherichia coli*. Zároveň nejlepší antimikrobní účinky vykazoval skořicový olej (jak agarovou difúzní, tak diluční metodou). Pro analýzu složení esenciálních olejů je plynová chromatografie vhodnou metodou, zvláště pokud je přístroj vybaven hmotnostním detektorem. Oproti FID detektoru není třeba standardů, naměřené výsledky lze porovnávat s rozsáhlou knihovnou dříve naměřených spekter.

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat dané téma formou literární rešerše se zaměřením na esenciální oleje, zvláště ty, které byly použity v experimentální části práce. Dále bylo úkolem zpracovat problematiku emulzních systémů a věnovat se především mikroemulzím, jejich vlastnostem, stabilitě a charakterizaci.

V praktické části bylo úkolem připravit stabilní mikroemulze s esenciálními oleji tak, aby obsah enkapsulovaného oleje byl co nejvyšší za současného zachování jejich dlouhodobé stability. Úkolem rovněž bylo připravené mikroemulze vhodnými způsoby charakterizovat, podrobit je antimikrobnímu zkoušení a samotné esenciální oleje analyzovat plynovou chromatografií.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

5.1 Použité materiály a chemikálie

Esenciální oleje

Pro přípravu mikroemulzí a jejich následnou analýzu plynovou chromatografií byly použity následující oleje a aktivní látky:

- citronový olej (Biomedica, Praha);
- citronový olej (Nobilis Tilia, Krásná Lípa);
- skořicový olej (Biomedica, Praha);
- skořicový olej (Nobilis Tilia, Krásná Lípa);
- hřebíčkový olej (Biomedica, Praha);
- hřebíčkový olej (Nobilis Tilia, Krásná Lípa);
- tymiánový olej (Biomedica, Praha);
- tymiánový olej (Nobilis Tilia, Krásná Lípa);
- cinnamaldehyd (Sigma Aldrich);
- limonen(Sigma Aldrich, Německo);
- linalool (Sigma Aldrich, Německo);
- karvakrol (Sigma Aldrich, Německo);
- eugenol (Sigma Aldrich, Německo);
- thymol (Sigma Aldrich, Německo).

Ko-surfaktant

- etanol (Penta, Chrudim)

Surfaktanty

- Tween 20 (Polyethylenglykol sorbitan monolaurát), neionický surfaktant, HLB 16.7 (Sigma Aldrich)
- Tween 60 (Polyethylenglykol sorbitan monostearát), neionický surfaktant, HLB 14.9 (Sigma Aldrich)
- Tween 80 (Polyethylenglykol sorbitan monooleát), neionický surfaktant, HLB 15.0 (Sigma Aldrich)

Solubilizátor

- propylenglykol (Penta, Chrudim)

Rozpouštědlo

- metanol (Penta, Chrudim)
- n-Hexan (Penta, Chrudim)

Kultivační média

- Nutrient Broth (HiMedia)
- DMEM (Life Technologies™)

Nosné plyny

- vodík (Linde Gas, Německo)
- dusík (Linde Gas, Německo)
- vzduch (Linde Gas, Německo)

5.2 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- digitální váhy (OHAUS Švýcarsko)
- třepačka Vortex (Heidolph REAX Top, Německo)
- flow box Hera Safe (Thermo Scientific, Německo)
- analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano SZ (Malvern Instruments, Ltd., UK)
- plynový chromatograf Master GC Fast (DANI Instruments, Itálie)
- Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan, Švýcarsko)
- vertikální autokláv (Tuttnauer, Holandsko)
- termostat Memmert (Verkon, Německo)
- sterilizátor Stericell (BMT Medical Technology, Brno)
- invertovaný mikroskop (Olympus, Japan)
- automatické pipety Biohit a Nichipet ex.
- mikrostříkačka Hamillton 1 ml
- laboratorní sklo (kádinky, pipety, tyčinky, zkumavky)
- laboratorní plasty (špičky pro automatické pipety, mikrotitrační destičky, zkumavky, stříkačky, stojany)
- stříkačkové filtry o velikosti pórů 0.22 µm (Millipore, Velká Británie)

- ostatní běžné laboratorní vybavení a pomůcky

5.3 Použité mikroorganismy

Mikroemulze s esenciálními oleji byly testovány na gram-pozitivních i gram-negativních bakteriích, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM):

- *Micrococcus luteus* CCM 732;
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955;
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953;
- *Escherichia coli* CCM 3954;
- *Bacillus cereus* CCM 2010.

Všechny použité bakteriální kmeny byly uchovávány při teplotě 4 ± 2 °C na masopeptonovém agaru a po 3 týdnech byly přeočkovány.

5.4 Buněčné linie

- Embryonální myší fibroblasty (ATCC CRL – 1658 NIH-3T3)

5.5 Dekontaminace použitého materiálu

Všechn použitý materiál (laboratorní sklo, kultivační média, mikrotitrační destičky, plastové zkumavky), který byl použit v experimentální části této práce, byl dekontaminován buď v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min, nebo ozářen UV zářením.

5.6 Metodika

5.6.1 Příprava mikroemulzí – nalezení vhodného složení mikroemulze

V diplomové práci byly připraveny mikroemulze s obsahem různých esenciálních olejů a etanolu jako ko-surfaktantu. Jako surfaktant byl použit Tween 20 (HLB 16.7), Tween 60 (HLB 14.9) a Tween 80 (HLB 15.0). Všechny tyto surfaktanty, díky své hodnotě HLB, jsou schopny vytvořit emulze typu olej ve vodě (o/v). Pro zjištění výskytu jednofázových mikroemulzních oblastí byly sestrojeny fázové, pseudoternární diagramy tříložkového systému voda – olej – surfaktant. Vodnou fází tvořila samotná, demineralizovaná voda nebo směs vody a propylenglykolu v poměru 1:1 a 3:2. Olejová fáze byla tvořena daným esenciálním olejem a etanolem v poměru 1:1. Z této olejové fáze a surfaktantu (Tween 20, Tween 60 nebo 80) bylo připraveno vážením vždy 17 směsí. V těchto směsích byl proměnlivý poměr

surfaktantu a olejové fáze, a to: 1:9, 1.5:8.5, 2:8, 2.5:7.5, 3:7, 3.5:6.5, 4:6, 4.5:5.5, 5:5, 5.5:4.5, 6:4, 6.5:3.5, 7:3, 7.5:2.5, 8:2, 8.5:1.5 a 9:1. Navážky pro přípravu jednotlivých poměrů jsou uvedeny v Tab. 7. Každá ze směsí byla důkladně promíchána na třepače Vortex. Ke každé z takto připravených směsí byla mikrostříkačkou přidávána voda nebo směs vody a propylenglykolu do okamžiku vzniku prvního zákalu. Po každém přidavku vodné fáze byla celá směs po několik sekund homogenizována na třepače. Z uvedených surfaktantů byl použit nejprve Tween 60, následně Tween 80 a Tween 20. Všechny přídatky vodné fáze byly prováděny při laboratorní teplotě. Po dosažení bodu zákalu bylo přidáno množství vody zjištěno vážením na analytických vahách.

Tab. 7. Vypočtená množství jednotlivých složek daných mikroemulzí.

Vzorek	Poměr Tween:Esenciální olej/Etanol	Tween 60 [g]	Esenciální olej/Etanol [g]
1	1:9	0.1	0.9
2	1.5:8.5	0.15	0.85
3	2:8	0.2	0.8
4	2.5:7.5	0.25	0.75
5	3:7	0.3	0.7
6	3.5:6.5	0.35	0.65
7	4:6	0.4	0.6
8	4.5:5.5	0.45	0.55
9	5:5	0.5	0.5
10	5.5:4.5	0.55	0.45
11	6:4	0.6	0.4
12	6.5:3.5	0.65	0.35
13	7:3	0.7	0.3
14	7.5:2.5	0.75	0.25
15	8:2	0.8	0.2
16	8.5:1.5	0.85	0.15
17	9:1	0.9	0.1

5.6.2 Mikroemulze pro testování biologických vlastností esenciálních olejů

Pro studium antimikrobních a cytotoxických vlastností mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů byla použita formulace uvedená v Tab. 8. Tato formulace byla zvolena na základě fázových diagramů a chování mikroemulzí tak, aby byla zajištěna stabilita a stejné složení všech testovaných mikroemulzí. Rovněž byly připraveny dva typy referenčních vzorků, první byl tvořen mikroemulzí obsahující etanol a Tween 20, ve které nebyl přítomen esenciální olej, druhý referenční vzorek obsahoval vodný roztok Tweenu 20 o stejné koncentraci, jaká byla použita v mikroemulzních.

Tab. 8. Složení mikroemulzí použitých pro antimikrobní a cytotoxické testování.

Hmotnosti složek [g]		
Směs olej/etanol 1:1	Tween 20	Voda
0.2	0.8	9

5.6.3 Grafické znázornění tříložkových soustav

Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce, složení tříložkových systémů bývá zobrazováno pomocí pseudoternárních fázových diagramů (viz Obr. 12). Tyto fázové diagramy využívají toho, že dva ze tří koncentračních údajů (molární nebo hmotnostní procenta) jsou nezávisle proměnné a mohou být vynášeny na dvě osy, které svírají v trojúhelníkovém diagramu úhel 60 ° nebo 90 °. [54]

Na jednotlivé strany trojúhelníku jsou vynášena množství daných látek v procentech (případně hmotnostních zlomcích) tak, že jejich hodnoty vzrůstají směrem k vrcholům. Tyto vrcholy představují čisté složky. Strany trojúhelníku znázorňují složení binárních soustav a body uvnitř diagramu představují složení tříložkové soustavy. [54]

Mikroemulze připravené v experimentální části této práce byly složeny z kapalných fází o třech omezeně mísitelných složkách. Těmito složkami jsou 1. esenciální olej s etanolem; 2. Tween 20 (respektive Tween 60 nebo Tween 80); 3. voda nebo voda ve směsi s propylenglykolem (v poměru 3:2 a 1:1). Ze získaných údajů byly sestrojeny fázové diagramy, ve kterých binodální křivka rozděluje mikroemulzní, homogenní oblast od oblasti heterogenní.

5.6.3.1 Výpočet hodnot pro sestrojení fázových diagramů

Hodnoty potřebné pro sestrojení fázových diagramů byly vypočteny podle vztahů (4) – (7):

$$W_A = \frac{m_A}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (4)$$

$$W_B = \frac{m_B}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (5)$$

$$W_C = \frac{m_C}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (6)$$

$$W_A + W_B + W_C = 1 \quad (7)$$

Kde:

W_A , W_B , W_C – hmotnostní zlomky jednotlivých složek mikroemulze;

m_a , m_b , m_c – hmotnosti jednotlivých složek mikroemulze [g].

5.6.4 Analýza esenciálních olejů pomocí plynové chromatografie

Vzorky pro analýzu byly připraveny rozpuštěním 150 mg esenciálního oleje v 5 ml methanolu. V případě citronového oleje fy Nobilis Tilia byl jako rozpouštědlo použit n-hexan, jelikož při použití metanolu jako rozpouštědla nebyl tento olej úplně rozpuštěn, roztok byl zakalen a došlo k separaci na dvě fáze. Analýza byla provedena na plynovém chromatografu Master Fast GC vybaveném plamenově-ionizačním detektorem (FID) a kolonou Zebron ZB 5MS (Phenomenex). Nástřikový objem činil 1 μ l. Pro analýzu byl použit teplotní program složený z následujících kroků: 1. počáteční teplota 65 °C, teplotní gradient z 65 do 270 °C rychlostí 8 °C·min⁻¹; 2. izotermální analýza 5 min. Teplota injektoru byla nastavena na 200 °C a teplota detektoru na 290 °C. Průtok nosného plynu činil 25 ml·min⁻¹ při splitovacím poměru 1:25. Naměřené výsledky byly vyhodnoceny použitím chromatografického softwaru Clarity. Pro kvalitativní vyhodnocení byly porovnány retenční časy elučních píků s retenčními časy standardů (linalool, limonen, eugenol, karvakrol, cinnamaldehyd, thymol). Pro identifikaci některých složek byly rovněž použity informace z literatury. Kvantitativní zastoupení aktivních látek bylo vyhodnoceno metodou vnitřní normalizace. Provedením opětovné analýzy vzorku citronového oleje fy Biomedica byla zjištěna opakovatelnost stanovení. Odchylna měření pro malý počet paralelních stanovení byla vyhodnocena na základě Dean a Dixonova postupu pomocí rovnice (8), (9) a (10):

$$S = k_n \cdot R, \quad (8)$$

$$R = x_{max} - x_{min}, \quad (9)$$

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100, \quad (10)$$

kde:

k_n – Dean-Dixonův koeficient

R – rozpětí

\bar{x} – průměrná hodnota

5.6.5 Charakterizace mikroemulzí

Mikroemulze byly vizuálně pozorovány a byla hodnocena přítomnost nebo absence zákalu po smíchání složek v příslušném poměru. Dále byla měřena velikost jejich částic fotonovou korelační spektroskopií pomocí přístroje Zetasizer Nano SZ.

Pro stanovení velikosti částic připravených emulzí, filtrovaných přes filtr o velikosti pórů 0.22 μm byl připraven vzorek odpipetováním 1 ml neředěné mikroemulze do plastové kyvety. Aby byla zajištěna konstantní teplota vzorku, kyveta byla uzavřena víčkem a přímo v přístroji byla ekvilibrována po dobu pěti minut. Měření bylo prováděno při 25 °C a byly použity následující vstupní údaje nutné pro výpočet velikosti částic: viskozita disperzního média 0.887 cP (voda), index lomu disperzního média 1.33 a index lomu dispergovaného podílu 1.44. Pomocí distribuce velikosti částic byla sledována i stabilita připravených mikroemulzí, kdy byly naměřené výsledky srovnány s výsledky získanými po šesti týdnech skladování. Mimo velikosti částic byla stabilita mikroemulze hodnocena i vizuálně.

5.6.6 Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí obsahujících esenciální oleje

5.6.6.1 Složení a příprava mikroemulzí pro zkoušení antimikrobních vlastností

Pro antimikrobní zkoušení byly připraveny mikroemulze na základě informací získaných ze sestavených fázových diagramů. Koncentrace esenciálních olejů použitých pro biologické testy jsou uvedeny v Tab. 9. Mikroemulze byly připraveny podle postupu, který je popsán výše, tzn., že ke směsi esenciálního oleje a etanolu byl přidán surfaktant a takto vzniklá směs byla homogenizována na třepačce. Po té k ní bylo přidáno známé množství deminera-

lizované vody. Před samotným antimikrobním testováním byly připravené mikroemulze přefiltrovány přes sterilní filtr s velikostí pórů 0.22 μm do zkumavky vysterilizované UV zářením. Filtrace byla provedena za účelem eliminace možné mikrobiální kontaminace. Připravené a přefiltrované mikroemulze byly následně ředěny bujónem na stanovené koncentrace. Tyto koncentrace byly pro všechny testované oleje stejné (Tab. 9).

Tab. 9. Koncentrace EO v testovaných mikroemulzích a pipetované objemy pro jejich přípravu.

Vzorek	Koncentrace esenciálního oleje [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Pipetovaný objem mikroemulze [μl]	Pipetovaný objem bujónu [μl]
1	10000	Neředěná mikroemulze	
2	8500	2500	450
3	6500	1950	1050
4	5000	1500	1500
5	3500	1050	1950
6	1500	450	2550
7	500	150	2850

5.6.6.2 Kultivační médium

Pro přípravu inokula buněk a naředění mikroemulzí byl použit nutrient broth bujón. Byl připraven tak, že k 2.6 g směsi nutrient broth bylo přidáno 200 g demineralizované vody. Takto připravený bujón byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min, následně asepticky rozpipetován do sterilních zkumavek a uchováván v chladničce při teplotě (4 ± 2) °C.

5.6.6.3 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny očkováním vybraných mikroorganismů do 5 ml bujónu. Tyto bakteriální suspenze byly uchovávány 24 hod při teplotě 30 °C (v případě *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus cereus*) nebo stejnou dobu při 37 °C (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*).

5.6.6.4 Sledování účinku mikroemulzí obsahujících esenciální oleje na vybrané bakterie

Pro sledování antimikrobních vlastností mikroemulzí byla použita diluční metoda. Vypočtené objemy mikroemulzí uvedené v Tab. 9 byly pipetovány do vysterilizovaných zkumavek a doplněny připraveným bujónem. Celkový objem směsi byl 3 ml. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno nejprve 5 μl bakteriálních suspenzí a následně 200 μl připravených mikroemulzních roztoků. Mikrotitrační destička obsahovala 12 sloupců a 8 řad. Do řad destičky byly pipetovány roztoky mikroemulzí a do sloupců dané bakteriální suspenze. První řada obsahovala pouze čistý bujón. Tato řada sloužila jako pozitivní reference. Do druhé řady byla napipetována neředěná mikroemulze o koncentraci 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do dalších řad byly postupně pipetovány připravené mikroemulzní roztoky s koncentracemi od 8500 po 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. První dva sloupce nebyly zaočkovány žádným mikroorganismem, tyto sloupce sloužily jako negativní reference. Bakterie byly očkované až od třetího sloupce vždy po dvou sloupcích. Zaočkování dvou řad bylo provedeno pro lepší interpretaci výsledků. Takto připravené mikrotitrační destičky byly zakryty víčkem, vloženy do přístroje Infinite M200 Pro NanoQuant, který udržoval konstantní teplotu 30 °C. Po dobu 24 hod byl v 30 min intervalech spektrofotometricky měřen zákal bakteriální suspenze při vlnové délce 655 nm (OD_{655}). Před samotným měřením byla destička protřepána. Jak již bylo uvedeno výše, byla použita následující koncentrační řada: 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vedle uvedených koncentrací mikroemulzí byl dále testován i referenční vzorek, ve kterém nebyl přítomen esenciální olej, pouze etanol a surfaktant. Přístroj Infinite M200 Pro NanoQuant byl vybaven softwarem Microplate Reader i-control™. Získané hodnoty z tohoto měření byly použity k sestavení růstových křivek a následně k vyhodnocení indexu růstu. Index růstu IR byl stanoven jako podíl růstu bakterií s příslušnou koncentrací mikroemulze a růstu bakterií v čistém kultivačním médiu. Index růstu byl vypočítán podle vztahu (11) [55]:

$$IR(\%) = \left(\frac{OD_{655} - OD_{NK}}{OD_{PK}} \right) \cdot 100, \quad (11)$$

kde

IR – index růstu;

OD_{655} – hodnota zákalu suspenze testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze;

OD_{NK} – hodnota zákalu negativní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze;

OD_{PK} – hodnota zákalu pozitivní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze.

5.6.7 Cytotoxicita mikroemulzí obsahujících esenciální oleje

K testování cytotoxicity byly vybrány stejné druhy mikroemulzí s esenciálními oleji, které byly použity při jejich testování na antimikrobní účinnost. Lišila se pouze zvolená koncentrační řada, kdy byly koncentrace uvedené v Tab. 9 nahrazeny níže uvedenými koncentracemi. Test cytotoxicity byl proveden na embryonálních myších fibroblastech (ATCC CRL-1658 NIH/3T3). Jako kultivační médium bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ke kterému bylo přidáno 10 % fetálního bovinního séra a směs penicillinu/streptomycinu o 100 U/ml ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Testované vzorky mikroemulzí byly zředěny kultivačním médiem na koncentrace 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 a $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Testování bylo provedeno podle normy EN ISO 10993-5 s drobnými úpravami [56]. Buňky byly nejdříve prekulturnovány po dobu 24 hod v médiu, které bylo následně nahrazeno mikroemulzemi naředěnými na výše uvedené koncentrace. Pro srovnání byla připravena rovněž mikroemulze bez přítomnosti esenciálních olejů a vodný roztok Tweenu 20. Jako reference bylo použito čisté kultivační médium bez testovaných složek. Po přidání mikroemulzí byly buňky opět 24 hodin kultivovány v inkubátoru Heracell 150i. K posouzení cytotoxického účinku byl použit MTT test a testování bylo provedeno po jednodenní kultivaci buněk v přítomnosti jednotlivých koncentrací mikroemulzí. Po této kultivaci byly mikroemulze z jamek s buňkami odsáty, bylo přidáno čisté médium a MTT o koncentraci $0.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ média. Buňky s MTT byly opět po čtyři hodiny kultivovány. Po uplynutí této doby byl přidán dimethylsulfoxid a po patnácti minutách bylo provedeno již vlastní stanovení cytotoxicity. Množství živých buněk bylo stanoveno spektrofotometricky přístrojem Infinite M200 Pro NanoQuant, při vlnové délce 570 nm. Všechny testy byly provedeny čtyřikrát. Pro odstranění odlehlých hodnot byl použit Dixonův Q test, pro vyhodnocení byly použity pouze střední průměrné hodnoty. Podle požadavků mezinárodní normy ISO 10993-5 byla použita následující stupnice cytotoxického účinku testovaných vzorků:

- necytotoxický účinek: množství viabilních buněk vyšší než 80 %;
- slabě cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 60 – 80 %;
- středně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 40 – 60 %;
- silně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk menší než 40 %.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Fázové diagramy – grafické znázornění soustav o třech složkách

Vznik a chování mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů byly studovány a popsány pomocí fázových diagramů. Pro sestrojení fázových diagramů byly jednotlivé vzorky připraveny způsobem popsáním v kapitole 5.6.1.

Cílem práce [57] bylo, mimo jiné, připravit mikroemulze s obsahem esenciálních olejů. To se však nezdařilo a vzniklé systémy měly charakter klasických emulzí. Z tohoto důvodu se předložená diplomová práce soustředila na nalezení optimálního zastoupení jednotlivých složek, při kterém by mikroemulze vznikla. Nejprve byla proto testována možnost připravit mikroemulze se surfaktantem Tween 60 a oleji firmy Nobilis Tilia. V přítomnosti Tweenu 60 byla úspěšná pouze formulace stabilních mikroemulzí citronového a skořicového oleje, kde vodnou fází tvořila demineralizovaná voda. V dalším kroku byl k vodě přidán propylenglykol v poměru 1:1. Přídavek propylenglykolu však neprokázal předpokládané zlepšení solubilizačních vlastností vodné fáze a vznikla pouze jediná stabilní mikroemulze, a to opět z citronového oleje. Stejným způsobem byly připraveny i mikroemulze s esenciálními oleji firmy Biomedica s obdobnými výsledky. Tween 60 byl v dalších testech zaměněn za Tween 80. Za přítomnosti Tweenu 80 vznikla pouze jediná mikroemulze (s oleji od firmy Biomedica i Nobilis Tilia), a to mikroemulze citronového oleje. Po neúspěších připravit celou sadu stabilních mikroemulzí studovaných olejů byl na základě informací z literatury vybrán další ze surfaktantů, a to Tween 20. V prvním kroku byla jako vodná fáze pouze demineralizovaná voda. Takovým způsobem byly úspěšně připraveny stabilní mikroemulze se všemi výše popsanými oleji obou firem. V další části práce bylo testováno, jak ovlivní stabilitu a složení mikroemulzí přítomnost solubilizátoru, propylenglykolu, který byl přidán v poměru $H_2O:PG$ 1:1 a $H_2O:PG$ 3:2. Po provedení experimentu bylo zjištěno, že všechny mikroemulze, kde byl ve vodné fázi PG přítomen, vykazovaly dobrou stabilitu.

V dalším kroku byly při přípravě mikroemulzí použity i samotné aktivní látky přítomné ve studovaných olejích. Šlo o cinnamaldehyd, limonen, karvakrol, linalool, eugenol a thymol. Nejdříve, obdobně jako v případě mikroemulzí olejů, byl použit Tween 60, který však nebyl schopen vytvořit stabilní mikroemulzi s žádnou z uvedených aktivních látek. Proto byl použit opět Tween 20, v jehož přítomnosti byly připraveny dvě stabilní mikroemulze, a to s linaloleem a eugenolem. V obou těchto případech tvořila vodnou fází pouze demineralizovaná voda. Vodná fáze tvořená $H_2O:PG$ v poměru 1:1 navýšila počet připrave-

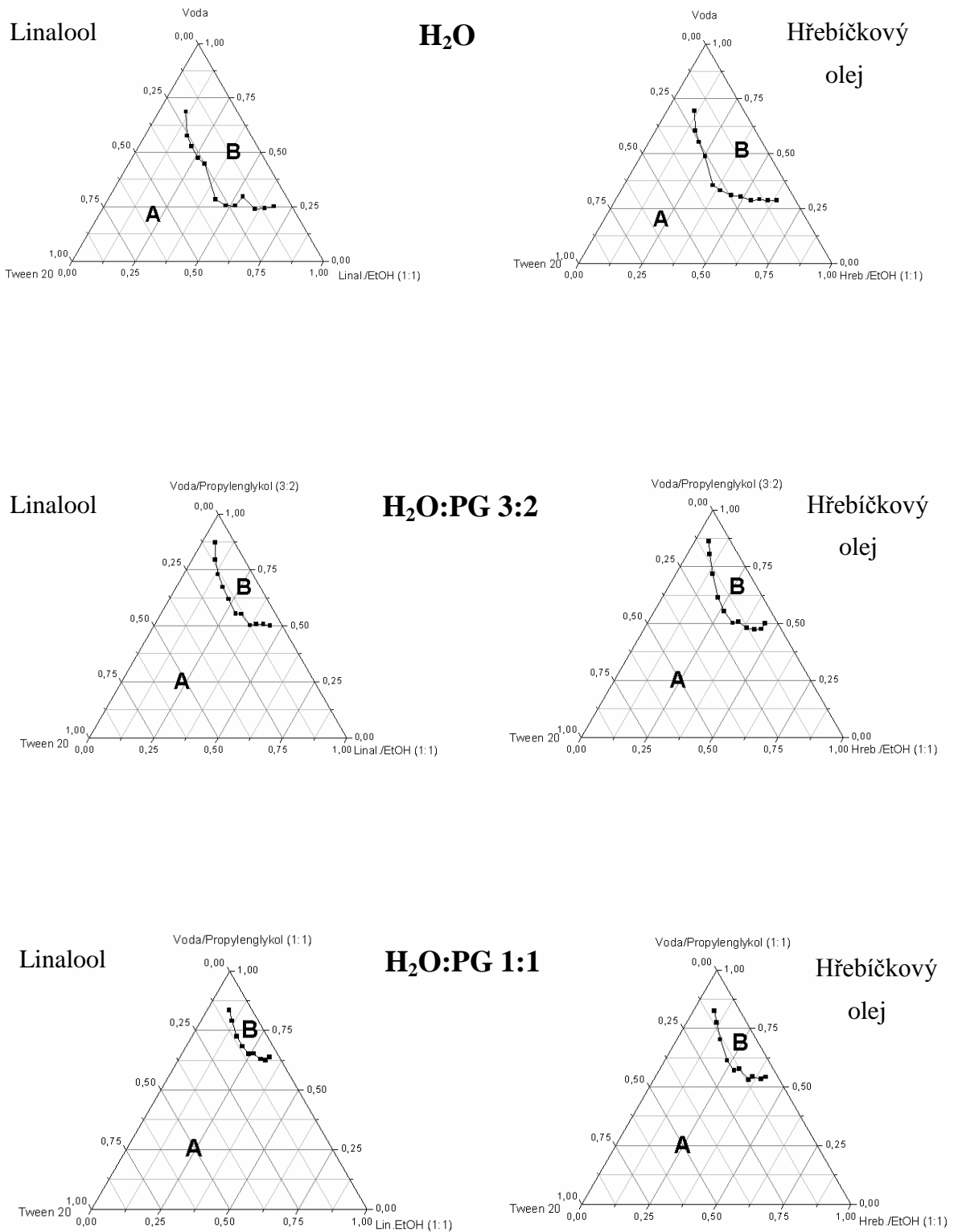
ných stabilních mikroemulzí na pět. Stabilní nebyla pouze mikroemulze obsahující thymol. Aby bylo v mikroemulzích co nejméně propylenglykolu, byl jeho obsah snížen a byl použit poměr H₂O:PG 3:2. Použitím této vodné fáze se snížil počet připravených stabilních mikroemulzí z pěti na čtyři, a to mikroemulze obsahující cinnamaldehyd, limonen, linalool a eugenol.

Na základě informací zjištěných při hledání složení emulzního systému s omezenou a neomezenou mísitelností byly sestrojeny fázové diagramy. Postup při sestrojování těchto diagramů je popsán v kapitole 5.5.2. této práce. Příklady diagramů znázorňujících největší vliv propylenglykolu jako solubilizátoru jsou uvedeny na Obr. 13. Jak je zřejmé, plochy diagramů jsou rozděleny binodální křivkou na dvě oblasti, a to homogenní (označenou písmenem A) a heterogenní (označenou písmenem B). Homogenní oblastí je oblast výskytu mikroemulzí, heterogenní oblast je charakteristická výskytem běžných emulzí. Jak je patrné z obrázků, propylenglykol pozitivně působil na zvětšení mikroemulzních oblastí. U všech mikroemulzí s esenciálními oleji s výjimkou citronového oleje bylo pozorováno zmíněné rozšíření mikroemulzní homogenní fáze. Chování citronového oleje je patrné z obrázků v příloze P I. Srovnáním fázových diagramů bylo zjištěno, že největší oblasti neomezené mísitelnosti v mikroemulzích s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou byly pozorovány v případě hřebíčkového a skořicového oleje. Přídavkem propylenglykolu (poměr H₂O:PG 3:2) došlo k dalšímu zvětšení mikroemulzní plochy u všech testovaných olejů s výjimkou oleje citronového. Největší mikroemulzní oblast byla pozorována v případě hřebíčkového a skořicového oleje (stejně jako v čisté vodě). Mikroemulzní oblast se stále zvětšila v případě vodné fáze tvořené H₂O:PG 1:1. Složení vodné fáze mělo tedy opět největší vliv na velikost homogenní oblasti mikroemulzí hřebíčkového a skořicového oleje. U ostatních mikroemulzí došlo pouze k nepatrnému rozšíření homogenní oblasti a přídavek propylenglykolu neměl žádný, nebo jen minimální vliv. Fázové diagramy dokumentující vliv propylenglykolu na mikroemulze obsahující tymiánový olej je znázorněn v příloze P II.

Výše popsané fázové chování mikroemulzí s propylenglykolem ve vodné fázi bylo obdobné v případě olejů firmy Biomedica i Nobilis Tilia. Přídavek propylenglykolu rovněž zvyšoval množství enkapsulovaného oleje při vzniku stabilních mikroemulzí. To lze pozorovat na mikroemulzích hřebíčkového a skořicového oleje. Například v případě skořicového oleje vznikl stabilní systém s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou při poměru Tweenu 20 a olejové fáze 0.8/0.2. Vodná fáze o složení H₂O:PG 3:2 umožnila zvýšit množství enkapsulovaného oleje a stabilní mikroemulze vznikla při poměru Tweenu 20 a olejové fáze

0.7/0.3 a konečně vodná fáze o složení H₂O:PG 1:1 způsobila, že stabilní mikroemulze vznikla již při poměru Tweenu 20 a olejové fáze 0.6/0.4. Odlišné chování jednotlivých olejů obou firem byly zaznamenány především v případě mikroemulzí obsahujících citronový olej. Citronový olej fy Nobilis Tilia byl enkapsulován v mikroemulzi při složení Tweenu 20 a olejové fáze 0.65/0.35, zatímco citronový olej poskytnutý fy Biomedica byl enkapsulován poměrem Tweenu 20 a olejové fáze 0.8/0.2. Pozitivní vliv přídavku propylenglykolu na zvětšení homogenní oblasti mikroemulzí nebyl potvrzen u enkapsulace tymiánového oleje fy Biomedica. Ve všech třech vodných fázích vznikaly stabilní mikroemulze při poměru Tweenu 20 a olejové fáze 0.7/0.3.

Podobně jako byl pozorován vliv propylenglykolu na zvětšování mikroemulzní oblasti esenciálních olejů, byl tento vliv pozorován i v případě aktivních látek. Nejmarkantnější rozdíly mezi jednotlivými plochami homogenních oblastí byly pozorovány v případě mikroemulzí obsahujících linalool a eugenol. Vliv zvyšování obsahu propylenglykolu (H₂O → H₂O:PG 3:2 → H₂O:PG 1:1) na množství enkapsulovaných aktivních látek měl následující trend (poměr Tweenu 20 a olejové fáze): 0.7/0.3 → 0.65/0.35 → 0.55/0.44.

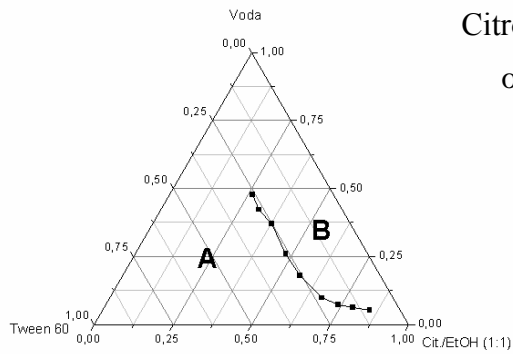


Obr. 13. Fázové diagramy tříložkového systému voda – olej – surfaktant, kde olejovou fází tvoří linalool (vlevo) a hřebíčkový olej (vpravo) s etanolem v poměru 1:1, vodná fáze je tvořena demineralizovanou vodou a vodou s propylenglykolem v poměru 3:2 a 1:1. Písmem A je označena mikroemulzní (homogenní) oblast, písmene B je označena heterogenní fáze.

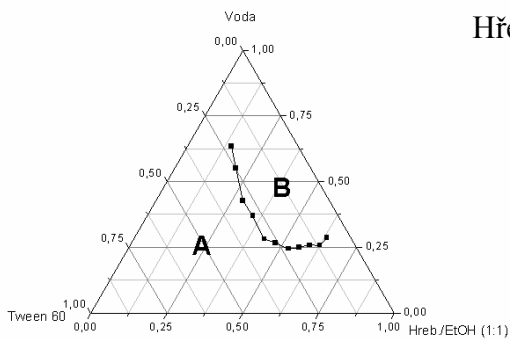
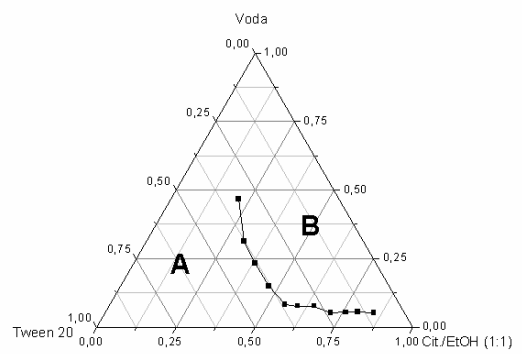
Podobně, jako bylo srovnáno fázové chování systémů s esenciálními oleji obou firem, byl srovnán i vliv použitých neionických surfaktantů na velikost mikroemulzní oblasti. Byly porovnávány surfaktanty Tween 20 a Tween 60 (Obr. 14 a 15). Mikroemulze se surfaktantem Tween 60 a esenciálním oleje fy Biomedica byly připraveny a charakterizovány již v práci [16].

Největší rozdíl mezi mikroemulzemi připravenými s Tweenem 20 nebo Tweenem 60 byl zaznamenán v případě enkapsulace citronového oleje. Větší mikroemulzní plocha vznikla při použití Tweenu 60. Fázové diagramy mikroemulzí s hřebíčkovým olejem vykazovaly stejnou homogenní plochu při použití obou Tweenů. U mikroemulzí se skořicovým olejem byla situace podobná jako u systémů s citronovým olejem a Tween 20 byl účinnějším surfaktantem. Fázové chování tymiánového oleje zůstalo beze změny.

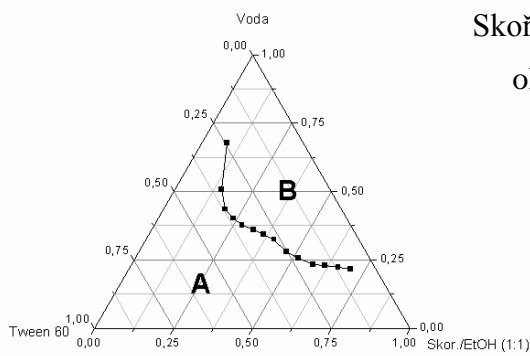
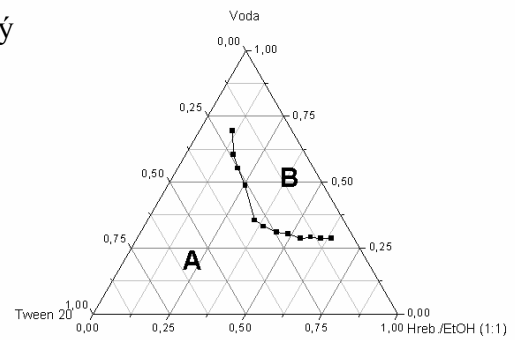
Analogické rozdíly mezi mikroemulzemi s esenciálními oleji fy Biomedica byly pozorovány i v případě vodné fáze tvořené $H_2O:PG$ v poměru 1:1. Největší rozdíl byl opět zaznamenán mezi mikroemulzemi s citronovým olejem a formulace s Tweenem 60 zajišťovala lepší mikroemulzní oblast. Na ostatních fázových diagramech pak nebyl pozorován výrazný rozdíl velikosti homogenních oblastí v případech obou použitých surfaktantů.



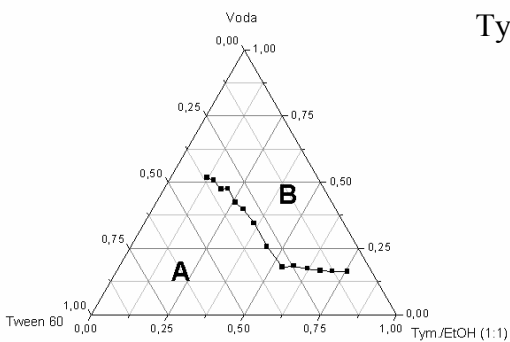
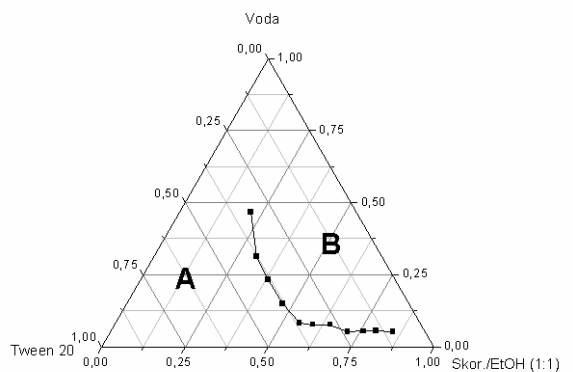
Citronový olej



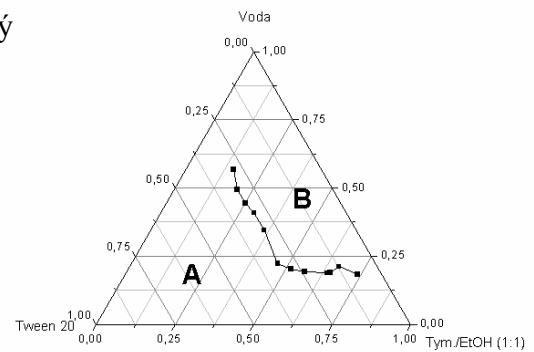
Hřebíčkový olej



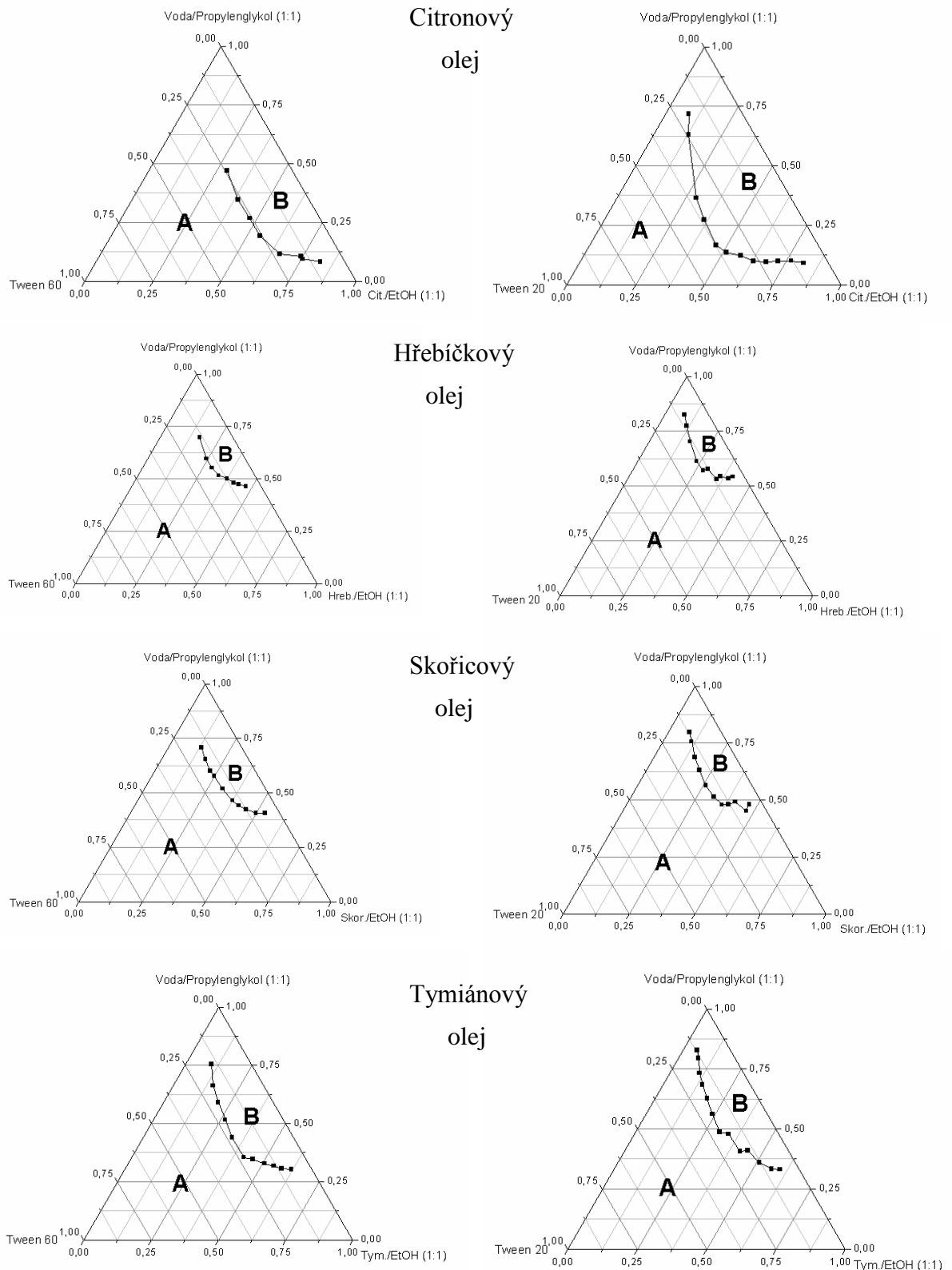
Skořicový olej



Tymiánový olej



Obr. 14. Srovnání vlivu použitých surfaktantů Tween 20 (vpravo) a Tween 60 (vlevo) na velikost homogenní oblasti (A) mikroemulzí s oleji fy Biomedica a vodnou fází tvořenou vodou.



Obr. 15. Srovnání vlivu použitých surfaktantů Tween 20 (vpravo) a Tween 60 (vlevo) na velikost homogenní oblasti (A) mikroemulzí s oleji fy Biomedica a vodnou fází tvořenou vodou s propylenglykolem v poměru 1:1.

6.2 Plynová chromatografie

Složení esenciálních olejů firmy Biomedica a Nobilis Tilia bylo stanoveno plynovou chromatografií. Získané chromatogramy byly vyhodnoceny jak z kvalitativního, tak kvantitativního hlediska. Cílem této části práce nebylo stanovit detailní složení použitých olejů, ale pouze identifikovat základní aktivní látky, jejich množství a najít případné rozdíly, které by mohly být příčinou odlišného chování olejů při formulaci mikroemulzí. Aktivní složky esenciálních olejů byly kvalitativně vyhodnoceny srovnáním retenčních časů elučních píků se standardy (cinnamaldehyd, karvakrol, linalool, limonen, eugenol a thymol). Ostatní složky byly identifikovány na základě informací dostupných z literatury a informací poskytnutých firmou Nobilis Tilia. Kvantitativní analýza byla provedena pomocí metody vnitřní normalizace. Identifikované látky a jejich množství jsou uvedeny v Tab. 10 – 13. Vzorek citronového oleje fy Biomedica byl analyzován dvakrát a opakovatelnost stanovení byla stanovena pomocí Dean – Dixonova testu pro malý počet stanovení. Bylo zjištěno, že obsah hlavní aktivní látky limonenu je $85.5 \pm 4.8 \%$.

Tab. 10. Vyhodnocení chromatogramu citronového oleje.

Identifikovaná látka	Obsah [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
α -pinen	2.3	1.9
Sabinen	1.0	1.8
β -pinen	4.5	1.2
N	N	12.6
N	< 1	2.0
Limonen	85.5	66.6
γ -terpinen	1.2	7.5
Neral	N	1.0
Geraniol	1.4	1.6

Kde: N – neidentifikovaná látka, n – neidentifikovatelné množství.

Tab. 11. Vyhodnocení chromatogramu hřebíčkového oleje.

Identifikovaná látka	Obsah [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
Eugenol	75.2	65.8
Karyofylen	3.5	5.3
N	1.1	1.3
Humulen	n	8.8
Eugenylacetát	2.7	< 1

Kde: N – neidentifikovaná látka, n – neidentifikovatelné množství.

Tab. 12. Vyhodnocení chromatogramu skořicového oleje.

Identifikovaná látka	Obsah [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
Limonen	10.9	n
Linalool	2.4	2.2
Neral	2.4	n
Cinnamaldehyd	45.7	60.6
Eugenol	2.5	16.2
Karyofylen	2.6	6.9
Viridiflorol	n	1.1

Kde: n – neidentifikovatelné množství.

Tab. 13. Vyhodnocení chromatogramu tymiánového oleje.

Identifikovaná látka	Obsah [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
α -pinen	3.6	1.5
Sabinen	1.2	1.8
β -pinen	1.2	n
Limonen	45.1	18.12
N	n	5.9
Linalool	5.2	3.9
N	n	2.2
N	10.1	n
Thymol	22.6	39.8
Karvakrol	5.9	2.1
Karyofylen	n	3.3

Kde: N – neidentifikovaná látka, n – neidentifikovatelné množství.

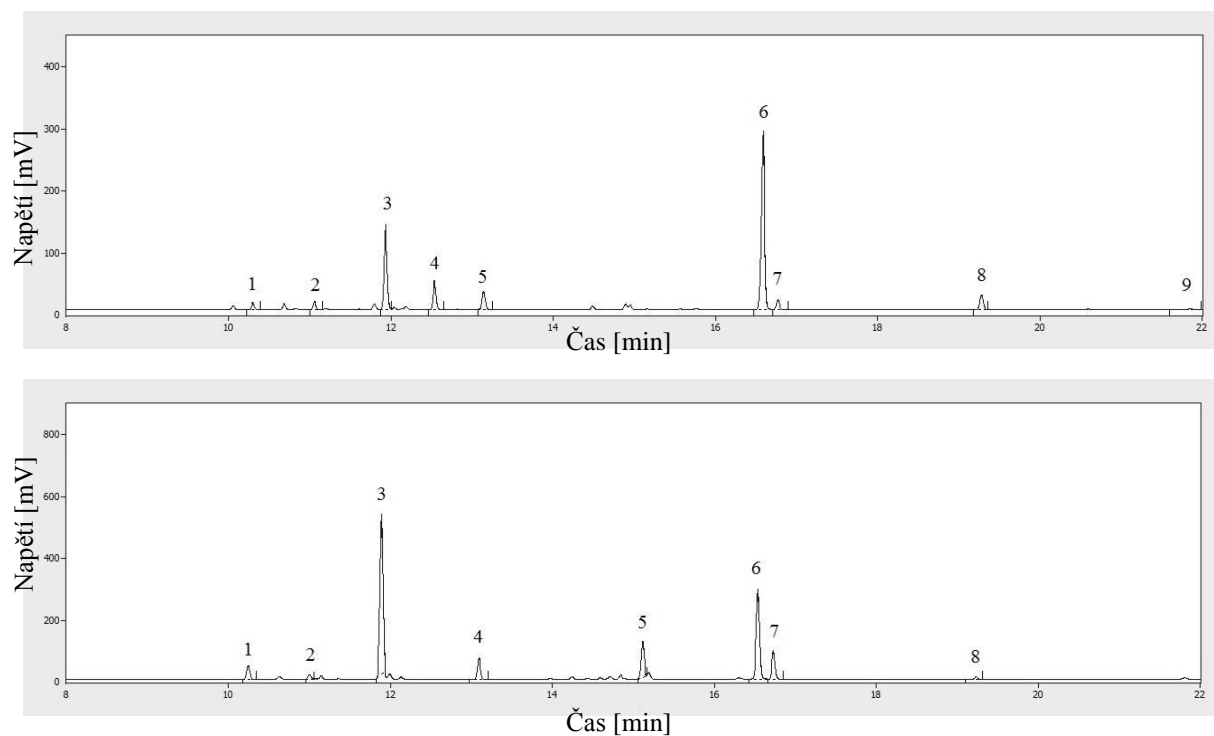
V Tab. 10 – 13 jsou popsány pouze aktivní substance a další složky přítomné v množství větším než 1 %. Ve dvou případech analyzovaných vzorků (citronový a hřebíčkový olej) firmy Biomedica bylo v jejich složení detekováno větší množství aktivních látek (limonen, eugenol), než ve vzorcích poskytnutých firmou Nobilis Tilia. Naopak tomu bylo v dalších dvou vzorcích, tedy ve vzorcích skořicového a tymiánového oleje, kde byla větší množství aktivních látek (cinnamaldehyd, thymol) identifikována ve vzorcích firmy Nobilis Tilia. Co se týká ostatních detekovaných složek, nelze jednoznačně určit, zda jejich množství a počet byly větší nebo menší ve vzorcích olejů dodaných oběma firmami. Například, v případě vzorku citronového oleje z Nobilis Tilia, bylo identifikováno 12.6 % neznámé látky, která ve vzorku téhož oleje z firmy Biomedica nebyla zastoupena vůbec. Stejný příklad nastal v případě vzorku tymiánového oleje (Biomedica), ve kterém bylo identifikováno 10.1 % neznámé složky. Ve vzorku stejného oleje z Nobilis Tilia tato látka nebyla zastoupena vůbec. Je tedy možné, že tyto rozdíly, jak v obsahu hlavních aktivních složek, tak v minoritních složkách, mohly být příčinou odlišného chování jednotlivých olejů při vzniku příslušných mikroemulzí.

Největší počet složek byl identifikován v tymiánovém oleji, kde bylo nalezeno osm látek v množství větším než 1 %. Nejméně, čtyři látky, byly identifikovány v oleji hřebíčkovém. Srovnáním tymiánového oleje obou firem lze konstatovat, že olej firmy Biomedica obsahuje oproti oleji z Nobilis Tilia mnohem více limonenu, ale málo thymolu. Opačně tomu je v případě oleje Nobilis Tilia, kde bylo stanoveno menší množství limonenu (83 % v oleji Biomedica; 67 % v oleji Nobilis Tilia) a větší množství thymolu (23 % v oleji Biomedica; 40 % v oleji Nobilis Tilia). Grafické znázornění příslušných chromatogramů tymiánového oleje je uvedeno na Obr. 16. Další rozdíly ve složení olejů obou firem byly pozorovány i v případě skořicového oleje (Obr. 17). V oleji fy Nobilis Tilia byla zaznamenána absence limonenu, který byl naopak v oleji Biomedica zastoupen téměř v 11 %. Dále olej z Nobilis Tilia obsahoval více cinnamaldehydu a eugenolu. Ve zbývajících dvou případech (citronový a hřebíčkový olej) nebyly ve složení olejů obou dodavatelů zaznamenány větší rozdíly týkající se identifikovaných složek nebo jejich množství.

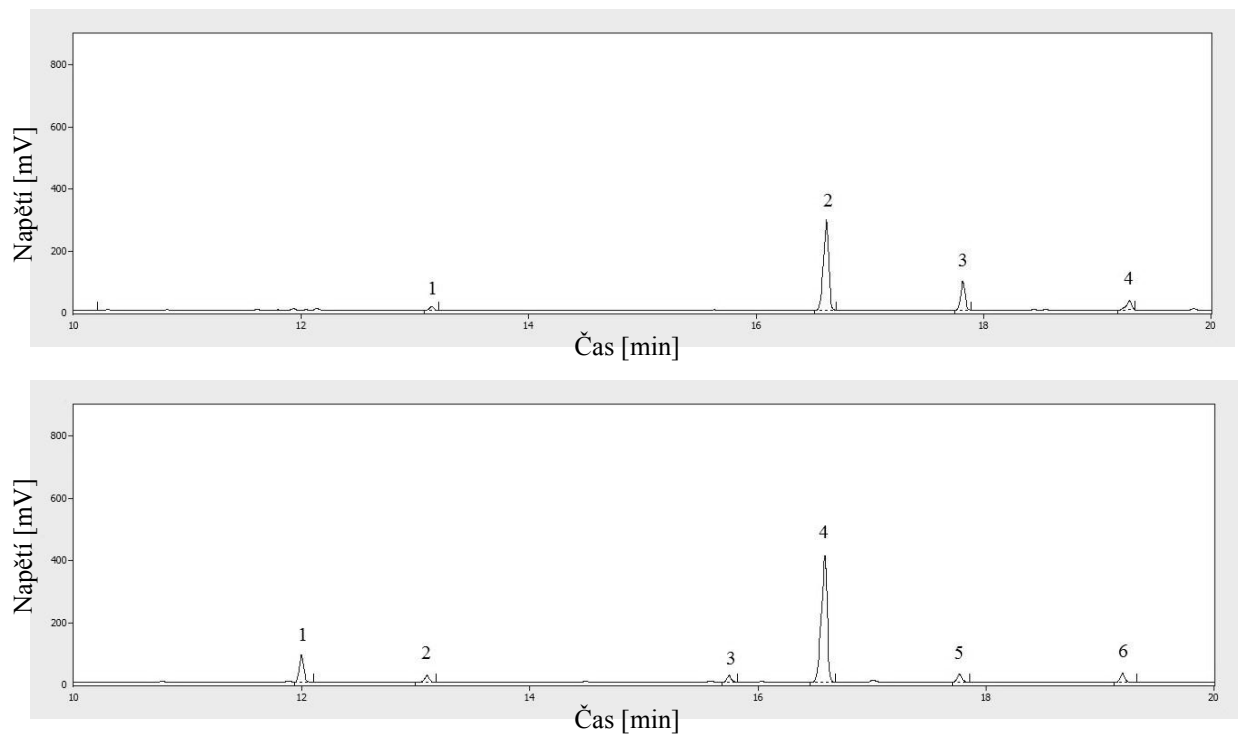
Nejdříve eluovanou aktivní látkou z analyzovaných esenciálních olejů byl limonen, jehož retenční čas byl ca 12 min. Naopak nejdelší retenční čas byl zaznamenán pro eugenol obsažený v hřebíčkovém a skořicovém oleji (ca 17.8 min).

Díky tomu, že esenciální oleje jsou látky přírodního charakteru, je jejich složení velmi proměnlivé a závislé na místě původu, části rostliny, ze které je olej získáván, nebo také na ročním období, kdy jsou rostliny zpracovány. Proto bylo těžké porovnávat informace týkající se složení olejů z literatury, kdy byla například jedna látka v oleji z kůry skořicovníku detekována v minimálním množství, zatímco druhý olej z téže části rostliny, ale z jiné oblasti, obsahoval této látky jednotky až desítky procent.

Pro přesnější stanovení složení použitých olejů by bylo vhodnější použít k analýze plynový chromatograf s hmotnostním detektorem a podle příslušné knihovny spekter provést detailní identifikaci neznámých složek.



Obr. 16. Chromatogramy tymiánového oleje. Olej fy Nobiles Tilia **nahore** (1 – α -pinen, 2 – sabinen, 3 – limonen, 4 – neznámá látka, 5 – linalool, 6 – thymol, 7 – karvakrol, 8 – karyofylen), olej fy Biomedica **dole** (1 - α -pinen, 2 – sabinen, 3 - limonen, 4 – linalool, 5 – neznámá látka, 6 – thymol, 7 – karvakrol).



Obr. 17. Chromatogramy skořicového oleje. Olej fy Nobilis Tilia **nahoře** (1 – linalool, 2 – cinnamaldehyd, 3 – eugenol, 4 – karyofylen), olej y Biomedica **dole** (1 – limonen, 2 - linalool, 3 – neral, 4 – cinnamaldehyd, 5 – eugenol, 6 – karyofylen).

6.3 Charakterizace mikroemulzí – velikost částic

Charakterizace připravených mikroemulzí byla provedena stanovením velikosti částic na vzorcích, jejichž složení odpovídalo vzorkům použitým pro další testování antimikrobních vlastností a cytotoxicity. Před měřením byly vzorky filtrovány filtrem s velikostí pórů 0.22 μm pro případnou eliminaci nečistot a mikrobiálního znečištění. Jelikož mikroemulze obsahovaly surfaktant Tween 20, je pravděpodobné, že při filtraci došlo ke vzniku vzduchových mikrobublin, což se projevilo při měření velikosti mikroemulzních částic. Aby byly odstraněny mikrobubliny vzniklé při filtraci, byly mikroemulze ponechány po určitou dobu (viz dále) v klidu a po této době analyzovány pomocí PCS. Každý vzorek byl měřen třikrát. Pro stanovení stability byly mikroemulze skladovány po dobu šesti týdnů při laboratorní teplotě. Po této době byla opět proměřena jejich velikost částic s cílem zjistit, zda nedošlo k rozpadu mikroemulzí nebo ke zvětšení jejich částic. Velikost částic byla stanovena pouze u mikroemulzí, kde bylo disperzní prostředí tvořeno pouze demineralizovanou vodou. Nastavit podmínky pro měření mikroemulzí obsahujících propylenglykol v různém množství bylo nad rámec této práce a provedení experimentu by vyžadovalo by delší čas. Byly tedy charakterizovány mikroemulze obsahující všechny oleje Nobilis Tilia a Biomedica, mikroemulze obsahující aktivní látky (linalool a eugenol) a dva referenční vzorky. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 14 a 15. Jak již bylo popsáno v kapitole 2.3, rozmezí velikost částic tvořící mikroemulzní systémy je 5 – 140 nm. Jak je patrné z Tab. 14 a 15, velikosti částic připravených mikroemulzí byla stanovena na 8 – 11 nm, což tomuto rozmezí vyhovuje. Vzhledem k tomu, že mikroemulze byly filtrovány přes filtr s velikostí pórů 0.22 μm , nelze předpokládat, že by filtrace mohla velikost částic ovlivnit.

Mikroemulze byly mimo velikost částic také hodnoceny vizuálně. Toto posouzení ukázalo, že zvolené složení mikroemulzí pro testování biologických vlastností zajišťuje transparentnost, homogenitu a ve vzorcích nedocházelo k tvorbě zákalu, ani po 6 týdnech skladování při laboratorní teplotě.

Tab. 14. Velikost částic v mikroemulzích stanovená PCS (filtrováno přes 0.22 μm filtr).

Olej v mikroemulzi	Velikost částic [nm]			
	Biomedica		Nobilis Tilia	
	Po přípravě	Po 6 týdnech	Po přípravě	Po 6 týdnech
Citronový olej	8.6 ± 0.1	7.4 ± 0.1	8.2 ± 0.1	8.2 ± 0.1
Hřebíčkový olej	9.9 ± 0.1	10.1 ± 0.1	9.5 ± 0.1	9.9 ± 0.1
Skořicový olej	8.8 ± 0.1	5.5 ± 0.1	8.9 ± 0.1	8.6 ± 0.1
Tymiánový olej	9.4 ± 0.1	8.9 ± 0.1	11.0 ± 0.1	10.9 ± 0.1

Tab. 15. Velikost částic v mikroemulzích stanovená PCS (filtrováno přes 0.22 μm filtr).

Olej v mikroemulzi	Velikost částic [nm]	
	Po přípravě	Po 6 týdnech
Linalool	9.6 ± 0.1	9.1 ± 0.1
Eugenol	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.1
Reference 1	7.8 ± 0.1	8.2 ± 0.1
Reference 2	7.5 ± 0.1	7.8 ± 0.1

Kde: Reference 1 – mikroemulze bez EO, reference 2 – mikroemulze bez EO a etanolu.

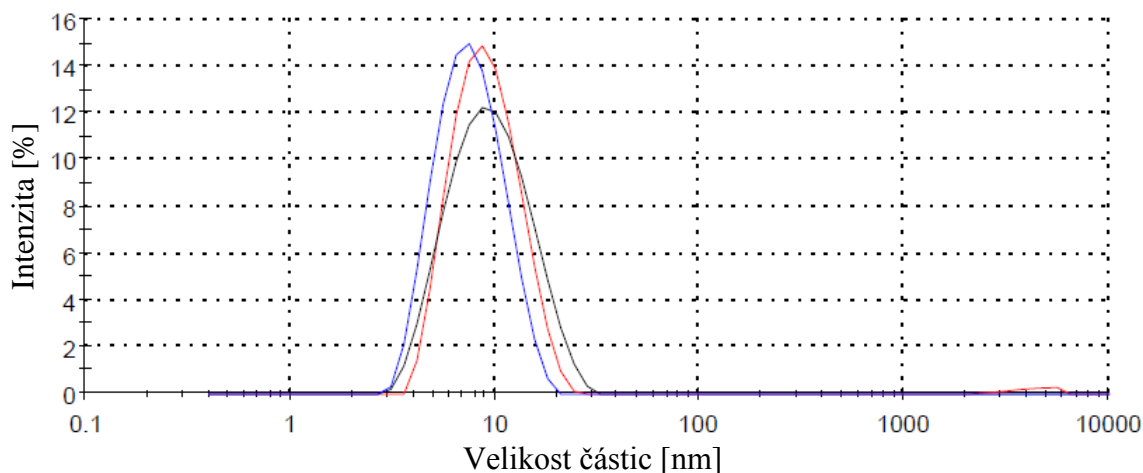
Jak již bylo uvedeno výše, vzorky byly vzhledem k nutnosti eliminace mikrobublin vzniklých filtrací měřeny po určitém čase od přípravy. Například mikroemulze se skořicovým olejem Biomedica byla měřena ihned po filtraci. Výsledky ukázaly, že mikroemulze obsahuje mimo očekávanou populaci částic s velikostí v řádu desítek nanometrů i částice o velikosti 350 nm. Tentýž vzorek byl znovu měřen po dvaceti hodinách, tentokrát s výsledkem dokumentujícím přítomnost pouze jedné populace mikročástic s velikostí v očekávaném intervalu. Mikroemulze s citronovým olejem byla měřena stejným způsobem a po dvaceti hodinách byly přítomny kromě mikroemulzních částic rovněž částice o velikosti 330 nm. O 96 hodin později byly ve stejném vzorku stále přítomny částice o 200 nm a k jejich vymizení nedošlo ani po čtyřech dnech. Z toho lze usuzovat, že tato mikroemulze obsahuje kromě mikroemulzních částic rovněž stabilní populaci s velikostí řádově stovky nanometrů. V mikroemulzích obsahujících

hřebíčkový a tymiánový olej firmy Biomedica byly po třech dnech přítomny pouze mikroemulzní částice, tzn. částice o velikosti 9.4 až 9.8 nm.

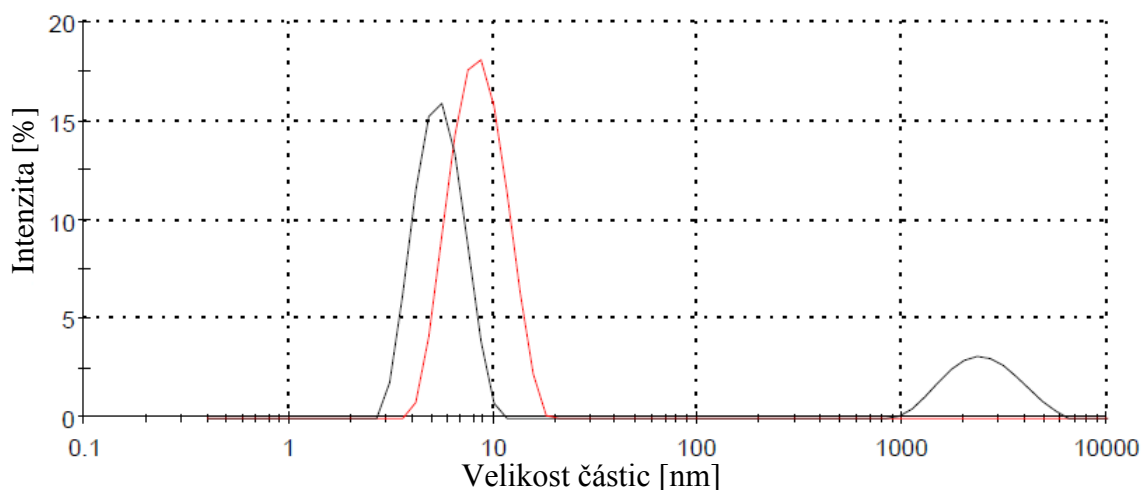
V sérii mikroemulzí připravených s oleji Nobilis Tilia byly v případě hřebíčkového a skořicového oleje naměřeny částice o velikosti 8.9 – 9.5 nm. V mikroemulzi s citronovým olejem Nobilis Tilia byly přítomny i po třech dnech mimo mikroemulzních částic i částice o velikosti 340 nm. Tyto částice představovaly 25 % všech částic v mikroemulzi. Velké částice byly stanoveny i v mikroemulzích obsahujících tymiánový olej. V tomto vzorku byly po třech dnech částice s velikostí 1200 nm. Tato populace však představovala pouze 8 % z celkového množství částic.

Očekávaná velikost částic (9.6 nm) byla stanovena i ve vzorku mikroemulze s linaloleem. Mikroemulze obsahující eugenol obsahovaly ihned po přípravě a filtraci částice o velikosti 4000 nm, avšak po 24 a 48 hodinách bylo měření opakováno a bylo zřejmé, že populace velkých částic postupně vymizela a ve vzorku zůstaly pouze 10 nm částice (Obr. 18). V referenčních vzorcích byla velikost částic shodná s velikostí částic detekovanou pro běžné mikroemulze obsahující esenciální oleje.

Po šesti týdnech byla analýza opakována. Po uvedené době skladování nejevily vzorky mikroemulzí s enkapsulovaným tymiánovým a hřebíčkovým olejem firmy Biomedica známky rozpadu a velikost jejich částic se nezměnila. V případě mikroemulze obsahující citronový olej Biomedica byly naměřeny kromě částic o velikosti 7.3 nm i částice s velikostí 120 nm. Největší změna během skladování byla zaznamenána u mikroemulzí obsahujících skořicový olej Biomedica. V tomto vzorku byly mimo mikroemulzních částic přítomny částice velké 2600 nm, což by nasvědčovalo jeho možnému rozpadu. Grafické srovnání velikosti částic v mikroemulzi obsahující skořicový olej je znázorněn na Obr. 19.



Obr. 18. Intenzitní distribuce velikosti částic mikroemulzí obsahujících eugenol (červená linka – vzorek po 24 hod, černá linka – vzorek po 48 hod a opětovné filtraci, modrá linka – po 6 týdnech).



Obr. 19. Intenzitní distribuce velikosti částic mikroemulze obsahující skořicový olej (červená linka – vzorek 20 hod po filtraci, černá linka – vzorek po šesti týdnech).

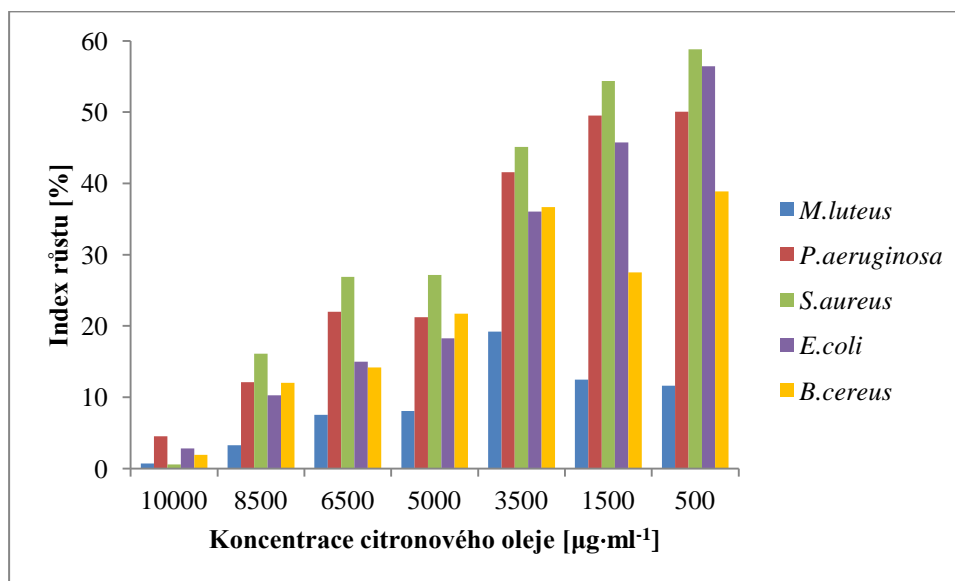
U vzorků mikroemulzí obsahujících tymiánový a skořicový olej Nobilis Tilia nebyly podle distribuce velikosti částic zaznamenány známky jejich rozpadu. V případě mikroemulzí obsahujících hřebíčkový a citronový olej stejného dodavatele byla identifikována přítomnost populace částic o velikosti 200 a 370 nm. Mikroemulze obsahující eugenol a linalool byly i po šesti týdnech stabilní, obsahovaly pouze částice velké 9.1 a 10 nm. Velikost částic se během skladování nezměnila ani u referenčních vzorků.

6.4 Antimikrobní testování mikroemulzí s esenciálními oleji

Inhibiční vliv esenciálních olejů enkapsulovaných v mikroemulzích byl sledován na třech gram-pozitivních (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Bacillus cereus*) a dvou gram-negativních (*Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*) bakteriích. Pro hodnocení antimikrobního účinku vybraných olejů byla zvolena diluční metoda. Ta je vhodná pro mikroemulze, protože jsou transparentní, čiré, neovlivňují tedy konečný výsledek odečtu zákalu bakteriální suspenze. Bakteriální růst byl hodnocen v tekutém bujónu jako intenzita zákalu buněčné suspenze měřená spektrofotometricky při vlnové délce 655 nm. Z naměřených údajů byly vypočteny průměrné hodnoty a z nich sestrojeny růstové křivky. Růst bakterií byl měřen po 48 cyklů, tzn., že byl měřen každých 30 min po dobu 24 hod. Byl rovněž vyhodnocen index růstu (IR), jehož numerická hodnota byla získána výpočtem pomocí Rov. (11). Index růstu byl vyhodnocován po 20 hod kultivace. Příklady růstových křivek jsou uvedeny v příloze P III-XI. Hodnoty indexu růstu byly graficky zpracovány a jsou uvedeny níže v textu. Pro zhodnocení vlivu jednotlivých olejů v mikroemulzích byly vybrány výsledky zaznamenané na výsledcích mikroemulzí obsahujících oleje firmy Biomedica.

6.4.1 Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

Index růstu bakterií v závislosti na testovaných koncentracích citronového oleje enkapsulovaného v mikroemulzích je znázorněn na Obr. 20. Podle očekávání, největší inhibiční účinek vykazovala mikroemulze s nejvyšší koncentrací citronového oleje $10000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při této koncentraci byl index růstu bakterie *Micrococcus luteus* menší než 1 %. Nejnižší inhibiční účinek, tzn. nejvyšší indexy růstu byly zaznamenány u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. U všech testovaných bakterií kultivovaných ve sledovaných koncentracích citronového oleje došlo k inhibici jejich růstu ($\text{IR} < 100\%$). Obdobné hodnoty indexu růstu bakterií byly pozorovány u vzorků s koncentrací oleje 5000 a 6500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejvíce citlivou bakterií byl *Micrococcus luteus*, nejvíce odolnou bakterií byl *Staphylococcus aureus*. Obě tyto bakterie patří do skupiny gram-pozitivních bakterií.

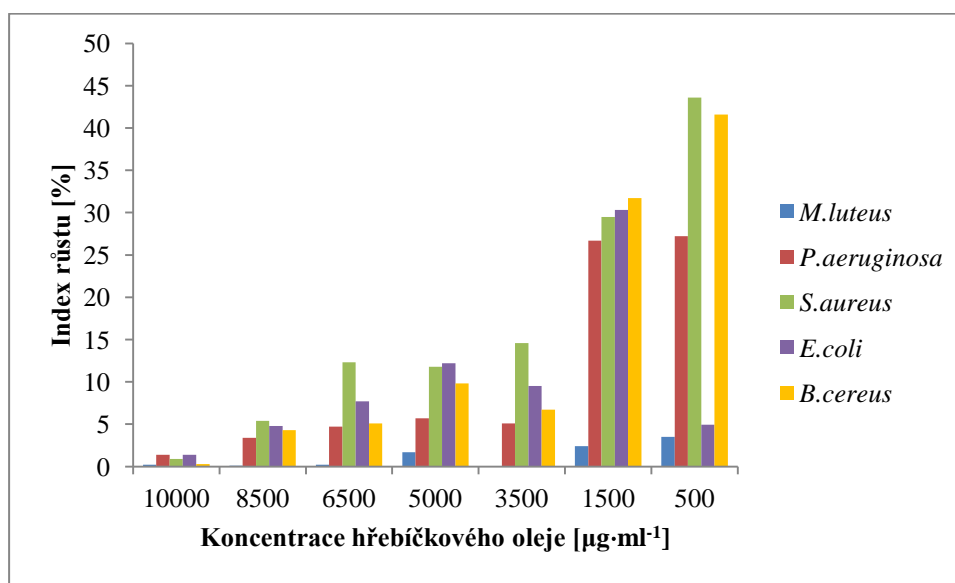


Obr. 20. Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.

Složení mikroemulzí: citronový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda.

6.4.2 Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

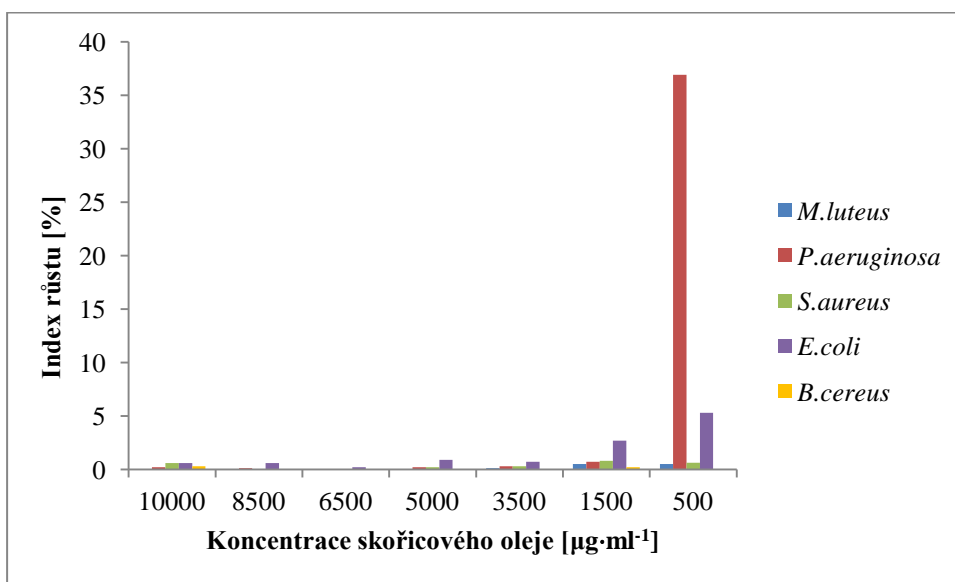
V přítomnosti mikroemulze s obsahem hřebíčkového oleje vykazovaly testované bakterie nižší hodnoty indexu růstu. V koncentracích 10000 – 3500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl naměřen index růstu do 15 %, a to u všech testovaných mikroorganismů. U dvou nejnižších koncentrací oleje, tj. 1500 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vzrostla hodnota IR na 30 – 40 %. Stejně jako v případě mikroemulze citronového oleje byl nejvíce citlivou bakterií *Micrococcus luteus*. V koncentracích 10000, 8500, 6500 a 3500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl jeho růst zcela inhibován, ve zbývajících koncentracích 5000, 1500 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl jeho index růstu nižší než 5 %. Srovnání účinnosti hřebíčkového a citronového oleje ukazuje, že hřebíčkový olej je účinnější, v koncentracích do 3500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je pro něj zaznamenána hodnota IR ca 12 – 14 %, zatímco v tomto koncentračním rozmezí citronového oleje je IR až 40 %. Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulze je zobrazen na Obr. 21.



Obr. 21. Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.
Složení mikroemulzí: hřebíčkový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda.

6.4.3 Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

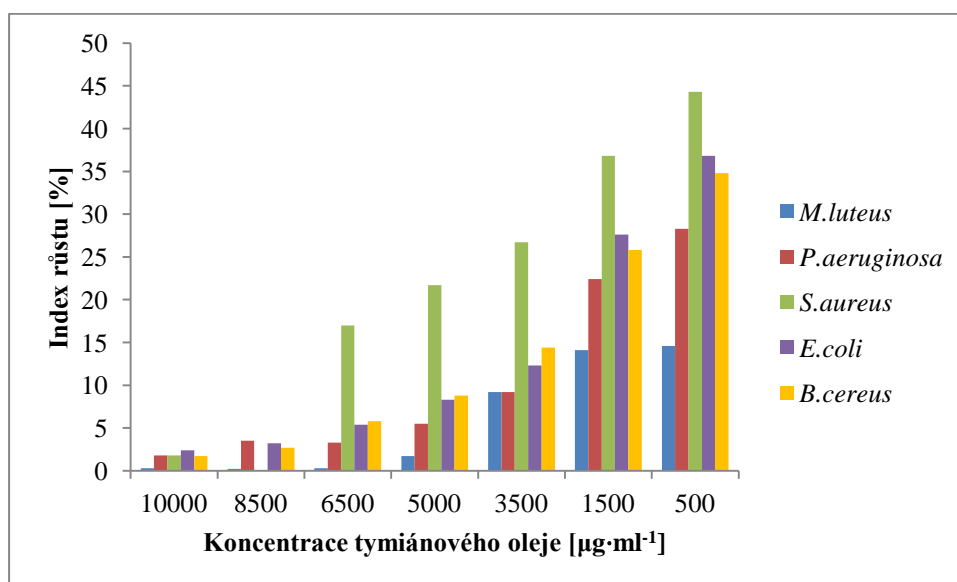
Jak je na první pohled z Obr. 22 zcela zřejmé, mikroemulze obsahující skořicový olej je suverénně nejúčinnější. Růst většiny bakterií byl zcela inhibován. Jedinou výjimkou byla gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, pro kterou byla, při nejnižší koncentraci oleje, zaznamenána hodnota IR = 37 %. Index růstu pak ve většině případů dosahoval maximálně 1 %. Výjimkou je *Escherichia coli*, u které byl v nejnižších koncentracích 1500 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zaznamenán nepatrně vyšší růst (IR 3 a 5 %). Předmětem další práce by mohl být antimikrobní test s ještě více zředěnou mikroemulzí, kde by byl obsah esenciálního oleje dále snížen.



Obr. 22. Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.
Složení mikroemulzí: skořicový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda.

6.4.4 Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

Působení mikroemulze s tymiánovým olejem nejvíce odolávala bakterie *Staphylococcus aureus* (Obr. 23). U této bakterie lze pozorovat od koncentrace $6500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ postupné zvyšování indexu růstu se snižující se koncentrací tymiánového oleje v mikroemulzi. Takový trend je zřejmý i u ostatních bakterií. S výjimkou *Staphylococcus aureus* sledované bakterie vykazovaly v koncentračním rozmezí $10000 - 3500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ index růstu do 15 %, což může být považováno za uspokojivý antimikrobní účinek. Nejvíce citlivou bakterií, jak tomu bylo i v ostatních případech, byl gram-pozitivní *Micrococcus luteus*. Růst této bakterie byl ve třech nejvyšších koncentracích inhibován úplně.



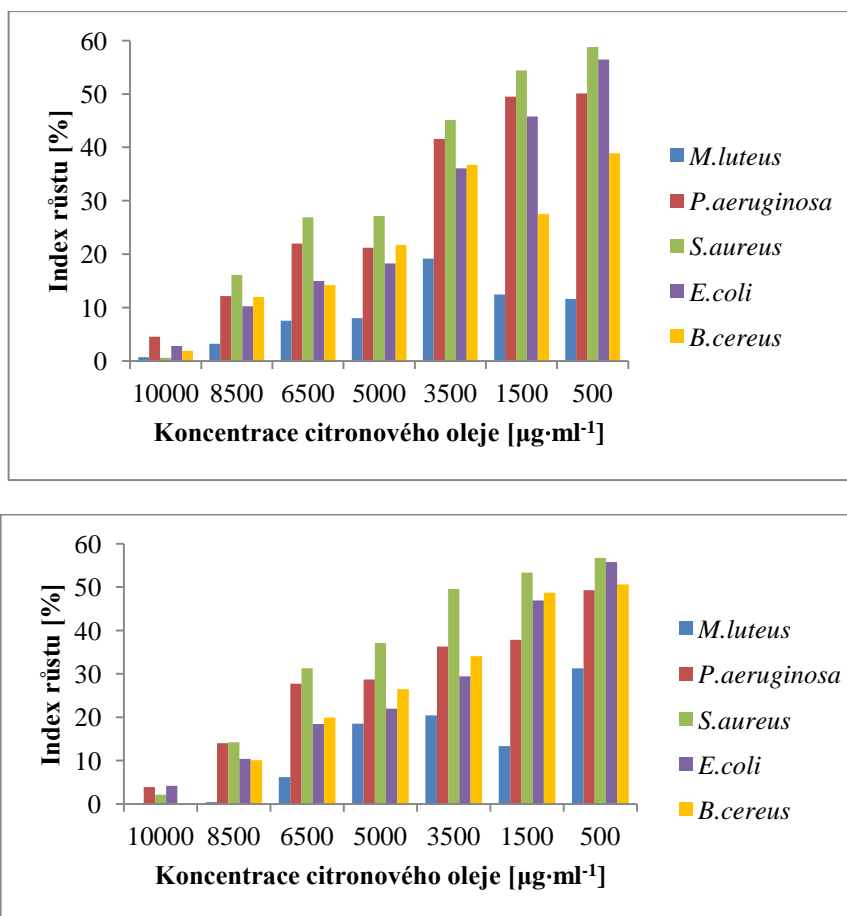
Obr. 23. Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.

Složení mikroemulzí: tymiánový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda.

6.4.5 Srovnání mikroemulzí olejů Nobilis Tilia a Biomedica

6.4.5.1 Citronový olej

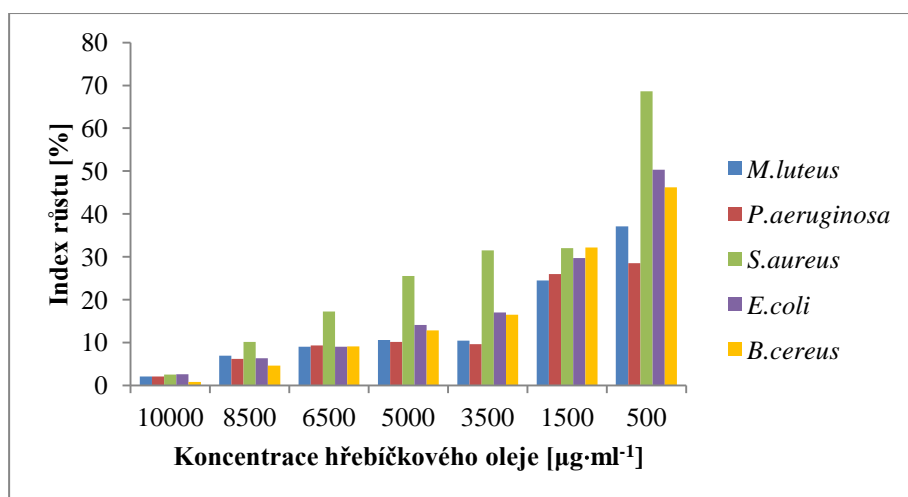
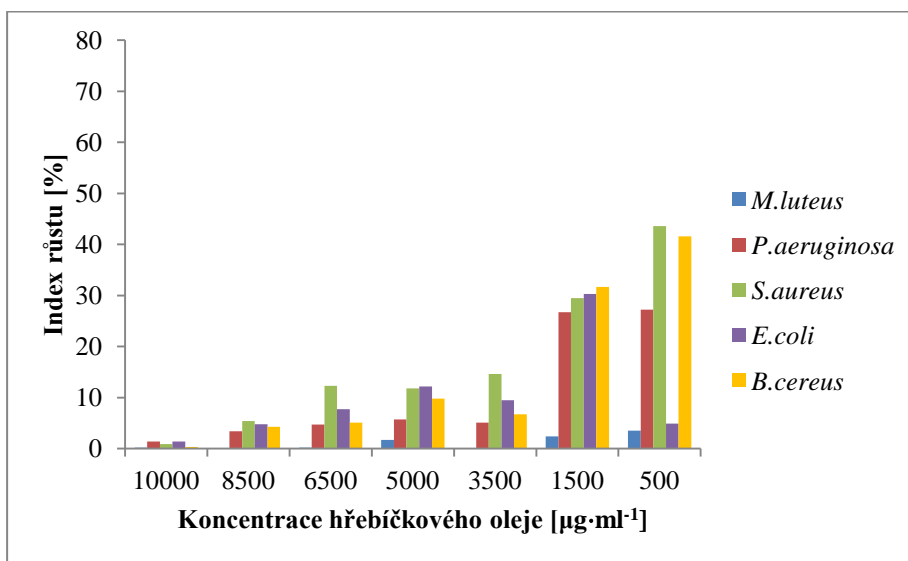
Díky analýze esenciálních olejů plynovou chromatografií mohou být objasněny některé skutečnosti týkající se rozdílů antimikrobní účinnosti daných esenciálních olejů použitých v mikroemulzích. Jak je patrné z Obr. 24, účinek citronového oleje z obou firem je srovnatelný. Nejvyšší hodnoty indexu růstu (IR = 58 %) byly shodně zaznamenány u *Staphylococcus aureus*. Rozdíl byl pozorován u *Micrococcus luteus*, který v mikroemulzi s citronovým olejem (fy Biomedica) o nejnižší koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazoval IR 12 %, zatímco v oleji firmy Nobilis Tilia při stejné koncentraci vzrostl IR na 31 %. Po srovnání složení obou olejů (GC) lze konstatovat, že antimikrobní účinek mikroemulzí, ve kterých jsou tyto oleje obsaženy, není výrazně ovlivněn vyšším obsahem limonenu v oleji firmy Biomedica.



Obr. 24. Srovnání antimikrobního účinku citronového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahore**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**.

6.4.5.2 Hřebíčkový olej

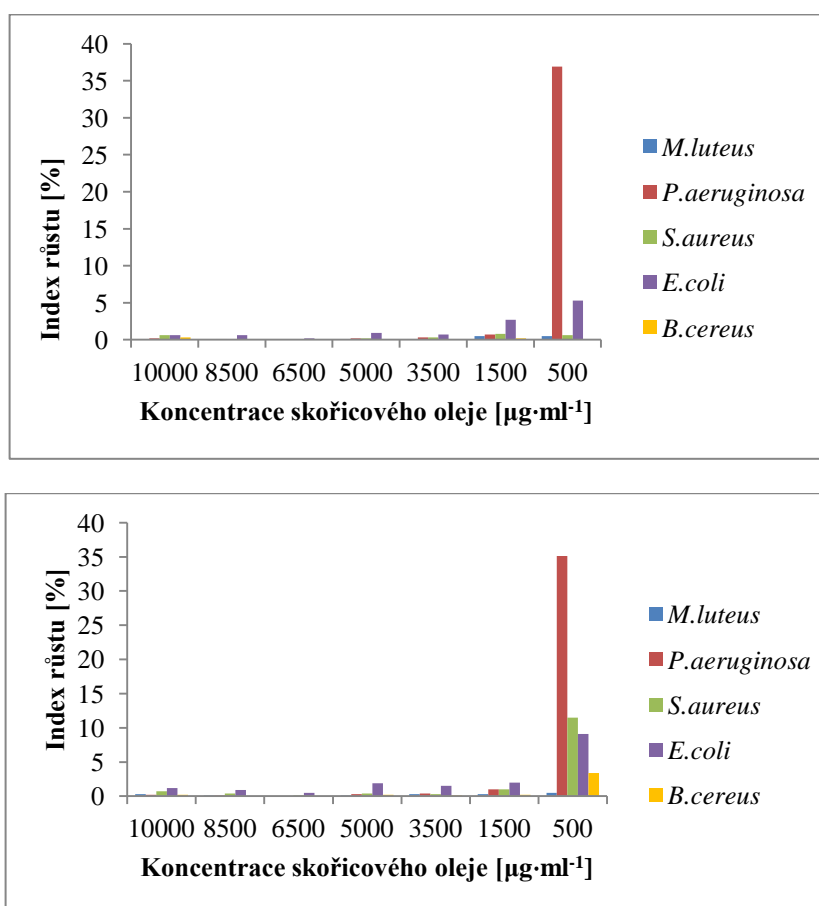
Poněkud větší rozdíly byly patrné v případě hřebíčkového oleje. Největší rozdíly nastaly v koncentračním rozmezí 3500 – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jak ilustruje Obr. 25, mikroemulze s olejem v koncentraci 3500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Biomedica) zcela inhibovala růst bakterie *Micrococcus luteus*. Další rozdíly byly pozorovány i pro vzorek koncentrace 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy byl IR této bakterie v mikroemulzi s olejem Biomedica 2 % oproti 25 % zaznamenaným pro olej firmy Nobilis Tilia. V ostatních koncentracích byla inhibiční účinnost testovaných hřebíčkových olejů obou firem srovnatelná. Největší rozdíly při srovnání celé koncentrační řady byly zaznamenány v nejnižší koncentraci, tj. 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jednalo se o bakterie *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. U těchto bakterií byl pozorován vyšší IR v případě mikroemulzí s hřebíčkovým olejem Nobilis Tilia. I když rozdíly mezi oleji obou firem v obsahu aktivní látky nejsou nijak velké, může to být důvodem jejich odlišné antimikrobní účinnosti. V oleji Nobilis Tilia byl obsah eugenolu stanoven plynovou chromatografií na 66 %, olej Biomedica obsahoval této účinné látky 75 %.



Obr. 25. Srovnání hřebíčkového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Bio-medica **nahore**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**.

6.4.5.3 Skořicový olej

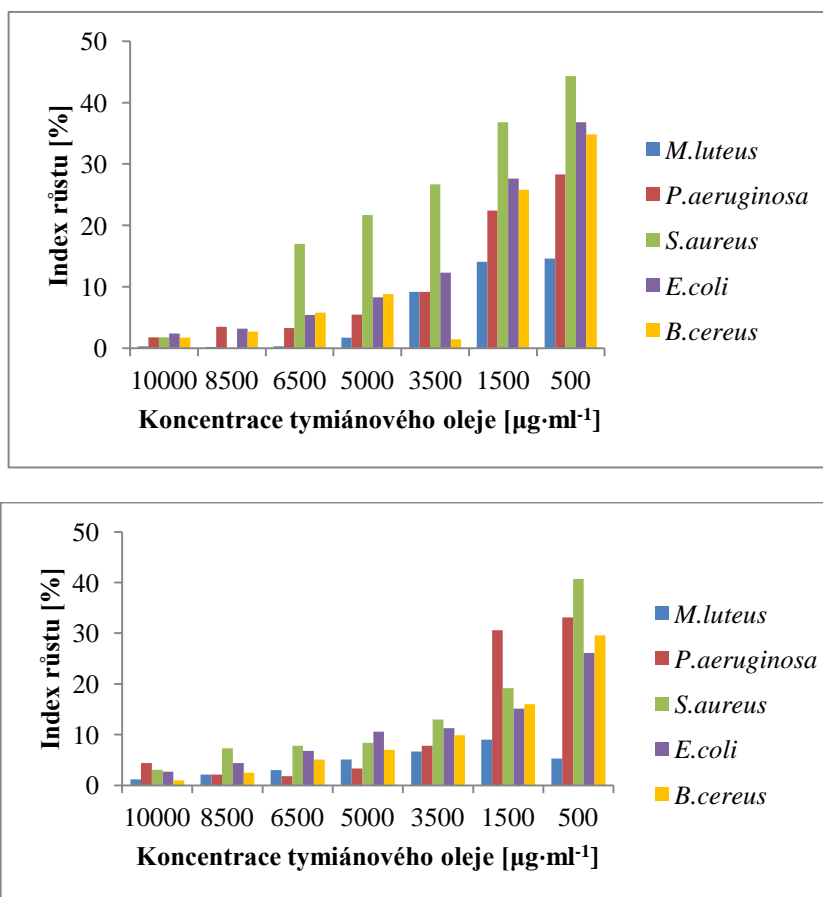
Minimální rozdíly byly zaznamenány v nejvíce účinném oleji, kterým byl skořicový. Jak ukazuje Obr. 26, téměř ve všech sledovaných koncentracích byly zaznamenány stejné hodnoty IR. Rozdíly se objevily pouze v nejnižší koncentraci, a to u bakterie *Staphylococcus aureus* (olej Nobilis Tilia IR = 12 %, olej Biomedica IR = 0.5 %). Menší rozdíly pak byly v případě *Escherichia coli* a *Bacillus cereus*. Touto studií nebyla tedy potvrzena teoreticky vyšší antimikrobní účinnost oleje Nobilis Tilia způsobená vyšším obsahem cinnamaldehydu, který byl stanoven pomocí plynové chromatografie.



Obr. 26. Srovnání skořicového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahore**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**.

6.4.5.4 Tymiánový olej

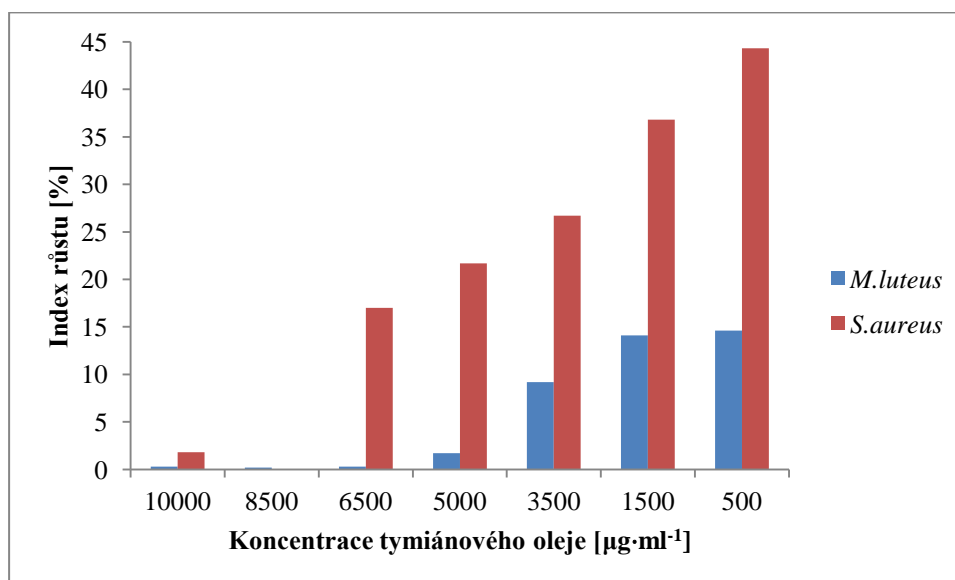
Na první pohled největší rozdíl mezi testovanými oleji byl pozorován u tymiánového oleje (viz Obr. 27). Antimikrobní účinek mikroemulze obsahující tymiánový olej Nobilis Tilia byl vyšší v případě téměř většiny testovaných bakterií. Tato lepší účinnost může mít souvislost s vyšším obsahem aktivní látky, thymolu, v tomto oleji, jehož množství je podle GC analýzy 40 %, zatímco olej fy Biomedica jej obsahuje pouze 20 %. Vyšší obsah thymolu v oleji Nobilis Tilia může být příčinou, mimo jiné, lepšího inhibičního účinku na bakterii *Staphylococcus aureus*. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byl rovněž pozorován vyšší inhibiční účinek oleje Nobilis Tilia s výjimkou dvou nejnižších koncentrací (1500 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kde vykazoval lepší účinek olej fy Biomedica.



Obr. 27. Srovnání tymiánového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahore**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**.

6.4.5.5 Porovnání inhibice jednotlivých bakterií

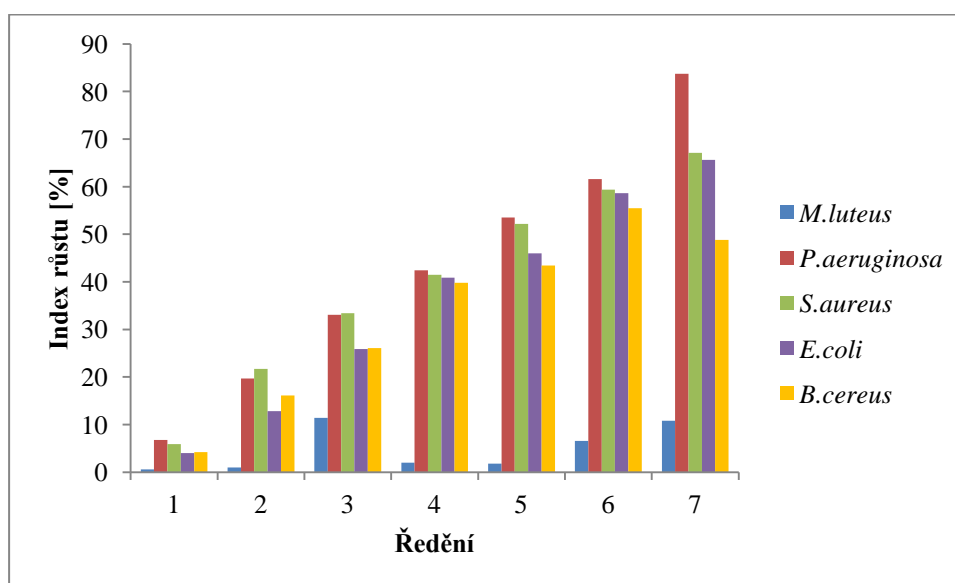
Nejvíce citlivou bakterií ze všech testovaných gram-pozitivních i gram-negativních bakterií byl gram-pozitivní *Micrococcus luteus*. Z každé skupiny bakterií testovaných při dané koncentraci byla právě tato bakterie nejvíce inhibována a hodnoty jejího indexu růstu byly nejnižší. Oproti tomu nejvíce odolnou byla bakterie *Staphylococcus aureus*. Chování těchto dvou bakterií je porovnáno na Obr. 28. Pro znázornění rozdílu hodnot indexů růstu těchto dvou bakterií byl vybrán jejich nárůst v mikroemulzi obsahující tymiánový olej Biomedica, ve kterém byl tento rozdíl nejmarkantnější.



Obr. 28. Porovnání bakterií *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*.

6.4.6 Vliv referenčního vzorku na růst vybraných bakterií

Kromě mikroemulzí obsahujících esenciální oleje byla ověřena i antimikrobní aktivita referenční mikroemulze, která olej neobsahovala. Cílem tohoto testu bylo zjistit, na kolik jsou antimikrobně účinné ostatní složky obsažené v mikroemulzích. Referenční mikroemulze byla ředěna stejným způsobem, jako byly ředěny mikroemulze s esenciálními oleji. Koncentrace etanolu a Tweenu 20 je tedy stejná, jako v testovaných vzorcích obsahující esenciální oleje. Ve dvou nejnižších ředěních, jak je patrné z Obr. 29, dosahovala celá skupina testovaných bakterií indexu růstu 60 až 70 %. Tak vysoké hodnoty indexu růstu nebyly zaznamenány v žádném z výše uvedených mikroemulzních systémů obsahující esenciální oleje. V nejnižším ředění referenčního vzorku činil IR bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 84 %. Kromě bakterie *Micrococcus luteus* lze pozorovat přímou závislost indexu růstu na snižující se koncentraci referenčního vzorku. Nejvíce odolnou bakterií byla mimo bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i bakterie *Staphylococcus aureus*. Obdobně jako u mikroemulzí s esenciálními oleji, byla i v případě referenčního vzorku k jejich působení nejvíce citlivá bakterie *Micrococcus luteus*. I v nejnižší testované koncentraci byl IR této bakterie 11 %. V neředěném referenčním vzorku byl *Micrococcus luteus* zcela inhibován. Z Obr. 29 je patrné, že etanol v kombinaci s Tweenem 20 má rovněž určitou antimikrobní aktivitu, která je pak dále zvýšena přítomností esenciálních olejů.



Obr. 29. Vliv referenčního vzorku (bez esenciálního oleje) na růst vybraných bakterií.

6.5 Cytotoxicita

Kromě sledování antimikrobních vlastností připravených mikroemulzí byla rovněž testována jejich cytotoxicita. Cytotoxický účinek byl sledován na buněčné linii embryonálních myších fibroblastů NIH/313. Stanovení bylo provedeno na základě posouzení hodnot absorbancí měřených po provedení MTT testu. Cytotoxicita byla vyjádřena pomocí viability buněk, tj. míry životaschopnosti buněk odolných vůči působení mikroemulzí vztažených na počet buněk v čistém kultivačním médiu. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 16 – 19. Grafické srovnání cytotoxického působení mikroemulzí obsahující oleje obou firem je uvedeno na Obr. 30.

Tab. 16. Viabilita buněk v mikroemulzi s citronovým olejem.

Ředění	Koncentrace oleje [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Viabilita buněk [%]	
		Biomedica	Nobilis Tilia
1	1000	49 ± 0.03	49 ± 0.01
2	500	47 ± 0.01	51 ± 0.04
3	100	66 ± 0.01	66 ± 0.03
4	50	95 ± 0.03	93 ± 0.02
5	10	84 ± 0.02	83 ± 0.03
6	5	82 ± 0.01	90 ± 0.02
7	1	73 ± 0.03	64 ± 0.01
8	0.5	90 ± 0.04	104 ± 0.04
9	0.1	102 ± 0.02	98 ± 0.03
10	0.01	108 ± 0.02	98 ± 0.03

Tab. 17. Viabilita buněk v mikroemulzi s hřebíčkovým olejem.

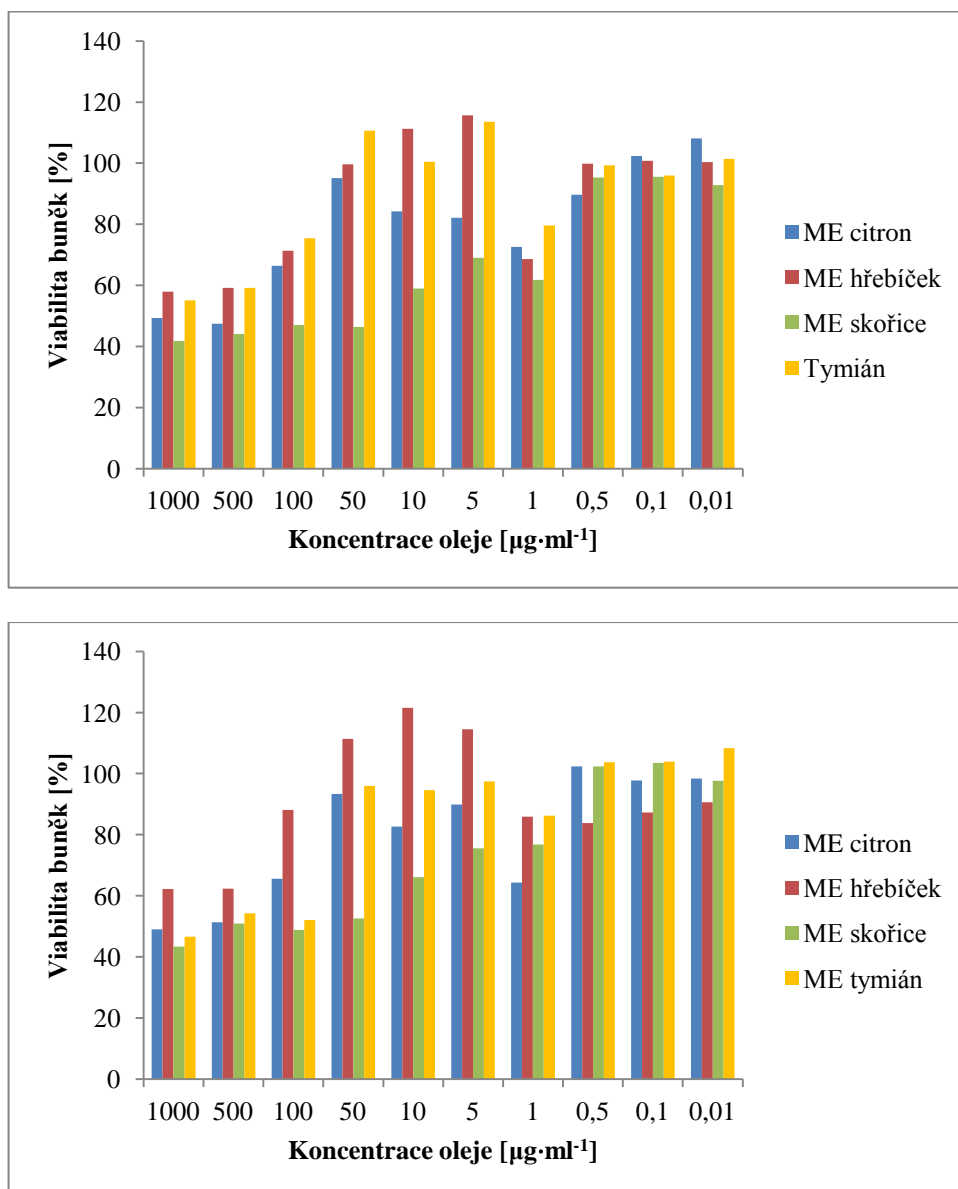
Koncentrace oleje [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Viabilita buněk [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
1000	58 ± 0.02	66 ± 0.01
500	59 ± 0.01	62 ± 0.03
100	71 ± 0.01	88 ± 0.03
50	100 ± 0.02	111 ± 0.02
10	111 ± 0.01	121 ± 0.04
5	116 ± 0.03	114 ± 0.03
1	69 ± 0.01	86 ± 0.04
0.5	100 ± 0.03	84 ± 0.03
0.1	101 ± 0.05	87 ± 0.04
0.01	100 ± 0.04	91 ± 0.04

Tab. 18. Viabilita buněk v mikroemulzi se skořicovým olejem.

Koncentrace oleje [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Viabilita buněk [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
1000	42 ± 0.01	43 ± 0.03
500	44 ± 0.02	51 ± 0.02
100	47 ± 0.01	49 ± 0.01
50	46 ± 0.01	53 ± 0.02
10	59 ± 0.02	66 ± 0.01
5	69 ± 0.04	76 ± 0.04
1	62 ± 0.03	77 ± 0.03
0.5	95 ± 0.03	102 ± 0.07
0.1	96 ± 0.02	104 ± 0.08
0.01	93 ± 0.02	98 ± 0.05

Tab. 19. Viabilita buněk v mikroemulzi s tymiánovým olejem.

Koncentrace tymiánového oleje v mikroemulzi [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Viabilita buněk [%]	
	Biomedica	Nobilis Tilia
1000	55 ± 0.02	47 ± 0.03
500	59 ± 0.02	54 ± 0.05
100	76 ± 0.03	52 ± 0.04
50	111 ± 0.03	96 ± 0.02
10	100 ± 0.04	95 ± 0.01
5	114 ± 0.03	97 ± 0.04
1	80 ± 0.05	86 ± 0.03
0.5	99 ± 0.03	104 ± 0.04
0.1	96 ± 0.02	104 ± 0.01
0.01	101 ± 0.01	108 ± 0.02



Obr. 30. Srovnání viability buněk v mikroemulzích s esenciálními oleji fy Biomedica (*nahore*), fy Nobilis Tilia (*dole*).

Jak je uvedeno v kapitole 5.6.7, podle požadavků mezinárodní normy EN ISO 10993-5 je možno cytotoxický účinek testovaných vzorků zhodnotit podle následující stupnice:

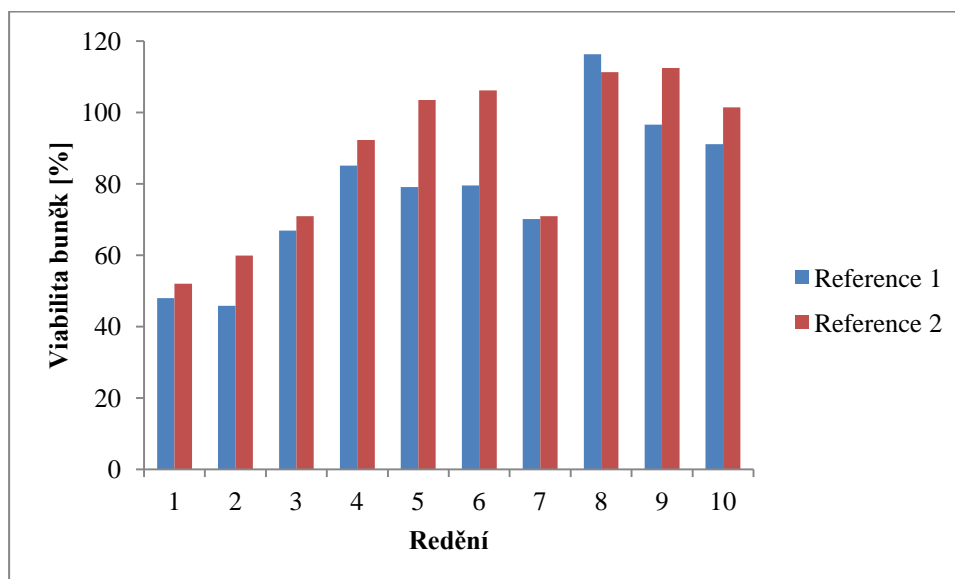
- necytotoxický účinek: množství viabilních buněk vyšší než 80 %;
- slabě cytotoxický účinek: 60 – 80 %;
- středně cytotoxický účinek: 60 – 40 %;
- silně cytotoxický účinek: méně než 40 %.

Z výsledků je zřejmé, že žádná z testovaných mikroemulzí s esenciálními oleji nevykazovala, ani při nejvyšších koncentracích, silný cytotoxický účinek na použitou buněčnou linii, kdy by se viabilita buněk snížila pod 40 %. U nejvyšších koncentrací mikroemulzí byly pozorovány středně cytotoxické účinky s viabilitou buněk ležící v intervalu 40 až 60 %. Se snižující se koncentrací oleje v mikroemulzi pak cytotoxický účinek postupně klesal. V několika případech bylo zaznamenáno (například u vzorku mikroemulzí s citronovým, hřebíčkovým a tymiánovým oleje fy Biomedica), že při testování vzorku s koncentrací oleje $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla viabilita buněk nižší, než tomu bylo u vedlejších nižších a vyšších koncentrací. Srovnáním mikroemulzí s esenciálními oleji obou firem naznačuje, že oleje fy Nobilis Tilia jsou pro testované buňky méně toxické (i když rozdíl není velký). Například u hřebíčkového oleje enkapsulovaného v mikroemulzi byla pozorována vyšší viabilita buněk, než tomu bylo v případě stejného oleje fy Biomedica. Obdobně působil i olej citronový a tymiánový. U nejnižších testovaných koncentrací ($0.01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla stanovena viabilita buněk ca 100 %, což je známka úplné absence cytotoxicity. Hodnoty vyšší, než 100 %, pak mohou být důsledkem pozitivního vlivu těchto zředěných mikroemulzí na buněčný růst.

Tab. 20. Viabilita buněk po působení referenčních mikroemulzí.

Ředění mikroemulzi	Viabilita buněk [%]	
	Reference 1	Reference 2
1	48 ± 0.02	52 ± 0.01
2	46 ± 0.02	60 ± 0.01
3	67 ± 0.01	71 ± 0.01
4	58 ± 0.02	92 ± 0.03
5	79 ± 0.05	103 ± 0.04
6	79 ± 0.02	106 ± 0.03
7	70 ± 0.04	71 ± 0.03
8	116 ± 0.01	111 ± 0.04
9	97 ± 0.01	112 ± 0.04
10	91 ± 0.02	101 ± 0.04

Kde: Reference 1 – mikroemulze bez esenciálního oleje, Reference 2 – mikroemulze bez esenciálního oleje a etanolu.



Obr. 31. Viabilita buněk referenčních mikroemulzí (reference 1 - mikroemulze bez EO, reference 2 – mikroemulze bez EO a etanolu).

Kromě mikroemulzí obsahujících esenciální oleje byla testována i cytotoxicita dvou referenčních vzorků. Jak je patrné z Tab. 20 a Obr. 31, i samotné referenční mikroemulze vykazovaly jistý cytotoxický účinek. V nejvyšších koncentracích měly referenční mikroemulze (1 a 2), podle stupnice EN ISO 10993-5, středně cytotoxický účinek. Při větších ředěních vykazovaly buď slabou cytotoxicitu, nebo cytotoxicky nepůsobily vůbec. Menší cytotoxický účinek byl podle očekávání zaznamenán u druhého referenčního vzorku, obsahujícího pouze Tween 20. Tento nižší efekt ve srovnání s referencí 1 byl způsoben absencí etanolu.

Ze srovnání mikroemulzí s oleji a referenčních mikroemulzí je zřejmé, že jejich cytotoxicita není vysoká a je ovlivněna rovněž přítomností dalších složek, například surfaktanty nebo etanolem.

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo připravit mikroemulze s esenciálními oleji (citronový, hřebíčkový, skořicový, tymiánový), charakterizovat je a provést zkoušky jejich biologických účinků (antimikrobní účinnost a cytotoxicita). K nalezení optimálního složení mikroemulzí, vhodných pro testování biologických vlastností, byly použity fázové diagramy. V průběhu práce bylo zjištěno, že surfaktanty Tween 60 a Tween 80 nebyly schopny vytvořit mikroemulze se všemi testovanými oleji. Stabilní systémy byly připraveny pouze s použitím Tweenu 20. Pomocí fázových diagramů bylo určeno, že enkapsulace olejů je pozitivně ovlivněna přítomností propylenglykolu jako solubilizátoru. Tento pozitivní vliv byl nejmarkantnější v případě mikroemulzí s hřebíčkovým olejem.

Plynovou chromatografií bylo stanoveno složení testovaných esenciálních. Větší množství aktivních látek v esenciálních olejích bylo detekováno v olejích fy Biomedica (citronový a hřebíčkový olej), ve zbývajících olejích (skořicový a tymiánový olej) byl vyšší obsah aktivních látek zjištěn v olejích fy Nobilis Tilia.

Všechny připravené mikroemulze byly charakterizovány pomocí fotonové korelační spektroskopie. Mikroemulze byly měřeny po přípravě a po šesti týdnech skladování, kdy byla zjišťována jejich stabilita. V mikroemulzích byly po přípravě přítomny částice s velikostí 7.5 až 11.0 nm. Po šesti týdnech se velikosti částic pohybovaly v rozmezí 5.5 až 10.9 nm a mikroemulze byly stabilní. Všechny mikroemulze, po přípravě i po šesti týdnech skladování, byly transparentní, čiré, bez známek zákalu.

Pomocí sestavení fázových diagramů byl zjištěn optimální složení mikroemulzí vhodné k testování na antimikrobní účinnost. Byla zvolena vhodnější koncentrační řada, než v práci [16]. Antimikrobní zkoušení bylo provedeno na třech gram-pozitivních (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Bacillus cereus*) a dvou gram-negativních (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) bakteriích. Nejúčinnější byly mikroemulze s obsahem skořicového oleje. Téměř ve všech testovaných koncentracích tohoto oleje byl index růstu bakterií nižší 2 %. Nejméně účinným olejem v mikroemulzích byl olej citronový (v nejnižších koncentracích byl ca 60 %). Nejcitlivější bakterií vůči působení mikroemulzí byl gram-pozitivní *Micrococcus luteus*. Index růstu této bakterie byl ve většině mikroemulzí nižší než 15 %, výjimkou byly mikroemulze citronového a hřebíčkového oleje fy Nobilis Tilia, kde byl stanoven IR 31 a 37 %. Nejvíce odolnou bakterií byl gram-pozitivní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Z naměřených výsledků však nelze jednoznačně konstatovat,

zda testované esenciální oleje jsou více účinné na gram-pozitivní nebo gram-negativní bakterie.

Mimo antimikrobní účinky byly připravené mikroemulze testovány i z hlediska jejich možného cytotoxického účinku. Bylo zjištěno, že nejvyšší z testovaných koncentrací mikroemulzí vykazovaly střední cytotoxicitu, kdy se životnost buněk vyskytuje v rozmezí 40 – 60 %. Se snižující se koncentrací cytotoxický účinek klesal a nejnižší testované koncentrace mikroemulzí nepůsobily cytotoxicky vůbec.

Studovaná problematika je natolik rozsáhlá, že by mohla být předmětem další práce. V dalších krocích by mohla být provedena analýza plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem, aby bylo detekováno a identifikováno více složek esenciálních olejů. Dále by bylo užitečné stanovit antimikrobní aktivitu mikroemulzí s aktivními látkami (cinnamaldehyd, eugenol, thymol) nebo by mohla být změřena velikost částic v mikroemulzích obsahující solubilizátor propylenglykol.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BAŞER, K a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of essential oils: Introduction*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010, s. 1-2. ISBN 14-200-6315-4.
- [2] FRANZ, Chlodwig a Johannes NOVAK. *Handbook of essential oils: Sources of Essential Oils*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010, s. 39-82. ISBN 14-200-6315-4.
- [3] CAN BAŞER a DEMIRCI. *Chemistry of Essential Oils*. BASER, K. Hüsnü Can a Fatih DEMIRCI. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, c2007, s. 42-86. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [4] MLEJOVÁ, Veronika, Petra PAVLÍKOVÁ, Petr DOBIÁŠ, Martin ADAM a Karel VENTURA. *Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2008, roč. 2010, č. 34, s. 166-171.
- [5] MLEJOVÁ, Veronika, Petra PAVLÍKOVÁ, Petr DOBIÁŠ, Martin ADAM a Karel VENTURA. *Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2008, roč. 2010, č. 34, s. 166-171.
- [6] SCHMIDT, Erich. *Handbook of essential oils: Production of Essential Oils*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010, s. 83-120. ISBN 14-200-6315-4.
- [7] SELL, Charles. *Handbook of essential oils: Chemistry of Essential Oils*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010, s. 121-150. ISBN 14-200-6315-4.
- [8] KUBECZKA, Karl-Heinz. *Handbook of essential oils: History and Sources of Essential Oil Research*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2010, s. 3-38. ISBN 14-200-6315-4.
- [9] JIRÁSEK, V., STARÝ, F. *Atlas léčivých rostlin*. 1st ed. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1986. 112 p.
- [10] AMPARO, S., CHISVERT, A. *Analysis of Cosmetic Products*. 1st ed. Elsevier Science, 2007. 506 p. ISBN 978-0-444-52260-3.

- [11] RETOVÁ, Lucie. *Biologické účinky esenciálních olejů a jejich využití v kosmetice*. Zlín, 2013. Dostupné z: https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24303/retov%C3%A1_2013_bp.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.
- [12] *Labda Life* [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>
- [13] VFU Brno. [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/uvozp/Teorie_SPME.pdf
- [14] SHAABAN, Hamdy A.E., EL-GHORAB a SHIBAMOTO. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal of Essential Oil Research*. 2012, roč. 24, č. 2, s. 203-212.
- [15] BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* [online]. New York: Springer, c2007, 648 s. [cit. 2014-03-30]. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [16] SLOVÁKOVÁ, Ivana. *Mikroemulze s obsahem esenciálních olejů*. Zlín, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [17] KOROCH a JULIANI. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. KOROCH, Adolfin R., H. Rodolfo JULIANI a Julio A. ZYGADLO. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, c2007, s. 87-115. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [18] TADROS, Tharwat F. *Emulsion science and technology*. Weinheim: Wiley-VCH, c2009, xviii, 326 p. ISBN 35-273-2525-5.
- [19] McCLEMENTS, D. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. Boca Raton: CRC Press, c1999, s. 3-123. ISBN 08-493-8008-1.

- [20] MASON, T G, J N WILKING, K MELESON, C B CHANG a S M GRAVES. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2006-10-18, roč. 18, č. 41, R635-R666. DOI: 10.1088/0953-8984/18/41/R01. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0953-8984/18/i=41/a=R01?key=crossref.6bcb5e402d8c940fbe9d9ad59ca40dee>
- [21] Microemulsions. PATEL, Mrunali R. [online]. [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <Http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsions-novel-drug-delivery-vehicle>.
- [22] BENITA, Simon. *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. 2. vyd. New York: Taylor, 2006, s. 345-428. ISBN 0824723171.
- [23] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-807-0807-453.
- [24] UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ. *Fyzikální, chemické a technické vlastnosti povrchově aktivních látek: Distanční text*. Zlín.
- [25] RAO, Y. Srinivasa, K. Sree DEEPTHI a K.P.R. CHOWDARY. Microemulsions: A Novel Drug Carrier System. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 39-41.
- [26] SURABHI, Khanna, Katare OP, Nasa ATUL a Garg ARUN. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences: Microemulsions: Developmental aspects* [online]. 2010 [cit. 2014-04-11]. ISBN 0975-8585.
- [27] Danielsson, I.; Lindman, B. *Colloids Surf. A*. 1981, 3, 391.
- [28] STUBENRAUCH, Cosima. *Microemulsions: Background, new concepts, applications, perspectives*. Ames, Iowa: Wiley, 2009, s. 1-47. ISBN 978-140-5167-826.
- [29] Bourrel, M.; Schechter, R. S. *'Microemulsions and Related Systems'* Marcel Dekker, 1988, New York.
- [30] <Http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsions-novel-drug-delivery-vehicle> [online]. [cit. 2014-04-14].
- [31] Winsor, P. A. *Trans. Faraday Soc.* 1948, 44, 376.

- [32] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology*. 3. vyd. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006, s. 31-70. ISBN 13 978-0-471-68024-6.
- [33] UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ. *Systematika povrchově aktivních látek: Distanční text*. Zlín.
- [34] PENNELL, Kurt D., Ahmet KARAGUNDUZ, Daniel H. YEH, Charlotte A. MARTIN, Eric K. CHANG a Spryos g. PAVLOSTATHIS. GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY. *Influence of nonionic surfactants on then bioavailability of chlorinated benzenes for microbial reductive dechlorination*. Atlanta, 2001.
- [35] Griffin, W. C. *J. Cosmetics Chemists 1949, 1*, 311.
- [36] Griffin, W.C. *J. Cosmetics Chemists 1954, 5*, 249.
- [37] Davies, J. T. *Proc. 2nd Int. Congr. Surface Act.* Vyd. 1 Butterworths, 1959, London.
- [38] MALVERN INSTRUMENTS. *Dynamic Light Scattering: An Introduction In 30 Minutes*. 8 s.
- [39] JACKSON, Kevin. Dynamický rozptyl světla - co, jak proč?. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2007, XVII, č. 1.
- [40] KVÍTEK, Libor, Radko NOVOTNÝ a Petr PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických suspenzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1998, č. 92, s. 431-433.
- [41] TSCHARNUTER, Walther. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. Chichester: John Wiley, 2000, 5469–5485.
- [42] DAI, Yeling. 2008. Dostupné z: http://x-ray.ucsd.edu/mediawiki/images/0/03/Dynamic_light_scattering_group_apr30.pdf
- [43] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties od Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2010, č. 10, s. 813-829.
- [44] POKLUDOVÁ, Lucie. MASARYKOVA UNIVERZITA. *Základy terapie antibiotiky*. Brno.

- [45] Diluční metody: Studijní text 3. LF Univerzity Karlovy. *Http://www.lf3.cuni.cz* [online]. [cit. 2014-05-09]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
- [46] BD BIOSCIENCES. *Introduction to Flow Cytometry: A learning guide* [online]. San Jose, 2000, 52 s. [cit. 2014-22-04]. Dostupné z: http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf
- [47] BROWN, Michael a Carl WITTEWER. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. roč. 46, 8(b), s. 1221-1229. Dostupné z: http://ebookterra.com/read/?title=Flow+Cytometry%3A+Principles+and+Clinical+Applications+in+...&doc=jdbe8Xb48LmG8tACQv0DXFW2xREmrNCw0I5h8SXBe9rHnXWwYMcQiCt3alHq9r1Qa69Xilpc7hg_.pdf
- [48] Flow Cytometry Core Facility: What is flow cytometry?. BARTS AND THE LONDON SCHOOL OF MEDICINE AND DENTISTRY, UK. *Institute of Cell and Molecular Science* [online]. 2013-11-01 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/flowcytometry/>
- [49] ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie. *Stapro s. r. o.* [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/lab01.pdf>
- [50] NETÍK, Karel. *In vitro stanovení toxicity koloidního polyanilinu*. Zlín, 2013. Bachelářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.
- [51] RUSENOVA, N. a P. PARVANOV. Antimicrobial Activities of Twelve Essential Oils Against Microorganisms of Veterinary Importance. *Trakia Journal of Science*. Bulharsko, 2009, roč. 7, č. 1, s. 37-43. Dostupné z: <http://www.uni-sz.bg>
- [52] MAYAUD, L., A. CARRICAJO, A. ZHIRI a G. AUBERT. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, č. 47, s. 167-173.

FU, YuJie, YuanGang ZU, LiYan CHEN, XiaoGuang SHI, Zhe WANG, Su SUN a

- [53] Thomas EFFERTH. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research* [online]. 2007, vol. 21, issue 10, s. 989-994 [cit. 2014-04-03]. DOI: 10.1002/ptr.2179. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2179>
- [54] ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK. *Fyzikální chemie I*. Vyd. 4. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 180 s. ISBN 80-731-8324-2.
- [55] ŠEVČÍKOVÁ, Petra. *Příprava emulzí*. Zlín, 2010. Diplomová práce. UTB ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Pavlína Vltavská, Ph.D.
- [56] EN ISO 10993-5. *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Dublin, 2009.
- [57] SUCHÁ, Pavlína. *Účinky esenciálních olejů na růst vybraných bakterií*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

B	Biomedica
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CMC	Kritická micelární koncentrace
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EN	Evropská norma
EO	Esenciální olej
FID	Plamenově-ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
IR	Index růstu
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci
ME	Mikroemulze
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MS	Hmotnostní spektrofotometr
MTT	Thiazolová modř (thiazolyl blue formazan)
NDP	Dusíko-fosforový detektor
NT	Nobilis Tilia
O	Olej
o/v	Systém olej ve vodě
PAL	Povrchově aktivní látka
PCS	Fotonová korelační spektroskopie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PG	Propylenglykol
RK	Růstová křivka

SFE	Supekritická fluidní extrakce
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
UV	Ultrafialové světlo
v/o	Systém voda v oleji
W	Voda

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Prenol. [7]</i>	14
<i>Obr. 2. Limonen. [7]</i>	15
<i>Obr. 3. Thymol. [7]</i>	15
<i>Obr. 4. Karvakrol. [7]</i>	15
<i>Obr. 5. Farenzol. [7]</i>	15
<i>Obr. 6. Cinnamaldehyd. [7]</i>	16
<i>Obr. 7. Eugenol. [7]</i>	16
<i>Obr. 8. Eluce typických složek zastoupených v EO pomocí plynové chromatografie. [8]...</i>	22
<i>Obr. 9. Struktura emulzí o/v (a), v/o (b). [18]</i>	24
<i>Obr. 10. Schematické znázornění možných mechanismů rozpadu emulzí. [18]</i>	27
<i>Obr. 11. Znázornění fázového chování čtyřsložkového systému; šrafovaná oblast představuje pevný poměr surfaktantu a ko-surfaktantu. [26]</i>	29
<i>Obr. 12. Hypotetické fázové oblasti mikroemulzních systémů. [30]</i>	30
<i>Obr. 13. Fázové diagramy třísložkového systému voda – olej – surfaktant, kde olejovou fází tvoří linalool (vlevo) a hřebíčkový olej (vpravo) s etanolem v poměru 1:1, vodná fáze je tvořena demineralizovanou vodou a vodou s propylenglykolem v poměru 3:2 a 1:1. Písmem A je označena mikroemulzní (homogenní) oblast, písmene B je označena heterogenní fáze.</i>	58
<i>Obr. 14. Srovnání vlivu použitých surfaktantů Tween 20 (vpravo) a Tween 60 (vlevo) na velikost homogenní oblasti (A) mikroemulzí s oleji fy Biomedica a vodnou fází tvořenou vodou.</i>	60
<i>Obr. 15. Srovnání vlivu použitých surfaktantů Tween 20 (vpravo) a Tween 60 (vlevo) na velikost homogenní oblasti (A) mikroemulzí s oleji fy Biomedica a vodnou fází tvořenou vodou s propylenglykolem v poměru 1:1.</i>	61
<i>Obr. 16. Chromatogramy tymiánového oleje. Olej fy Nobilis Tilia nahoře (1 – α-pinen, 2 – sabinen, 3 – limonen, 4 – neznámá látka, 5 – linalool, 6 – thymol, 7 – karvakrol, 8 – karyofylen), olej fy Biomedica dole (1 – α-pinen, 2 – sabinen, 3 – limonen, 4 – linalool, 5 – neznámá látka, 6 – thymol, 7 – karvakrol).</i>	66
<i>Obr. 17. Chromatogramy skořicového oleje. Olej fy Nobilis Tilia nahoře (1 – linalool, 2 – cinnamaldehyd, 3 – eugenol, 4 – karyofylen), olej y Biomedica dole (1 – limonen, 2 - linalool, 3 – neral, 4 – cinnamaldehyd, 5 – eugenol, 6 – karyofylen).</i>	67

- Obr. 18. Intenzitní distribuce velikosti částic mikroemulzí obsahujících eugenol (červená linka – vzorek po 24 hod, černá linka – vzorek po 48 hod a opětovné filtraci, modrá linka – po 6 týdnech). 71
- Obr. 19. Intenzitní distribuce velikosti částic mikroemulze obsahující skořicový olej (červená linka – vzorek 20 hod po filtraci, černá linka – vzorek po šesti týdnech). .. 71
- Obr. 20. Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: citronový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda. 73
- Obr. 21. Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: hřebíčkový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda. 74
- Obr. 22. Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: skořicový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda. 75
- Obr. 23. Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: tymiánový olej:etanol 1:1/Tween 20/voda. 76
- Obr. 24. Srovnání antimikrobního účinku citronového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahoře**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**. 77
- Obr. 25. Srovnání hřebíčkového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahoře**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**. 79
- Obr. 26. Srovnání skořicového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahoře**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**. 80
- Obr. 27. Srovnání tymiánového oleje v mikroemulzi. Olej firmy Biomedica **nahoře**, olej firmy Nobilis Tilia **dole**. 81
- Obr. 28. Porovnání bakterií *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*. 82
- Obr. 29. Vliv referenčního vzorku (bez esenciálního oleje) na růst vybraných bakterií. 83
- Obr. 30. Srovnání viability buněk v mikroemulzích s esenciálními oleji fy Biomedica (**nahoře**), fy Nobilis Tilia (**dole**). 87
- Obr. 31. Viabilita buněk referenčních mikroemulzí (reference 1 - mikroemulze bez EO, reference 2 – mikroemulze bez EO a etanolu). 89
- Obr. 32. Srovnání mikroemulzí obsahující citronový olej fy Nobilis **vlevo**, fy Biomedica **vpravo** a vliv propylenglykolu jako solubilizátoru. 105
- Obr. 33. Srovnání mikroemulzí obsahující tymiánový olej fy Nobilis **vlevo**, fy Biomedica **vpravo** a vliv propylenglykolu jako solubilizátoru. 106

- Obr. 35. Růstové křivky ME s citronovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 107
- Obr. 36. Růstové křivky ME s hřebíčkovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 108
- Obr. 37. Růstové křivky ME se skořicovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 109
- Obr. 38. Růstové křivky ME s tymiánovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 110
- Obr. 39. Růstové křivky ME s citronovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 111
- Obr. 40. Růstové křivky ME s hřebíčkovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 112
- Obr. 41. Růstové křivky ME se skořicovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 113
- Obr. 42. Růstové křivky ME s tymiánovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]:0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500. 114
- Obr. 43. Růstové křivky referenční ME. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda ředění:0 (bujon), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. 115

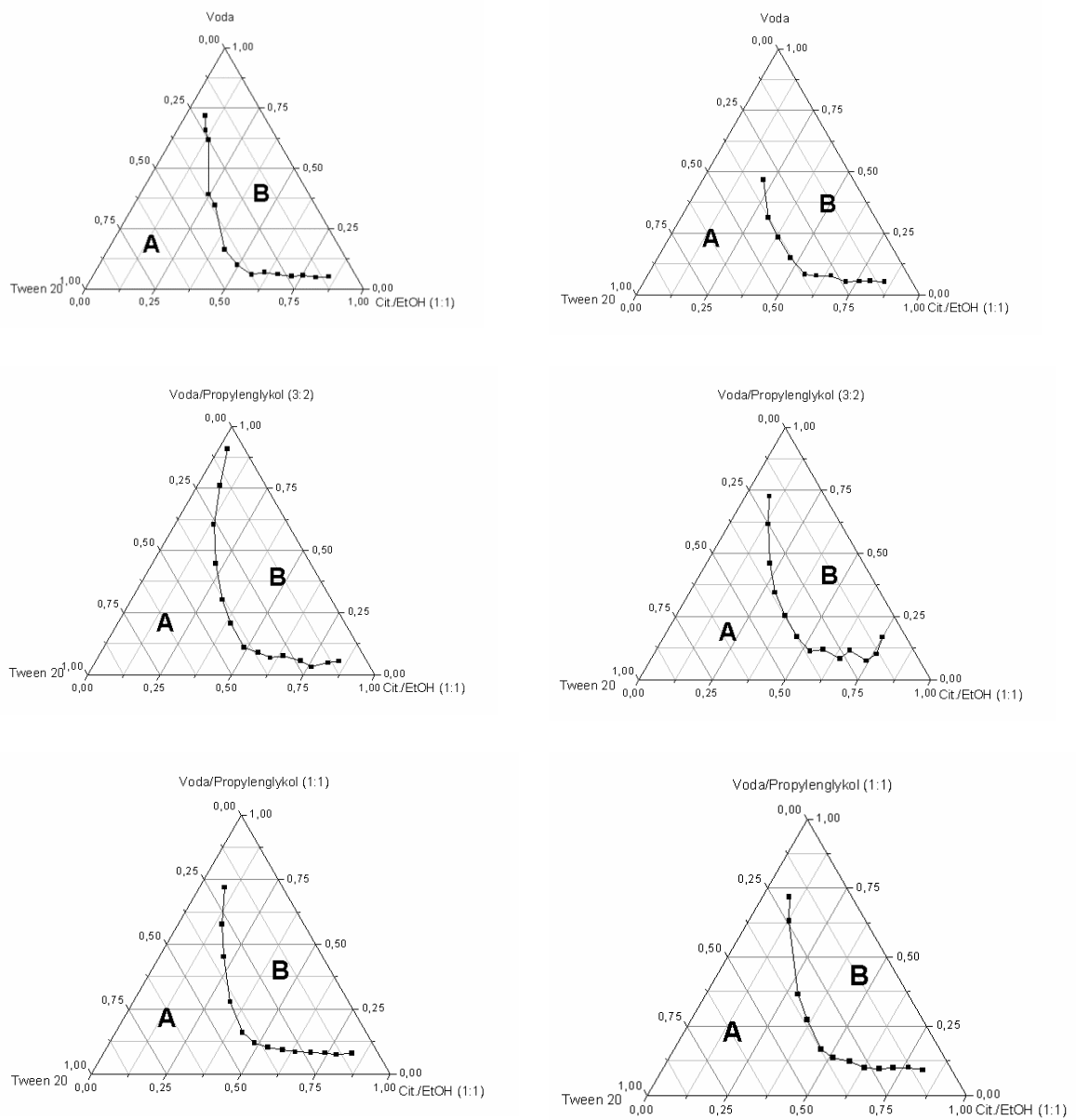
SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Produkce esenciálních olejů, r. 2008. [6].....</i>	13
<i>Tab. 2. Rámcové podmínky pro analýzu EO plynovou chromatografií. [8].....</i>	23
<i>Tab. 3. Hodnoty vybraných vlastností několika druhů neionického surfaktantu (Tweenu). [34]</i>	33
<i>Tab. 4. Velikosti inhibičních zón v mm vybraných EO na použité mikroorganismy. [51]... </i>	39
<i>Tab. 5. Minimální inhibiční koncentrace použitých olejů v % obj. [51].....</i>	39
<i>Tab. 6. Procentuální zastoupení jednotlivých složek studovaných EO. [52].....</i>	40
<i>Tab. 7. Vypočtená množství jednotlivých složek daných mikroemulzí.....</i>	47
<i>Tab. 8. Složení mikroemulzí použitých pro antimikrobní a cytotoxické testování.</i>	48
<i>Tab. 9. Koncentrace EO v testovaných mikroemulzích a pipetované objemy pro jejich přípravu.</i>	51
<i>Tab. 10. Vyhodnocení chromatogramu citronového oleje.....</i>	62
<i>Tab. 11. Vyhodnocení chromatogramu hřebíčkového oleje.</i>	63
<i>Tab. 12. Vyhodnocení chromatogramu skořicového oleje.</i>	63
<i>Tab. 13. Vyhodnocení chromatogramu tymiánového oleje.</i>	64
<i>Tab. 14. Velikost částic v mikroemulzích stanovená PCS (filtrováno přes 0.22 μm filtr). ..</i>	69
<i>Tab. 15. Velikost částic v mikroemulzích stanovená PCS (filtrováno přes 0.22 μm filtr).....</i>	69
<i>Tab. 16. Viabilita buněk v mikroemulzi s citronovým olejem.</i>	84
<i>Tab. 17. Viabilita buněk v mikroemulzi s hřebíčkovým olejem.</i>	85
<i>Tab. 18. Viabilita buněk v mikroemulzi se skořicovým olejem.</i>	85
<i>Tab. 19. Viabilita buněk v mikroemulzi s tymiánovým olejem.....</i>	86
<i>Tab. 20. Viabilita buněk po působení referenčních mikroemulzí.</i>	88

SEZNAM PŘÍLOH

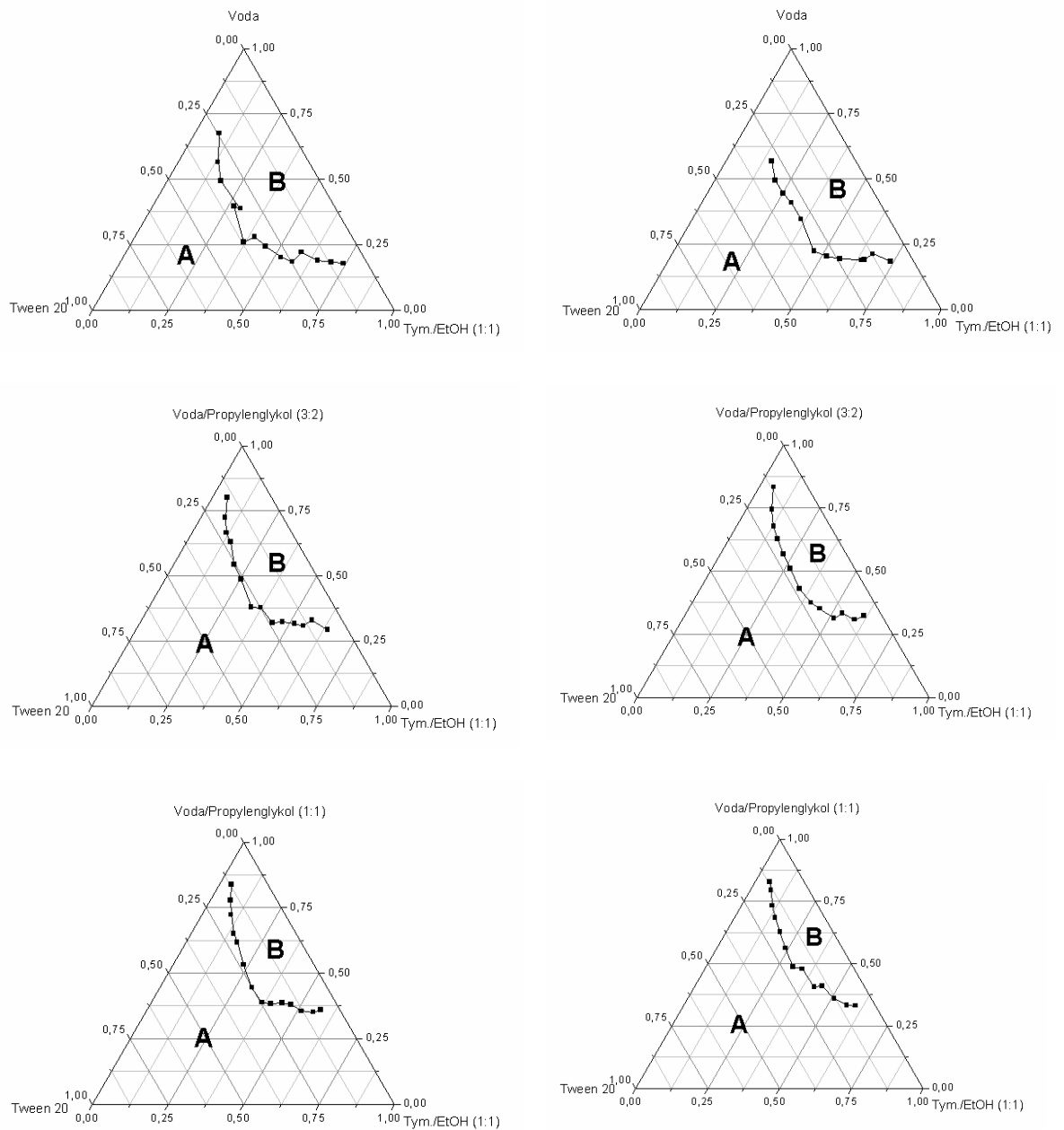
PŘÍLOHA I: FÁZOVÉ DIAGRAMY I	105
PŘÍLOHA II: FÁZOVÉ DIAGRAMY II	106
PŘÍLOHA III: RK ME S CITRONOVÝM OLEJEM (B)	107
PŘÍLOHA IV: RK ME S HŘEBÍČKOVÝM OLEJEM (B)	108
PŘÍLOHA V: RK ME SE SKOŘICOVÝM OLEJEM (B)	109
PŘÍLOHA VI: RK ME S TYMIÁNOVÝM OLEJEM (B)	110
PŘÍLOHA VII: RK ME S CITRONOVÝM OLEJEM (NT)	111
PŘÍLOHA VIII: RK ME S HŘEBÍČKOVÝM OLEJEM (NT)	112
PŘÍLOHA IX: RK ME SE SKOŘICOVÝM OLEJEM (NT)	113
PŘÍLOHA X: RK ME S TYMIÁNOVÝM OLEJEM (NT)	114
PŘÍLOHA XI: RK REFERENČNÍ ME	115

PŘÍLOHA P I: FÁZOVÉ DIAGRAMY I



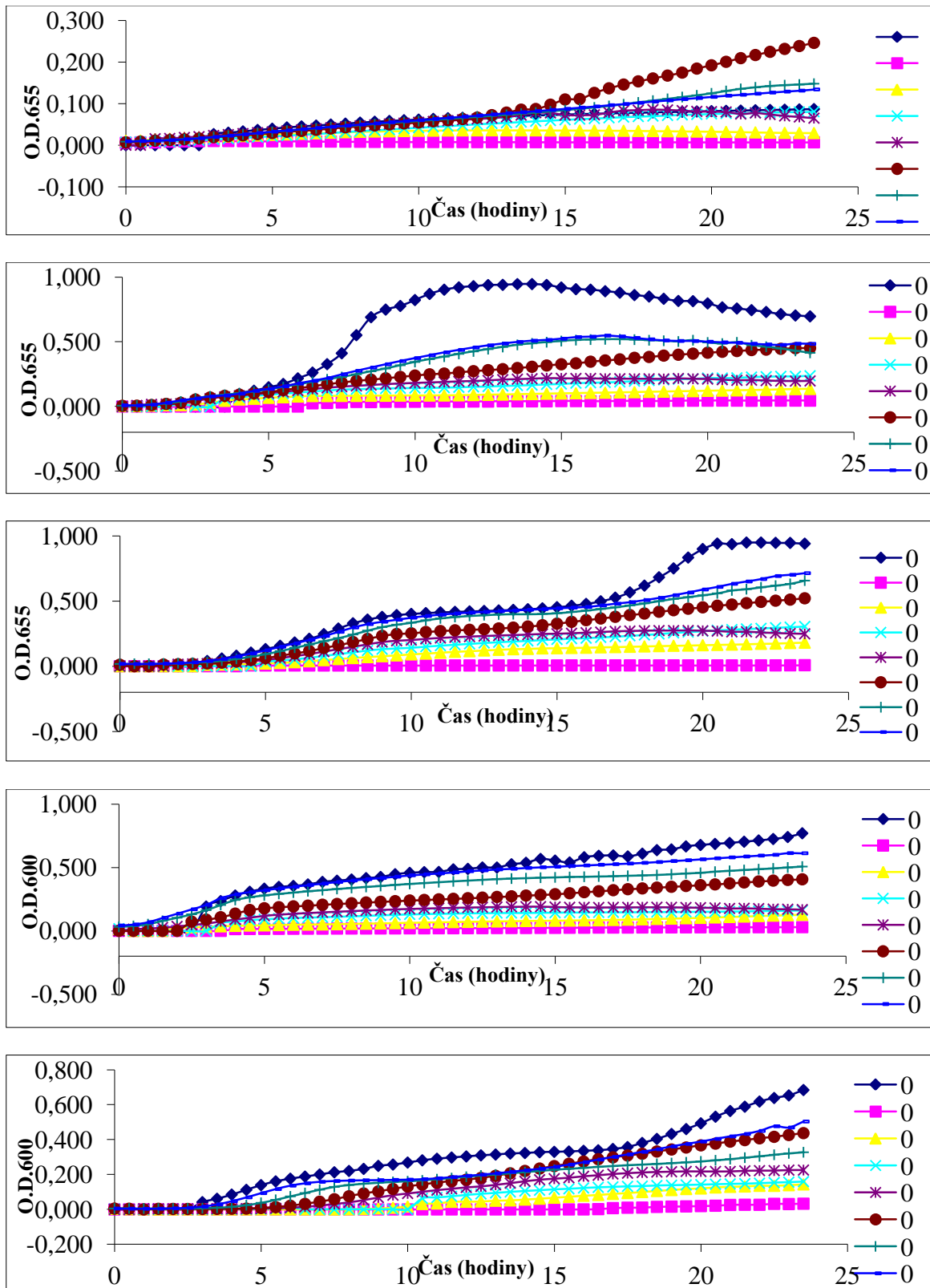
Obr. 32. Srovnání mikroemulzí obsahující citronový olej fy Nobilis *vlevo*, fy Biomedica *vpravo* a vliv propylenglykolu jako solubilizátoru.

PŘÍLOHA P II: FÁZOVÉ DIAGRAMY II



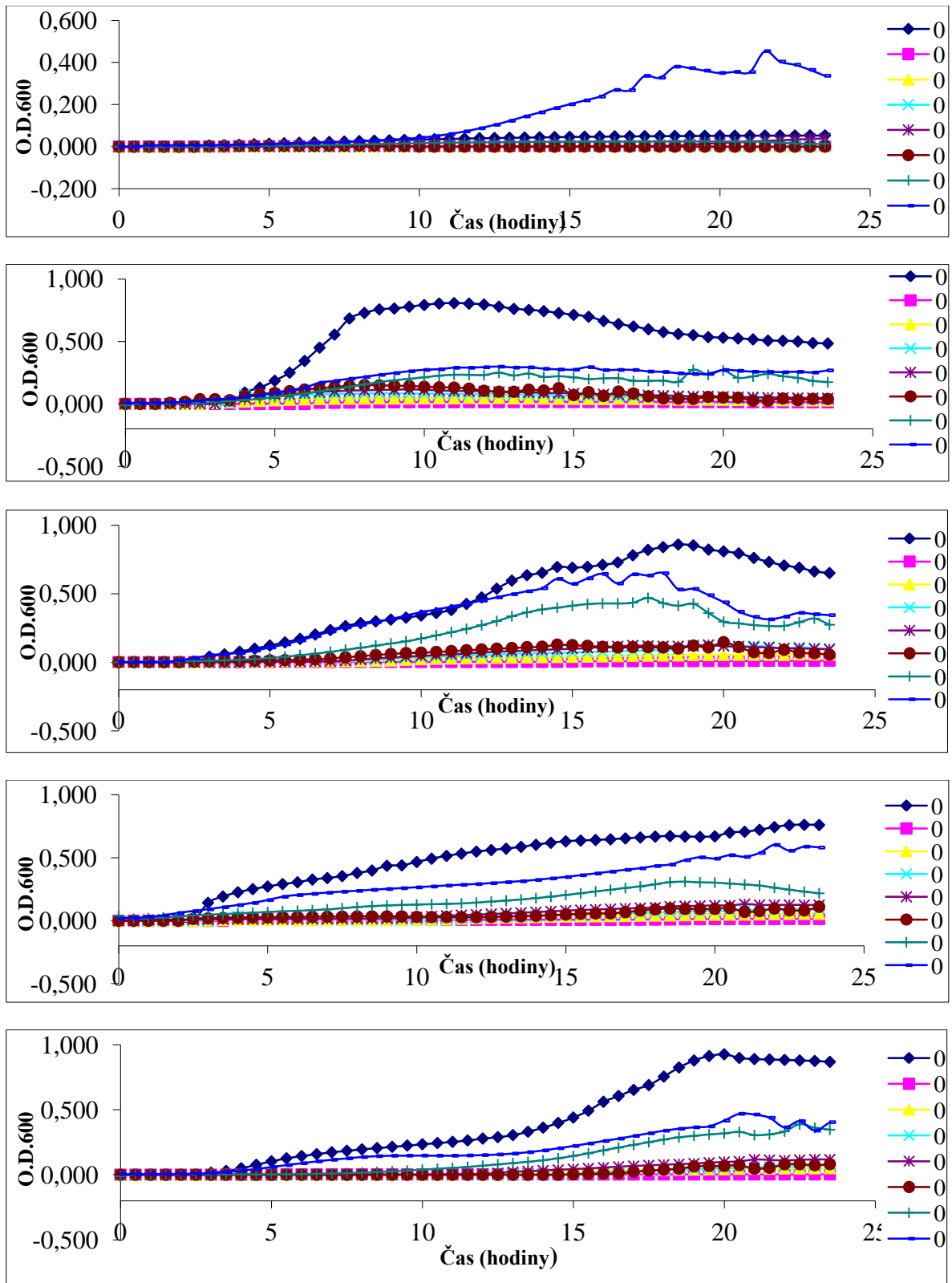
Obr. 33. Srovnání mikroemulzí obsahující tymiánový olej fy Nobilis *vlevo*, fy Biomedica *vpravo* a vliv propylenglykolu jako solubilizátoru.

PŘÍLOHA P III:RK ME CITRONOVÉHO OLEJE (B)



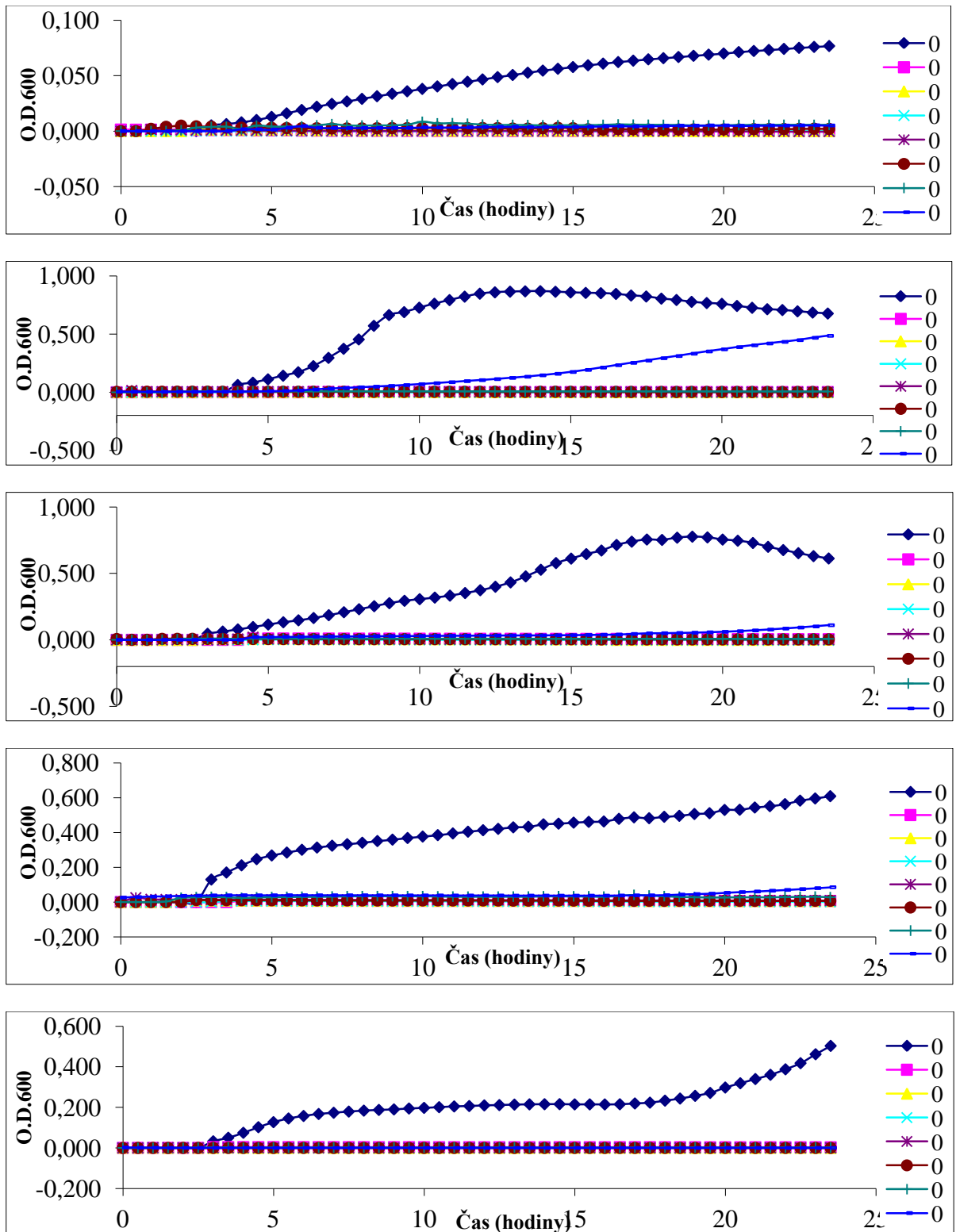
Obr. 34. Růstové křivky ME s citronovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P IV: RK ME HŘEBÍČKOVÉHO OLEJE (B)



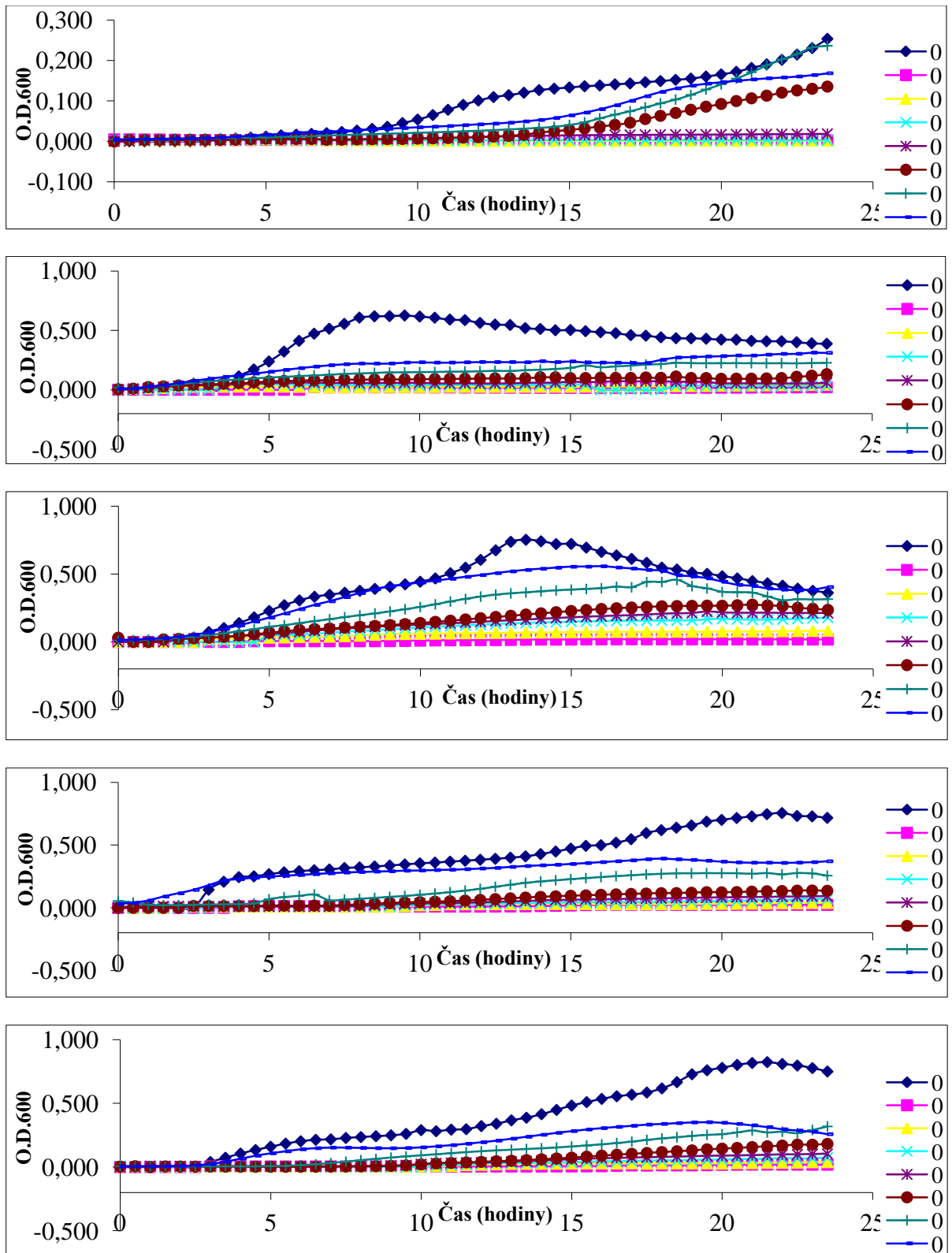
Obr. 35. Růstové křivky ME s hřebíčkovým olejem fy Biomedica. *Shora M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P V: RK SKOŘICOVÉHO OLEJE (B)



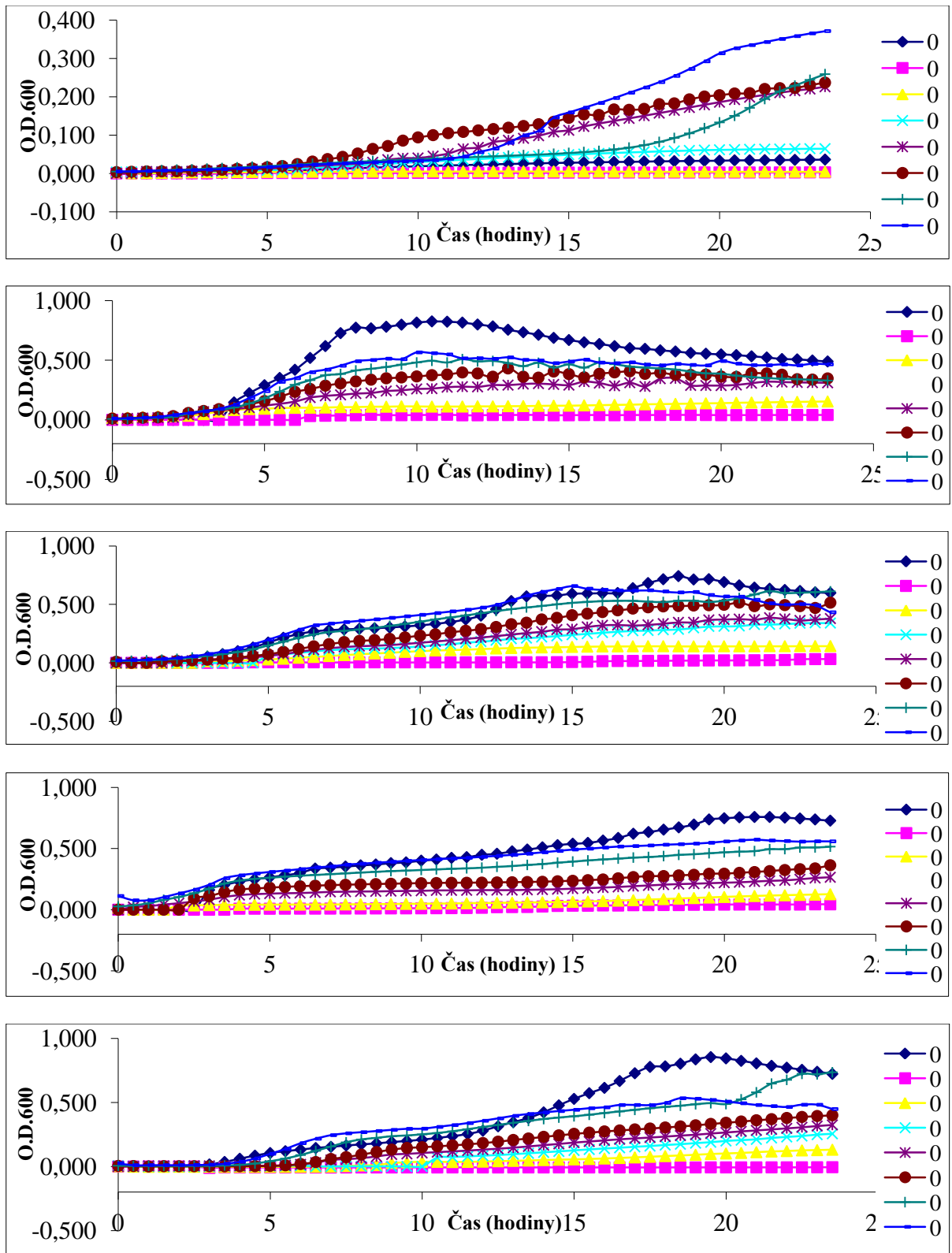
Obr. 36. Růstové křivky ME se skořicovým olejem fy Biomedica. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P VI: RK ME TYMIÁNOVÉHO OLEJE (B)



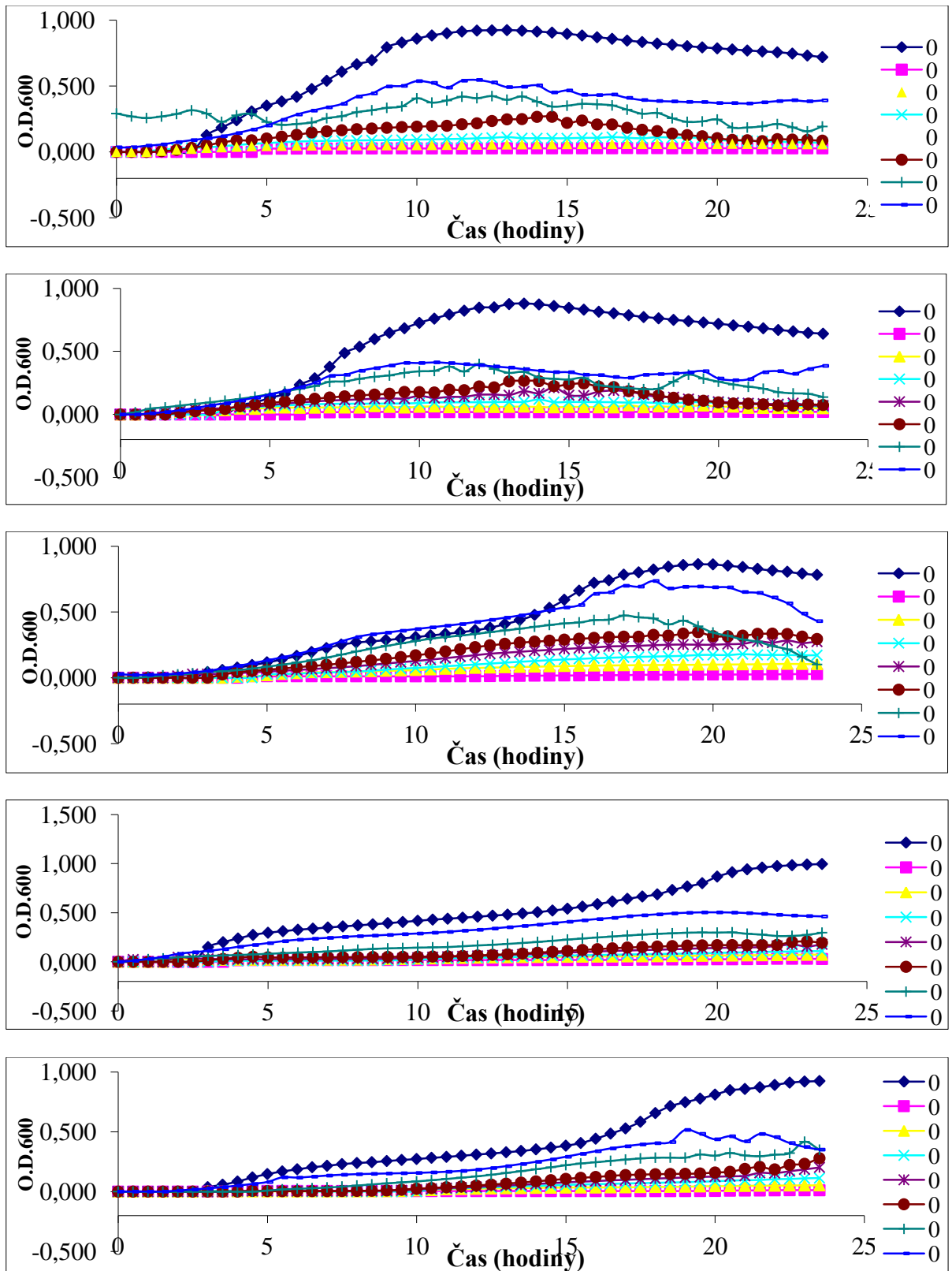
Obr. 37. Růstové křivky ME s tymiánovým olejem fy Biomedica. *Shora M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P VIII RK ME CITRONOVÉHO OLEJE (NT)



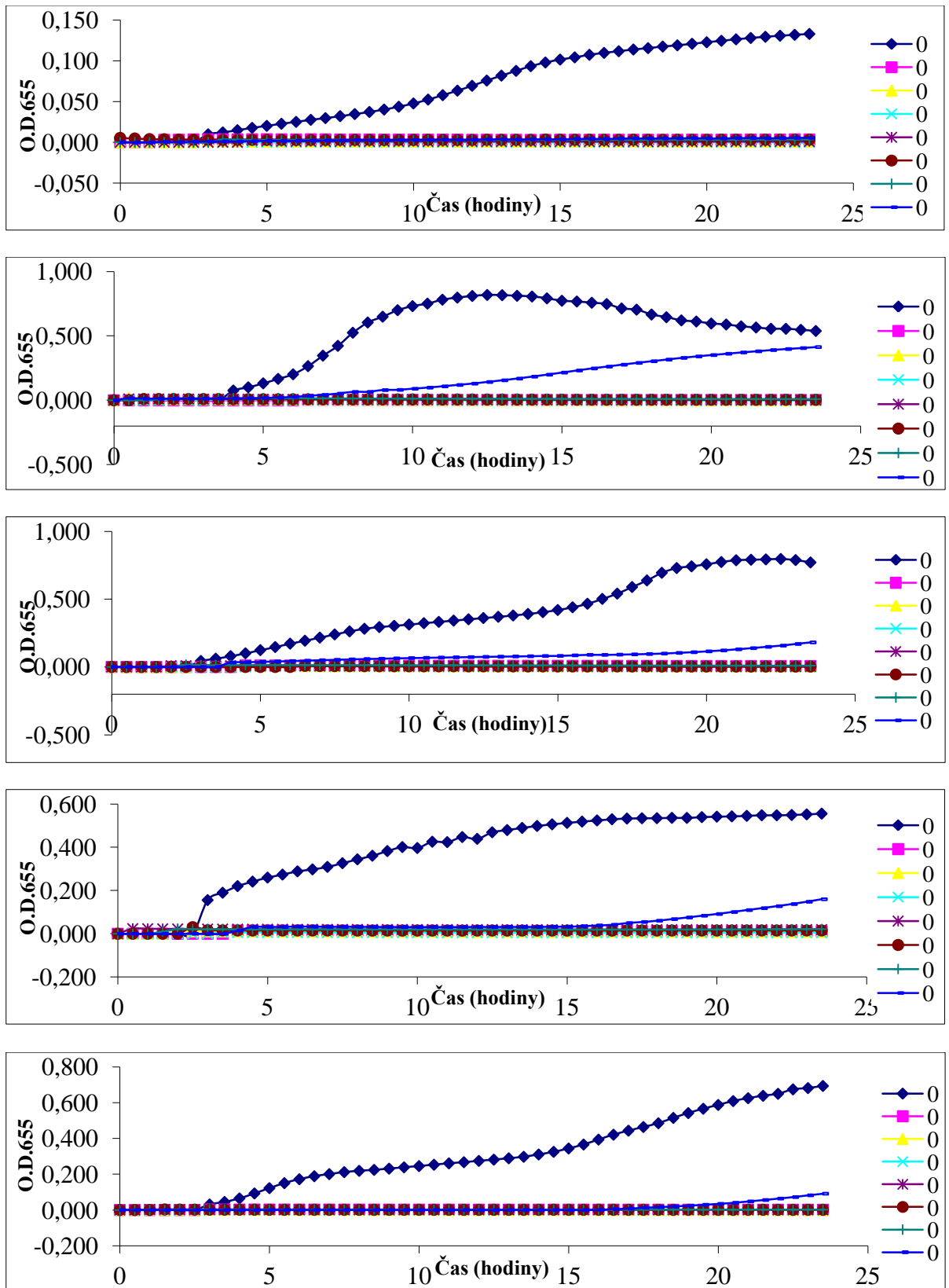
Obr. 38. Růstové křivky ME s citronovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P VIII: ME HŘEBÍČKOVÉHO OLEJE (NT)



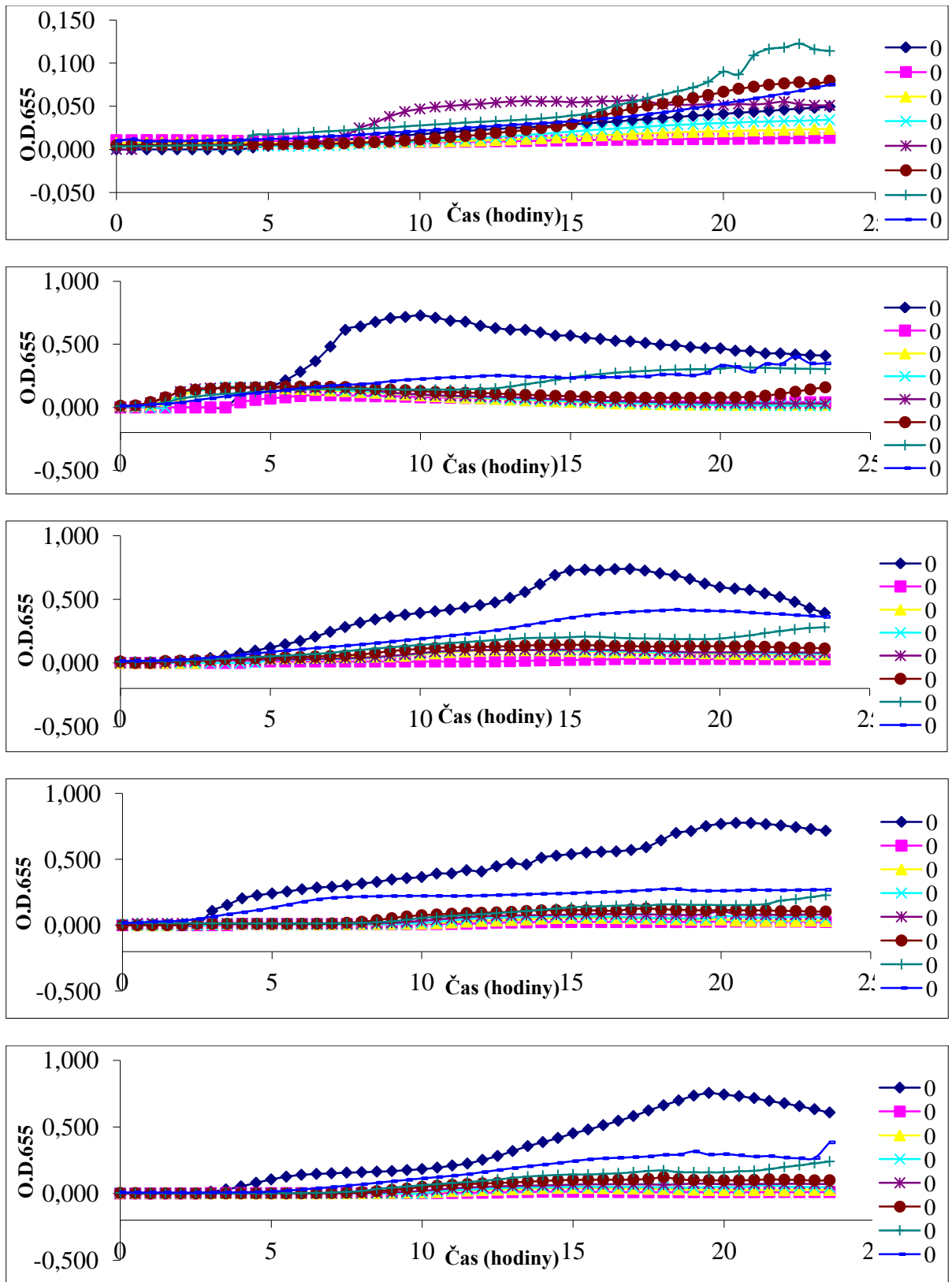
Obr. 39. Růstové křivky ME s hřebíčkovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA PIX: RK ME SE SKOŘICOVÝM OLEJEM (NL)



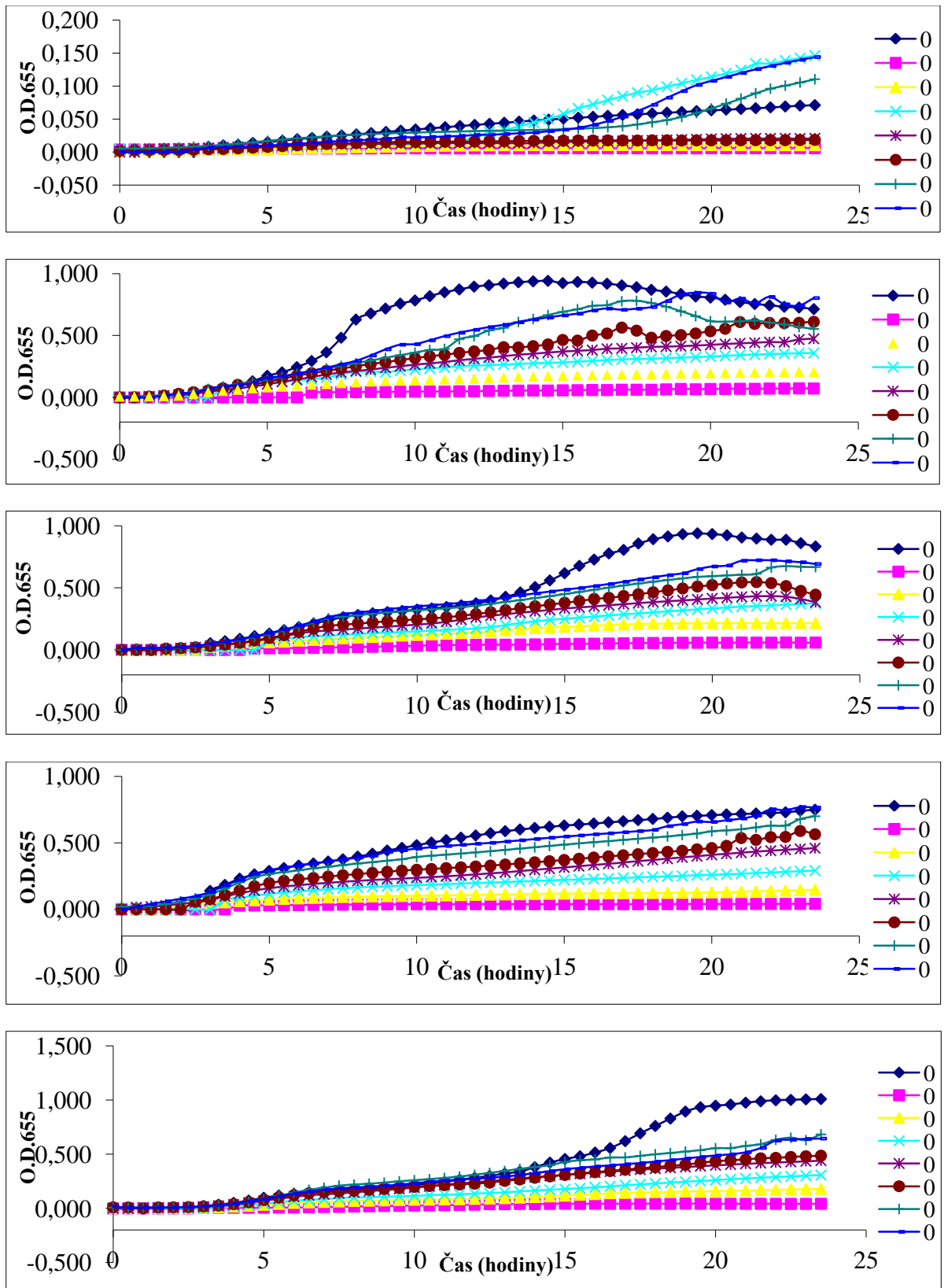
Obr. 40. Růstové křivky ME se skořicovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P X: ME S TYMIÁNOVÝM OLEJEM (NT)



Obr. 41. Růstové křivky ME s tymiánovým olejem fy Nobilis Tilia. Shora *M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]: 0 (bujon) 10000, 8500, 6500, 5000, 3500, 1500, 500.

PŘÍLOHA P XI:RK REFERENČNÍ ME



Obr. 42. Růstové křivky referenční ME. *Shora M.luteus*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*; legenda ředění:0 (bujon), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.