

# **Vliv teploty na stabilitu a antimikrobní účinnost kosmetických gelů**

Bc. Kateřina Burianová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Burianová**

Osobní číslo: **T13398**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv teploty na stabilitu a antimikrobní účinnost  
kosmetických gelů**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na různé druhy gelotvorných látek, jejich vlastnosti, zejména s ohledem na změny při různých teplotách skladování. Dále se věnujte přehledu antimikrobních látek, které se v kosmetických přípravcích využívají. Získané poznatky kriticky zhodnoťte.
2. V praktické části se věnujte sledování změn ve struktuře gelů a v jejich antimikrobní účinnosti v různých teplotních režimech.
3. Dosažené výsledky diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**BARBUCCI, R.: Hydrogels: Biological properties and applications, Springer, Milan, 2009.**

**OSADA, Y., KAJIWARA, K.: Gels handbook: 3 Applications, San Diego, Academic Press, 2001.**

**OTTENBRITE, R. M.: Biomedical Applications of Hydrogels Handbook, Springer Science and Business Media, New York, 2010.**

**BAREL, A., PAYE, M., MAIBACH, I. H.: Handbook of Cosmetic Science and Technology. M. Dekker, New York, 2001.**

**BRANNAN, D. K.: Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook, CRC Press, Florida, 1997.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Pavlína Egner, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

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



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: *Burianová Katarína*.....

Obor: *T.T.D.K.*.....

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 *13. 5. 2014*.....

  
.....

---

<sup>1)</sup> 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 nevýdělečně 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.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Práce byla zaměřená na testování stability gelů obohacených o netradiční antimikrobní látky (kyselina mandlová a esenciální oleje) v různých teplotních režimech a následné ověření jejich antimikrobních vlastností. Základem pro tvorbu gelů byla látka na bázi kyseliny akrylové (Carbomer). Na základě testování lze říci, že zvýšená teplota, společně s prodlužující dobou skladování má nepříznivý vliv, jak na stabilitu, tak na antimikrobní účinnost připravených gelů.

Klíčová slova: stabilita, teplota, esenciální oleje, kyselina mandlová

## **ABSTRACT**

The work was focused on stability testing gels enriched unusual antimicrobial agents (almond acid and essential oils) in different temperature regimes and the subsequent verification of their antimicrobial properties. The basis for the formation of gels was agent based on acrylic acid (Carbomer). Based on testing, it can be said that the elevated temperature, along with increasing storage time has an adverse effect on both the stability and antimicrobial effectiveness on the prepared gels.

Keywords: Stability, Temperature, Essential Oils, Mandelic Acid

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Pavlíně Egner Ph.D. za cenné rady, pomoc a vstřícné vedení, které mi poskytla v průběhu vypracovávání práce.

Dále také děkuji laborantkám za jejich obětavou pomoc a praktické rady poskytnuté během výkonu praktické části práce.

Velký dík patří rovněž mé rodině, která mě při studiu podporovala, jak po morální, tak po finanční stránce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 GELOVÉ FORMY</b> .....	<b>12</b>
1.1    DEFINICE GELU .....	12
1.2    KLASIFIKACE GELŮ.....	12
1.2.1    Reverzibilní gely .....	13
1.2.2    Ireverzibilní gely .....	13
1.2.3    Hydrogely .....	14
1.2.4    Lipogely.....	14
1.3    DRUHY GELOTVORNÝCH LÁTEK .....	14
1.3.1    Carbomer.....	15
1.3.2    Methylcelulóza .....	16
1.3.3    Karboxymethylcelulóza.....	17
1.4    VLASTNOSTI GELŮ.....	18
1.4.1    Mechanické vlastnosti .....	18
1.4.2    Difuzivita a elektrická vodivost .....	19
<b>2 ANTIMIKROBNÍ LÁTKY</b> .....	<b>20</b>
2.1    MIKROFLÓRA LIDSKÉ KŮŽE .....	21
2.1.1    Rezidentní kožní flóra .....	22
2.1.2    Tranzientní kožní flóra.....	27
2.2    DRUHY ANTIMIKROBNÍCH LÁTEK POUŽÍVANÝCH V ANTIMIKROBNÍCH GELECH.....	28
2.2.1    Alkoholy.....	29
2.2.1.1    Ethanol.....	30
2.2.1.2    Benzylalkohol .....	31
2.2.1.3    Izopropylalkohol .....	31
2.2.2    Hydroxy kyseliny .....	31
2.2.2.1    Kyselina mandlová.....	32
2.2.3    Esenciální oleje .....	32
2.2.3.1    Chemické složení esenciálních olejů .....	33
2.2.4    Vliv esenciálních olejů na mikroorganismy.....	36
2.2.5    Změny nastávající u esenciálních olejů.....	38
2.2.6    Faktory ovlivňující stabilitu esenciálních olejů.....	39
2.2.6.1    Teplota .....	39
2.2.6.2    Záření .....	40
2.2.6.3    Přístup kyslíku .....	40
<b>3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>41</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>42</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>43</b>



4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ.....	43
4.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY .....	45
4.3	PŘÍPRAVA GELŮ.....	45
4.3.1	Příprava gelů s esenciálními oleji.....	45
4.3.2	Příprava směsných gelů.....	46
4.4	TESTOVÁNÍ STABILITY GELŮ.....	47
4.4.1	Skladování gelů a intenzita měření .....	47
4.4.2	Měření pH .....	47
4.4.3	Měření viskozity.....	48
4.4.4	Příprava živných médií.....	48
4.4.4.1	Mueller Hinton agar No. 2.....	49
4.4.4.2	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar.....	49
4.4.4.3	Nutrient agar .....	50
4.4.4.4	Nutrient Broth .....	50
4.4.4.5	Malt Extract Broth Base.....	51
4.4.5	Příprava pracovních kultur mikroorganismů .....	51
4.4.6	Jamková difuzní metoda .....	52
4.4.7	Doplňková metoda .....	52
4.5	ZÁTĚŽOVÝ TEST .....	53
4.6	OVĚŘENÍ MIKROBIÁLNÍ ČISTOTY GELŮ .....	54
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
5.1	MĚŘENÍ PH V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ A RŮZNÝCH TEPLOTNÍCH PODMÍNKÁCH.....	55
5.2	VLIV TEPLoty NA VIZKOZITU ANTIMIKROBNÍCH GELŮ.....	58
5.3	ANTIMIKROBNÍ TESTOVÁNÍ GELŮ .....	63
5.4	VYHODNOCENÍ DOPLŇKOVÉ METODY .....	73
5.5	ZMĚNY BARVY A VŮNĚ GELŮ V PRŮBĚHU TESTOVÁNÍ STABILITY .....	75
5.6	VÝSLEDKY ZÁTĚŽOVÉHO TESTU .....	83
5.7	MIKROBIÁLNÍ ČISTOTA GELŮ .....	85
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>97</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>98</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>101</b>

## ÚVOD

V dnešní době se na trhu čím dál více rozšiřuje sortiment antibakteriálních gelů, jejichž hlavními a zároveň účinnými složkami jsou alkoholy, především ethanol a izopropylalkohol v koncentracích 30 % a více. Nízké koncentrace alkoholů však nejsou příliš účinné zejména proti patogenním mikroorganismům, jelikož se antimikrobní účinnost zvyšuje s nárůstem koncentrace alkoholu. Takovéto přípravky běžně dostupné ve všech drogeriích jsou rychlémi a snadnými pomocníky k redukci mikroorganismů na pokožce rukou, nejsou však určeny k jejich stoprocentní likvidaci, ani neslouží jako náhrada běžného mytí rukou mýdlem. I přes mnoho praktických výhod těchto přípravků, mohou vlivem jejich častého používání a v důsledku vyšší koncentrace alkoholu způsobovat, zvláště u lidí s citlivější pokožkou, podráždění kůže rukou, projevující se vysušenou a popraskanou kůží, která se může stát prekurzorem vážnějších onemocnění, kdy vlivem vzniklých prasklin mohou mikroorganismy prostupovat hlouběji do kůže a způsobovat tak nepřehledná množství onemocnění. Ve velké řadě případů jsou tyto nepříznivé vlastnosti alkoholů na druhou stranu kompenzovány přidávkem hydratačních složek.

Dnešní doba si čím dál více prosazuje alternativní, k přírodě šetrnější přípravky, a proto je nasnadě všech výrobců vyrábět přípravky na bázi přírodních surovin. Proto je i cílem této práce příprava takového alternativního antimikrobního gelu, u něhož byly účinnou látkou esenciální oleje a kyselina mandlová a dále především jeho testování stability s ohledem neje na jeho strukturní změny. Tyto alternativní suroviny nejenže vynikají dobrou antimikrobní účinností i v gelové formulaci, ale také poskytují příjemný senzorický efekt, na rozdíl od gelů na bázi alkoholu. Jelikož se však jedná o přírodní olejové látky, potýkáme s problémem jejich stability, a to především z hlediska degradace olejů, která může hrozit především v případech vystavení takovýchto přípravků zvýšené teplotě. Tyto složky s sebou mohou nést ale i další technologické vady, které se mohou projevit na výsledném vzhledu přípravků, který nebude pro spotřebitele příliš příznivý. Další nevýhodu mohou alternativní suroviny přinášet z hlediska hrožících alergických reakcí na danou účinnou látku v přípravku. Takovéto a mnoho dalších aspektů musí výrobci při vývinu nových přípravků zohlednit, což není mnohdy jednoduchou a rychlou záležitostí, doprovázenou navíc i mnohými komplikacemi.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 GELOVÉ FORMY

Gelové formy jsou v dnešní době poměrně rozšířeným druhem kosmetických přípravků a přípravků pro osobní hygienu. Gely jsou většinou čirého charakteru, obsahují různý podíl vody, popřípadě látky tukové povahy. Nejčastějším příkladem takovýchto přípravků může být nepřeberné množství gelů pro ošetření pokožky rukou, gely na holení, vlasové stylingové gely a mnoho dalších. Kosmetické gely jsou široce využívány především díky snadné aplikaci, roztíratelnosti a vstřebatelnosti [1, s. 126].

### 1.1 Definice gelu

Gely jsou koloidně disperzní systémy, tvořené trojrozměrnou sítí, vytvářející souvislou strukturu, která prostupuje celým disperzním prostředím. Navenek se jedná o stejnorodé systémy, ve kterých jsou dispergované částice koloidních rozměrů fixovány a pohyblivé jsou pouze s celým objemem gelu. Dispergované částice stejně jako dispergované prostředí vytvářejí u gelu kontinuální fázi. Navenek se toto uspořádání projevuje tak, že gely mají mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav přesto, že disperzní prostředí je kapalné (gely jsou elastické nebo alespoň plastické). Spojováním disperzních částic je vlivem fyzikálních a chemických sil tvořena prostorová síť [2, s. 3], [3, s. 36], [4, s. 551], [5, s. 162].

Gely mají charakter tuhých nebo polotuhých soustav rosolovité povahy, vznikají rozpuštěním silně solvatujících látek (polymery a jiné zahušťující látky o vysoké molekulové hmotnosti) v kapalině. Jedná se obecně o přípravky na bázi vody [2, s. 3], [3, s. 36], [4, s. 551], [5, s. 162].

### 1.2 Klasifikace gelů

Gely lze rozdělovat dle různých hledisek. Nejčastěji bývají děleny na reverzibilní a ireverzibilní, tedy podle schopnosti navrátit se po vysušení do původního stavu. Reverzibilní nebo také elastické gely zmenšují svůj objem vysoušením a přechází na kompaktní xerogely, které jsou schopny přecházet do původního gelovitého stavu při styku s disperzním prostředím, popřípadě jinými kapalinami. Ireverzibilní gely vznikají gelatinizací lyofobních solů, nelze je při styku s disperzním prostředím vrátit do původního stavu po vysušení [3, s. 36-37], [4, s. 551-553].

Dále lze klasifikovat gely podle chemického složení disperzního podílu, a to na organické a anorganické. Podle charakteru disperzního prostředí na hydrogely, kdy disperzní prostředí tvoří voda a organogely, jejichž disperzní prostředí tvoří organická kapalina, dále pak lipogely s disperzním prostředím tvořeným látkami tukové povahy [4, s. 551-553], [6, s. 216-220].

### 1.2.1 Reverzibilní gely

Prostorová struktura reverzibilního gelu je tvořena sítí makromolekulárních řetězců spojených v místech, které se nazývají uzly. Reverzibilní gely mohou vznikat botnáním xerogelů nebo gelací roztoků lineárních polymerů [4, s. 553-554], [7, s. 80-89].

Spojováním molekulárních řetězců v koloidních roztocích neboli gelací vznikají jak chemicky, tak fyzikálně síťované gely. Chemicky síťované gely vznikají zesíťováním lineárních polymerů za přítomnosti síťovacího činidla nebo vhodně uspořádanou polymerací monomerů. Fyzikálně síťované gely vznikají působením například van der Waalsových sil, kdy dochází ke spojování polymerních řetězců do uzlů [4, s. 553-554], [7, s. 80-89].

Termoreverzibilitu vykazuje většina fyzikálně síťovaných gelů, tzn. gely, které vznikly ochlazením roztoku lze ohřátím převést znovu na roztok. Teplota, při které dojde k vytvoření gelové sítě, se označuje jako teplota tuhnutí nebo také bod gelace. Bod ztekucení nebo tzv. teplota tání je teplota, při které nekonečná síťovitá struktura vymizí. Teplota ztekucení je pro většinu gelů o 10 až 20 °C vyšší než teplota tuhnutí [4, s. 553-554], [7, s. 80-89].

### 1.2.2 Ireverzibilní gely

Po vysušení ireverzibilní gely zaujmají přibližně stejný objem jako původní lyogely, jsou však porézní. Mají schopnost absorbovat poměrně velké množství kapaliny, přesto nedochází k botnání. Ireverzibilní gely vznikají gelací lyofobních solů. Názorným příkladem ireverzibilních gelů může být například silikagel [4, s. 554-556].

Disperzní prostředí u těchto gelů je uzavíráno v mezerách prostorové sítě. Prostorová síť vzniká vzájemným spojováním těch míst částí, u kterých došlo ke ztrátě stability povrchu, částečným narušením ochranné vrstvy disperzních částic [4, s. 554-556].

### 1.2.3 Hydrogely

Hydrogely se řadí mezi síťované polymery, které díky své hydrofilní povaze mohou absorbovat velké množství vody. Schopnost hydrogelů absorbovat vodu vychází z hydrofilních funkčních skupin navázaných na polymerní kostru, zatímco jejich odolnost proti rozpouštění vzniká z příčných vazeb mezi řetězci sítě [8, s. 1-8], [9].

Během posledních dvou desetiletí, byly postupně přírodní hydrogely nahrazeny syntetickými, a to díky svým lepším funkčním vlastnostem, mezi které patří dlouhá životnost, velmi dobrá absorpční schopnost vody a vysoká pevnost gelu, také si zachovávají stabilitu při silných výkyvech teplot [9].

Hydrogelové výrobky pro hygienické aplikace jsou založeny zejména na kyselině akrylové a jejich solích, methylcelulóze nebo neionických celulóзовých etherech. Do hydrogelů mohou být přidávány různé látky, mezi které patří humektanty, určeny především k zabránění dehydratace povrchových vrstev kůže. K dehydrataci může docházet po opakované aplikaci hydrogelů, kdy dochází k odpařování rozpouštědla z povrchu kůže, což se může projevit mírným ochlazujícím účinkem [2, s. 3], [9], [10].

### 1.2.4 Lipogely

Lipogely nebo takzvané olejové gely jsou gely, kde vnější fázi tvoří oleje, látky tukového charakteru, různé druhy vosků, parafinových uhlovodíků a vazelíny. Jako gelotvorná látka se zde může uplatňovat například koloidní oxid křemičitý. Vzhledově se převážně jedná o transparentní gelové základy [11].

## 1.3 Druhy gelotvorných látek

Gelotvorné látky patří mezi nejčastěji používané látky při výrobě kosmetických přípravků. Primárním účelem gelotvorných látek je zlepšení konzistence a vzhledu výrobku zvýšením jeho viskozity. V kosmetice se běžně používají podobné gelotvorné látky jako v potravinářství, které mohou být jak přírodního, tak syntetického původu. Dnes je široce využíváno ve vodě rozpustných polymerů. Mezi přírodní polymery se řadí především polysacharidy a jejich chemické deriváty. Do polymerních polysacharidových gelotvorných látek se řadí guarová guma a její deriváty, karubin, celulóзовé deriváty a xantanová guma. Syntetické polymery, které se používají, jsou většinou na bázi akrylátů a mohou být zesítěné

nebo rozpustné v alkáliích, či v botnajících formách. Jako gelotvorná látka v dezinfekčních a antimikrobních gelech se nejčastěji využívá carbomer [12], [13, s. 4].

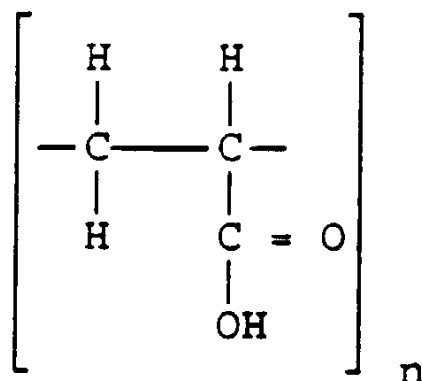
### 1.3.1 Carbomer

Carbomer, komerčně dostupný jako Carbopol nebo Polygel CA, se řadí do skupiny gelotvorných látek založených na bázi kyseliny akrylové. Většina Carbomerů jsou homo- a kopolymery kyseliny akrylové, zesíťované s polyalkenylpolyetherem a vykazují vysokou molekulovou hmotnost. Carbomerů existuje několik forem, navzájem se liší molekulovou hmotností. Všechny formy jsou k dispozici buď jako suché, bílé prášky s mírně kyselým zápachem nebo jako kapaliny [7, s. 80-89], [14, s. 17-18].

Carbopolové gely vznikají rozptýlením mikrogelových částic ve vodném roztoku a následným neutralizováním hydroxidem sodným nebo triethanolaminem, kdy v důsledku ionizace řetězce polyakrylové kyseliny dochází k bobtnání. K efektivnímu gelování a zvýšení viskozity může dojít pouze tehdy, zvýší-li se hodnota pH nad 5 [7, s. 80-89], [14, s. 17-18].

V kosmetice a toaletních přípravcích se nejčastěji používají formy Carbomerů 941, 934 a 940. Oproti etherům celulózy jsou méně náchylné k mikrobiální kontaminaci. K nevýhodám Carbomerů patří neslučitelnost s kationickými povrchově aktivními látkami a výrazné snížení viskozity v přítomnosti elektrolytů. Z tohoto důvodu je jejich použití omezené ke stabilizaci produktů na bázi detergentů. Nejčastěji se Carbomery aplikují při výrobě čirých kosmetických gelů nebo pro stabilizaci a zvýšení viskozity neionických emulzních přípravků. Používají se v koncentracích nižších než 1 %, v závislosti na typu přípravku a požadované výsledné viskozitě [7, s. 80-89], [14, s. 17-18].

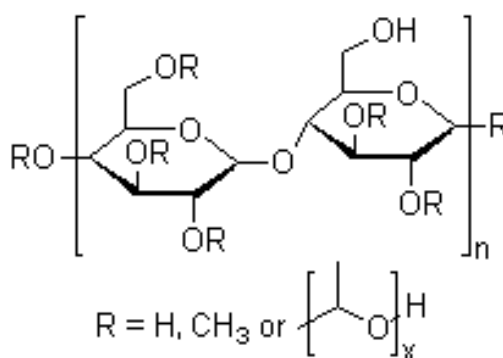
Na základě odborných studií je použití Carbomerů v kosmetických přípravcích bezpečné i při vysokých koncentracích, jelikož vykazují nízkou schopnost iritace a senzibilizace kůže. Dále byla prokázána jeho nízká pravděpodobnost vzniku fototoxicity a fotokontaktní alergie. Struktura Carbomeru je znázorněna na Obr. 1. [15], [16, s. 5].



Obr. 1. Struktura carbomeru [16]

### 1.3.2 Methylcelulóza

Methylcelulóza (MC) je přírodním polymerem a zároveň nejjednodušším derivátem celulózy. Tento derivát má namísto hydroxylových skupin methoxy skupiny. Různé druhy MC lze vytvářet na základě počtu nahrazených hydroxylových skupin. Stupeň substituce (DS) vyjadřuje počet methoxy skupin na jednotku glukosy a může se pohybovat od nuly do tří. Stupeň substituce nula odpovídá nemodifikované celulóze, zatímco DS tři plně substituovanému řetězci. Tento polymer má formu bílého prášku, vykazující malý nebo žádný zápach. Na Obr. 2. je znázorněna obecná struktura methylcelulózy [17].



Obr. 2. Struktura methylcelulózy [18]

Methylcelulóza nemá iontový náboj, a proto je viskozita jen málo ovlivněna pH, zato malé množství solí dokáže viskozitu zvýšit. Methylcelulóza je považována za stabilní pro mnohé aplikace, a to díky svému rozmezí pH, které se pohybuje od 3 do 11. Stupeň zadržení vody může být 5 až 12 hm%. Mnoho komerčně dostupných MC má relativně vysoký stupeň substituce, což je činní poměrně rezistentní vůči enzymům. Ve vodném prostředí inhibují růst mikroorganismů [14, s. 18].



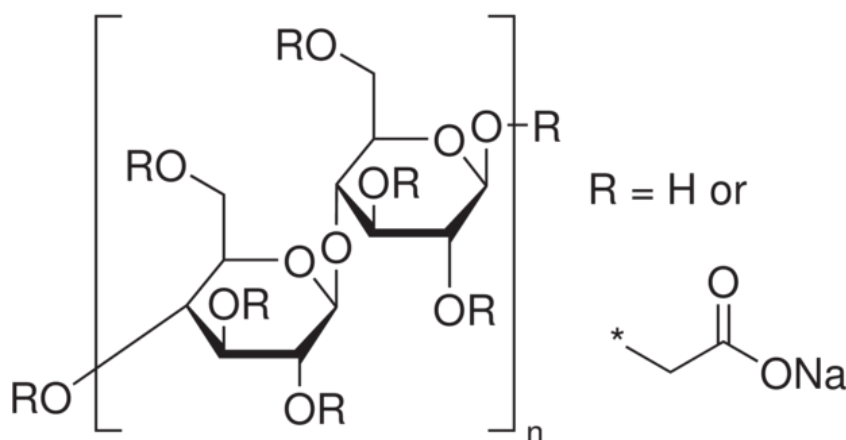
Pro MC je primárním rozpouštědlem voda, rozpustnost je zcela odlišná od anorganických solí. Rozpouštění MC zahrnuje botnání a hydrataci. Teplota gelace se pohybuje u MC kolem 55 °C, tím pádem je MC nad touto teplotou nerozpustná. Komerčně dostupné MC se rozpouští ve vodě o teplotě 0 až 5 °C, je ji však lepší nejprve rozpustit v horké vodě a následně schladit, aby se předešlo vzniku slepenců [14, s. 18], [19, s. 649].

Methylcelulóza je řazena mezi pseudoplastické látky (viskozita klesá při smykovém namáhání), přesto však může za určitých podmínek vykazovat Newtonské chování. Ve zředěných roztocích MC se při nízkých teplotách mění viskozita při smykovém namáhání jen nepatrně. Když dochází ke gelaci na základě zvyšující se teploty, viskozita klesá s nárůstem smykového namáhání. Přítomnost solí toto thixotropní chování umocní [14, s. 18], [19, s. 649].

Nejzajímavější vlastností methylcelulózových roztoků je její termoreverzibilita, neboli schopnost tvořit gely při zahřevu a následným snížením teploty vznikne sol [20].

### 1.3.3 Karboxymethylcelulóza

Karboxymethylcelulóza (CMC), lépe řečeno její sodná sůl, je syntetizována pomocí alkalicko-katalytycké reakce celulózy s kyselinou chloroctovou. Tento derivát celulózy má na některých z hydroxylových skupin glukopyranózových monomerů navázané karboxylové skupiny (-CH<sub>2</sub>-COOH). Základními strukturálními jednotkami CMC jsou tedy β-(1,4)-D-glukopyranózové polymery celulózy. Struktura CMC je znázorněna na Obr. 3. [21, s. 360-363].



Obr. 3. Struktura karboxymethylcelulózy [22]

Pojem stupeň substituce označuje průměrný počet karboxymethylových skupin připojených ke každému glukopyranózovému monomeru. Rozpustnost ve vodě je tedy závislá na zavedení karboxymethylových skupin podél řetězce celulózy, což má za následek hydrataci molekuly, tím pádem je možné CMC rozpouštět jak v teplé, tak studené vodě [21, s. 360-363].

Viskozita roztoku CMC je ovlivněna rozpuštěnými látkami, především solemi. Pokud by došlo nejprve k rozpuštění solí a následně přidání polymeru, sůl by inhibovala rozklad krystalických oblastí za vzniku málo viskózního roztoku [23, s. 18-23].

Roztoky CMC jsou ne-newtonské, tím pádem se viskozita mění v závislosti na smykovém namáhání, od velmi viskózního stavu po kapalný. Pokud je smykové namáhání přerušeno, okamžitě se roztok vrací do původního stavu. Takovému chování se říká pseudoplastické, které nastává díky tendenci dlouhých molekulárních řetězců orientovat se ve směru proudění při namáhání [23, s. 18-23].

## 1.4 Vlastnosti gelů

Gely disponují různými vlastnostmi, mezi které patří především mechanické vlastnosti, do nichž se řadí tixotropie, dále mají specifickou elektrickou vodivost a difuzivitu. Mezi vlastnosti gelů se také řadí jejich stárnutí, které se projevuje vytékáním části původně přítomné kapaliny z gelu v závislosti na čase, následkem smršťující se strukturní sítě gelu [4, s. 554-556].

### 1.4.1 Mechanické vlastnosti

Gely vykazují mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav, i když je disperzním prostředím kapalina. Jsou schopny odolávat tečnému napětí, které je závislé na pevnosti a koncentraci uzlů. Pod určitou hodnotou tečného napětí se gely chovají jako elastická tuhá tělesa. Značně elastické jsou reverzibilní gely s kovalentními spoji, které obsahují malý počet vazeb na jednotku objemu. Čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím menší je možnost změny tvaru makromolekuly a tím rigidnější je vzniklá prostorová síť [4, s. 554-556], [6, s. 216-220].

Některé gely vykazují určitý jev, takzvanou tixotropii. Tixotropní vlastnosti vykazují některé reverzibilní i ireverzibilní gely s fyzikálními spoji. Jsou-li síly poutající původní dis-

perzní částice do síťové struktury velmi slabé, dojde mechanickým účinkem k převedení gelu opět na sol rozrušením slabých vazeb mezi částicemi. Nový gel vzniká pomalým obnovováním vazeb, nechá-li se ztekucený sol stát v klidu. Pokud gely polymerů obsahují různě pevné uzly, tixotropii nejeví. Následkem mechanického namáhání dochází k porušení pouze méně pevných vazeb, které po opětovném spojení vytvoří strukturu s odlišnými vlastnostmi [4, s. 554-556], [6, s. 216-220].

#### 1.4.2 Difuzivita a elektrická vodivost

Nízkomolekulární látky v gelu mají o něco menší difuzivitu než původní sol. Difuzivita nízkomolekulárních iontů v gelech není ovlivňována tepelnými konvencemi ani prouděním díky síťovité struktuře. Tvorbu Liesegangových obrazců v gelech umožňuje nerušená difuze, která se projevuje například barevnými proužky v achátech. Tyto obrazce vznikají v případě, kdy do gelu, který obsahuje nízkomolekulární látku, difunduje další látka, která s ní může tvořit nerozpustnou sloučeninu, probíhá srážecí reakce jen v určitých zónách soustavy, které se střídají se zónami, v nichž se sraženina netvoří [6, s. 216-220].

Malé molekuly a ionty rozpuštěných látek se pohybují v disperzním prostředí v prostorách mezi síťovitou strukturou disperzního podílu téměř stejně rychle jako v odpovídajícím solu. Elektrická vodivost gelů zůstává tedy téměř stejně vysoká jako v solu [6, s. 216].

## 2 ANTIMIKROBNÍ LÁTKY

Antimikrobní látky slouží v kosmetických přípravcích k redukci počtu mikroorganismů. Tyto látky lze dělit z několika hledisek, především podle způsobu působení na baktericidní, které usmrcují mikroby a bakteriostatické, které potlačují množení mikroorganismů. Dále podle spektra účinnosti na antimikrobní látky s úzkým, středním a širokým spektrem účinku. Dalším možným dělením je podle mechanismu působnosti, kdy antimikrobní látky narušují buněčnou stěnu, dále mohou narušovat cytoplazmatickou membránu nebo syntézu nukleových kyselin a bílkovin [24].

Kosmetické přípravky jsou heterogenní směsi, obsahující velké množství jak přírodních, tak syntetických surovin, které jsou považovány za vhodné substráty pro přežití a rozvoj mnoha různých mikroorganismů. To je jeden z hlavních důvodů použití antimikrobních látek v kosmetických přípravcích [25, s. 293-295].

Kvalita kosmetických přípravků je závislá především na jejich čistotě, a to z hlediska mikrobiální kontaminace, především patogenní mikroflóra je riziková pro zdraví uživatele. Mikroorganismy, nejen že mohou být rizikové pro zdraví lidí, ale mohou také nepříznivě ovlivňovat vlastnosti kosmetických přípravků, a to především změnou konzistence, barvy nebo vůně. Změny jsou způsobeny mikrobiálním rozkladem jednotlivých ingrediencí. Aby se předešlo negativnímu působení mikroorganismů, kosmetické přípravky nesmí obsahovat patogenní, oportunně patogenní a toxinogenní mikroorganismy [5, s. 105], [26, s. 155-158].

Nejčastějšími zdroji kontaminace jsou ingredience, voda, lidské zdroje a prostředí výroby. Přírodní suroviny představují mnohem větší riziko kontaminace oproti syntetickým. Častějším zdrojem kontaminace bývá voda, která se využívá nejen při výrobě kosmetických přípravků, ale je i součástí běžné údržby výrobního zařízení. Mezi nejčastější kontaminanty vody patří pseudomonády, konkrétně *Pseudomonas aeruginosa* a koliformní bakterie, z nichž se nejčastěji vyskytuje *Escherichia coli*. Další zdroj kontaminace ve výrobě představují pracovníci, zvláště ti, kteří nedodržují zásady osobní hygieny nebo nevhodně nakládají s výrobky. Takový zdroj lidské kontaminace je považován za primární, k sekundárnímu zdroji kontaminace dochází nevhodným uskladněním nebo běžným používáním výrobků uživatelem, který kontaminuje přípravek mikroflórou kůže, nejčastěji *Staphylococcus aureus*. Minimální riziko kontaminace by měly představovat výrobní podmín-

ky, jelikož se na kosmetické přípravky vztahuje Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích, které ukládá povinnost dodržování správné výrobní praxe. Podle zásad je nutno dodržovat správné postupy při čištění a dezinfekci výrobního zařízení i celého provozu výroby [5, s. 105], [26, s. 155-158].

V dnešní době se čím dál více začíná využívat přírodních antimikrobních látek (esenciální oleje), především v přírodní kosmetice, přesto však chemické látky mají častější využití, a to především z důvodu kontaktních alergenů, kterých je v esenciálních olejích velké množství. Projev účinku chemických látek na mikroorganismy záleží na koncentraci a době působení. Antimikrobní látky nejčastěji přímo poškozují strukturu mikroorganismů nebo narušují jejich základní metabolické procesy, například oxidací za použití sloučenin chlóru nebo peroxidy, redukcí aldehydy, hydrolyzou kyselinami nebo hydroxidy, dále působením alkoholů dochází k dehydrataci nebo koagulaci bílkovin [5, s. 105], [26, s. 155-158].

U každého člověka má pokožka určitý stupeň odolnosti vůči vnějším vlivům. Negativní vlivy opakovaným působením mohou způsobovat podráždění, vedoucí ke vzniku dermatitid nebo ekzémů, projevující se záněty pokožky. Působení silně dráždivých látek na pokožku vyvolává kontaktní iritační dermatitidu. Opakované působení takovýchto látek na kůži, může vést až k narušení kožní ochranné bariéry a zapříčinit tak projevy chronických zánětů. K rozvoji různých typů ekzémů bývá náchylnější neléčená nebo nesprávně ošetřená pokožka. Velmi častým typem ekzémů je kontaktní alergický ekzém, vyvolaný opakovaným stykem pokožky s alergenní látkou, projevující se svědivými pupínky nebo puchýřky [27].

## 2.1 Mikroflóra lidské kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla, zabírající u dospělého člověka přibližně plochu 1,6 až 2 m<sup>2</sup> a vyskytují se na ní rozmanitá stanoviště s množstvím záhybů a specifických výklenků, které poskytují vhodné podmínky a úkryt široké škály mikroorganismů, zahrnující bakterie, kvasinky, plísně, viry, ale i roztoče, z nichž většina je neškodná nebo dokonce prospěšná, některá však patogenní. Kůže představuje pomyslnou bariéru, tvořící rozhraní mezi okolním prostředím, a proto chrání tělo z možného napadení cizími organismy nebo toxickými látkami [28].

Na kůži se vyskytují různé typy mikrobiálních flór, mezi které patří například rezidentní, tranzientní a přesná flóra, zahrnující jak nepatogenní, tak patogenní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy při porušení pokožky mohou pronikat až do podkoží a vyvolat záněty. Stálá neboli rezidentní flóra je tvořena mikroorganismy vyskytující se v určitých oblastech těla a věku člověka, schopna se rychle obnovit v případě porušení. Přejídná neboli tranzientní flóra kolonizující kůži a sliznice několik hodin, dnů nebo týdnů, pochází z vnějšího prostředí. Onemocnění vzniká tehdy, dojde-li k narušení normální mikrobiální flóry. Kontaminující mikroflóra osidlující pokožku krátkou dobu představuje přenosná kožní flóra, která se může lehce stát flórou běžnou. Především ruce, které jsou nejvíce v kontaktu s okolním prostředím při práci a ostatních činnostech, je osidlována celou škálou mikrobů, podstatou je však řada mikroorganismů, zabezpečující ochrannou mikrobiální bariéru [27].

### 2.1.1 Rezidentní kožní flóra

Rezidentní kožní flóra představuje vyvážený ekosystém, kde rezidentní bakterie hrají důležitou fyziologickou roli. Jednou z hlavních výhod rezidentní flóry je ochrana kůže člověka proti infekci. Jakákoli změna v mikrobiologické rovnováze může vést k negativním důsledkům. Zastoupení rezidentní flóry je velmi rozmanité a závislé na mnoha faktorech, mezi které patří věk, pohlaví a klimatické podmínky. Mikroorganismy osidlují lidské tělo již od narození, kdy u novorozenců tvoří až 80 % kolonizující flóry koaguláza-negativní stafylokoky. Obecně u dětí převládá spíše tranzientní flóra v podobě streptokoků a bacilů. Složení rezidentní flóry se však s věkem mění a v období puberty hojně kolonizují kůži anaerobní *Propionibacterium*, v důsledku zvyšující se tvorby kožního mazu. V průběhu dospívání a v období dospělosti se na kůži vyskytují mikrokoky, stafylokoky, některé gram-negativní bakterie, mezi které patří například *Acinetobacter*. Součástí rezidentní flóry jsou kvasinky *Malassezia* a *Candida*. V zimním období převažují na kůži mikrokoky, zatímco v létě koryneformní bakterie [29, s. 11].

Funkce rezidentní kožní mikroflóry spočívá především v obraně vůči patogenním mikroorganismům, a to jak přímo, tak nepřímo. Mezi přímé účinky lze uvést produkci bakteriocidů a toxických metabolitů, vyčerpání základních živin, prevenci adheze konkurenčních bakterií, degradaci toxinů a mnoho dalších [30].

Symbiotické bakterie spolu soutěží o živiny, prostor a receptory. Například *Staphylococcus epidermidis* navázáním na receptory keratinocytů inhibuje adhezi virulentního *Staphylococcus aureus*. Komenzálové mohou uvolňovat druhově specifické antibiotické látky, známé jako bakteriocidy. Například některé kmeny *Staphylococcus aureus* uvolňují bakteriocidy inhibující jedovaté stafylokoky. Nepřímým účinkem mohou bakterie vyvolat u hostitele zvýšenou produkci protilátek, stimulovat fagocytózu, čistící mechanismy a produkci cytokinů. Například *Propionibacterium acnes* uvolňuje mastné kyseliny, čímž dochází k okyselení prostředí a inhibici růstu *Streptococcus pyogenes* [30].

### Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram-pozitivní ( $G^+$ ) nepohyblivé koky, velké přibližně 0,7 až 1,2  $\mu\text{m}$ , vyskytující se samostatně nebo ve shlucích. Řadí se mezi aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie, rezistentní k lysozymu a schopné růst i v prostředí 10% roztoku NaCl. Stafylokoky lze diagnostikovat plazmokoagulázou, z čehož plyne i dělení na koaguláza-pozitivní a negativní stafylokoky. Mezi koaguláza-pozitivní se řadí *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus lugdunensis*, koaguláza-negativní jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*. Obecně patří mezi nutričně náročné organismy, vyžadující pro svůj růst zejména dusík, aminokyseliny, vitamíny (thiamin a nisin) a uracil [31, s. 294].

Zástupci rodu *Staphylococcus* jsou velmi rozšíření v přírodě. V důsledku jejich všudypřítomnosti a přizpůsobitelnosti patří mezi hlavní skupinu bakterií osidlující kůži, kožní žlázy a sliznice nejen člověka, ale i ostatních savců a ptáků [32, s. 57].

*Staphylococcus epidermidis* patří mezi nejrozšířenější, nepatogenní a trvale vyskytující se druh na lidské kůži. Vyskytuje se především ve vlhkých a na výživu bohatých oblastech těla. *Staphylococcus hominis* je také převládajícím komenzálem lidské kůže, osidlující oblasti apokrinních žláz. Oproti jiným druhům kolonizuje i sušší místa kůže. *Staphylococcus capitis* osidluje v dospělosti oblast obličeje, zevního zvukovodu a okolí mazových žláz. V pubertě se vyskytuje především na pokožce hlavy [33, s. 6].

Oproti výše uvedeným druhům stafylokoků, patří *Staphylococcus aureus* mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky, který je znám jako lidský patogen, zodpovědný za celou řadu kožních onemocnění. U třetiny populace je běžným komenzálem na kůži, především v okolí nozder, axily a perinea. Způsobuje široké spektrum onemocnění od pyodermií až po závaž-

nější záněty vnitřních orgánů a sepse. Obecně se jedná především o pyodermie neboli hnisavé kožní infekce. Mezi nejběžnější epidermální infekce u dětí patří impetigo, které může být způsobeno bakteriemi *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus pyogenes*. Impetigo je vysoce přenosná, povrchová infekce začínající jako puchýřky, přecházející do medově zbarvených krust, vyskytující se na obličeji a končetinách. U dospělých postihuje infekce pouze jedince se slabou hygienou. Dále mohou způsobovat povrchové nebo hluboké folikulární infekce postihující folikuly kdekoli na těle, kde se vyskytuje ochlupení, včetně vousaté části obličeje. Povrchová infekce se nazývá folikulitida projevující se zánětlivými pustulami, kterými prochází chlup a erytémovou zónou v okolí folikulu. Pokud dojde k postižení hlubších částí folikulů, může to vést ke vzniku furunkulů v podobě bolestivých pustul s nekrotickým čepem, končící abscesem. Dále mohou onemocnění vyvolávat stafylokokové toxiny. Onemocnění způsobené těmito toxiny se projevuje například syndromem toxického šoku nebo stafylokokovou enterotoxikózou [30], [32, s. 58-59], [33, s. 6].

### **Rod *Micrococcus***

Mikrokoky se řadí mezi  $G^+$  a kataláza-pozitivní koky. Tvarem buněk a morfologickým vzhledem se podobají stafylokokům. Vyskytují se v párech, tetradách nebo nepravidelných shlucích. Produkují karotenoidní pigmenty a jsou mírně halotolerantní. Nejsou patogenní a primárně kolonizují kůži všech savců, sliznice a ústní část hltanu. Mohou způsobovat infekce u pacientů s oslabenou imunitou [34, s 216].

Z lidské kůže byly izolovány druhy, mezi které patří například *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus kristinae* nebo *Micrococcus sedentarius*. Nejčastějším druhem je *Micrococcus luteus*, který ve vzácných případech byl spojen s endokarditidou, meningitidou, pneumonií a septickou artritidou [30], [34, s 216], [35].

### **Rod *Propionibacterium***

Zástupci rodu *Propionibacterium* jsou  $G^+$ , nesporulující, nepohyblivé, podlouhlé tyčinky s kyjovitým větvením. Co se týče potřeby kyslíku, řadí se mezi fakultativně anaerobní nebo aerotolerantní bakterie s variabilní tolerancí ke kyslíku. Tyto bakterie produkují v průběhu fermentace velké množství kyseliny propionové. V membránových lipidech obsahují menachinon (vitamín  $K_2$ ) a nasycenou mastnou kyselinu C15 (kyselina pentadekanová) [36, s. 4].



Na rozdíl od většiny komenzálů snáší anaerobní podmínky, a proto mohou růst hluboko v adnexálních strukturách. U zdravých dospělých tvoří relativně stabilní dominantní složku mikroflóry pilosebaceózních jednotek (např. vlasový folikul a mazové žlázy). Na kůži mohou být přítomny *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum* [30].

Mezi nejznámější a hojně se vyskytující druh patří *Propionibacterium acnes*, který se nejčastěji vyskytuje na kůži, spojivkovém vaku a zažívacím traktu. Je zhruba osmkrát častěji přítomen na aknetických vřídciích než *Propionibacterium granulosum*, a proto se řadí mezi jeden z faktorů patogeneze *Acne vulgaris* neboli chronického zánětlivého onemocnění mazových žláz a vlasových folikulů. Děti mladší než 10 let jsou zřídka kolonizovány *P. acnes* a až stonásobné zvýšení koncentrace *P. acnes* nastává v období puberty s nástupem sekrece kožního mazu [35].

### **Koryneformní bakterie**

Koryneformní bakterie patří mezi  $G^+$ , pleomorfní bakterie kyjovitého tvaru, které nejsou pohyblivé a netvoří spory. Řadí se mezi fakultativně anaerobní bakterie. Většina izolátů z kůže náleží do rodu *Corynebacterium* a *Brevibacterium*. Dále se zde mohou zařazovat také *Propionibacterium sp.* a *Dermabacter sp.* [30].

Korynebakterie mohou být označovány termínem diphteroidy a jsou klasifikovány do čtyř skupin, lipofilní nebo nelipofilní diphteroidy, anaerobní diphteroidy, diphteroidy produkující porfyriny a na ty, které mají některé keratolytické enzymy a jsou spojeny s infekcemi podpažního ochlupení (*Trichomycosis axillaris*). Lipofilní organizmy preferují oblasti bohaté na lipidy nebo kožní maz. Tyto organizmy primárně kolonizují podpaží, neprodukují toxiny a zahrnují například druhy *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*. Nelipofilní kmeny se spíše vyskytují na hladké pokožce. Anaerobní jsou nejčastěji v oblastech bohatých na mazové žlázy [30], [35].

*Dermabacter sp.* a *Brevibacterium sp.* preferují vlhkou, neochlupenou pokožku. *Brevibacterium sp.* produkuje metantiol, který je příčinou zápachu nohou [30].

### **Kvasinky**

Kvasinky jsou eukaryotické aerobní a heterotrofní organizmy, charakteristické tvarem a způsobem množení, kterým je pučení. Některé z mnoha tisíce druhů mohou být patogenní

a způsobovat onemocnění kůže, podkoží nebo systémová onemocnění. Zvláště nebezpečné jsou zejména rody *Candida* [37, s. 166].

Rod *Candida* se vyznačuje rozmanitým tvarem buněk. Většinou se rozmnožují multilaterálním pučením, tvoří oválné blastosporry velikosti 4 až 6  $\mu\text{m}$ . Osm druhů z nich způsobuje onemocnění člověka, z nichž nejčastějšími původci jsou *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dublinensis*, *C. glabrata* atd. [37, s. 166].

*Candida albicans* se běžně vyskytuje u zdravých lidí v symbióze s ostatními mikroorganismy ve střevní a ústní mikroflóře. Infekce způsobené tímto druhem kvasinky, případně jinými druhy rodu *Candida* se nazývají *candidiasis* neboli kandidózy. Způsobují především povrchové infekce sliznic a kůže, mohou ale vznikat i závažnější, život ohrožující systémové infekce vnitřních orgánů. V závislosti na měnících se podmínkách růstu jsou schopny reverzibilního přechodu z vegetativní formy blastické do hyfální. Hyfální fáze růstu se nachází při zánětlivých postiženích sliznic, zatímco blastická fáze je typická pro komenzální osídlení kůže a sliznic [38, s. 209].

Rod *Malassezia* je lipofilním druhem kvasinek, které jsou běžnou součástí normální kožní flóry a dalších teplokrevných živočichů. Tyto kvasinky rostou za aerobních, anaerobních a mikroaerofilních podmínek, díky tomu mohou kolonizovat jakoukoli oblast kůže. Buněčná stěna je vícevrstevná, a proto je mnohem silnější než u jiných kvasinek. Skládají se z mannoproteinů, lipidů a chitinu. Na kůži zdravých jedinců lze nalézt druhy, jako jsou například *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* a *M. obtusa*. Všechny druhy s výjimkou *M. pachydermatis* vyžadují pro růst mastné kyseliny, které získávají přímo z kožního mazu nebo z produktů vylučovaných jinými kožními organismy [39, s 2-3], [40, s 73-75].

Kolonizace kvasinkami rodu *Malassezia* se zvyšuje po pubertě, v závislosti na zvyšující se produkci kožního mazu. Také jsou považovány za možné faktory virulence, a to díky produkci lipoxygenáz, lipáz a fosfolipidů. Fosfolipidy uvolňují kyselinu arachidonovou z epitelových buněk a její metabolity mohou vyvolávat záněty kůže. Pravděpodobně hrají také roli v organismu, v případech mnoha zánětlivých onemocnění kůže, včetně atopické dermatitidy, seboroické dermatitidy a folikulitidy [39, s. 73-75].

### 2.1.2 Tranzientní kožní flóra

Tranzientní kožní flóra nebo tzv. přechodná kožní flóra obvykle nekolonizuje kůži, ale je dočasně přítomna v důsledku povrchového znečištění. Přechodné mikroby nejsou schopny vytvářet trvalé životaschopné a reprodukující se populace, a proto nekolonizují kůži trvale. Počty tranzientních bakterií, které se obvykle nacházejí na vnějších vrstvách kůže, jsou omezeny na minimum, v důsledku neustálé deskvamace kůže a také rutinnímu mytí rukou. Rezidentní kožní flóru lze nalézt ve více chráněných místech, jako jsou například vlasové folikuly, to jí zaručuje vyšší odolnost vůči běžnému mytí mýdlem a čistícími přípravky [41, s. 6], [42], [43, s. 100].

Mezi přechodnou kožní flóru se řadí rody *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Escherichia*, dále pak rod *Bacillus* nebo *Pseudomonas*. Součástí tranzientní flóry může být *Staphylococcus aureus*, včetně druhu methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* [41, s. 6].

#### Rod *Streptococcus*

Streptokoky se řadí mezi fakultativně anaerobní  $G^+$ , kataláza negativní koky uspořádaný do dvojic a řetízků. Některé druhy jsou primárně patogenní. Velkou skupinu tvoří druhy podmíněně patogenní. Zejména  $\beta$ -hemolytické streptokoky jsou jen zřídka součástí normální flóry. Nedostatek  $\beta$ -hemolytických streptokoků na kůži je přisuzován přítomnosti lipidů, které jsou pro streptokoky letální. Jsou součástí normální flóry sliznic a dutiny ústní, konkrétně se jedná o  $\alpha$ -hemolytické streptokoky. Dále kolonizují horní cesty dýchací, vaginální sliznici a zažívací trakt [35], [44, s. 204-205].

Zástupce *Streptococcus pyogenes* je primárně patogenní pro člověka a člověk je jediným přirozeným zdrojem infekce. Způsobuje převážně infekce respiračního traktu v oblastech mírného pásu, zatímco v teplých oblastech jsou častější kožní infekce. Považuje se za původce faryngitid, spály, infekcí kůže a podkoží, konkrétně se jedná o pyoderma a erysipel [44, s. 204-205].

#### Rod *Pseudomonas*

Zástupci rodu *Pseudomonas* se řadí mezi nesporelující, nefermentující aerobní gram-negativní ( $G^-$ ) tyčinky, pohyblivé pomocí bičků, dlouhé přibližně 1,5  $\mu\text{m}$ . Jedná se o ubikvitní, neboli všude přítomné bakterie se značnou schopností adaptace. Nejčastějšími zdroji jsou voda, biofilm na výrobním zařízení a nedostatečná sanitace. Význam pro člověka má především *P. aeruginosa* způsobující infekce kůže a popálenin, dále může

být původcem infekcí urogenitálního a respiračního traktu. V tlustém střevě je součástí normální flóry. Ostatní druhy jsou pro člověka nepatogenní a patří mezi půdní a vodní mikroorganismy nebo mezi rostlinné patogeny [37, s. 85].

### Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* patří mezi  $G^-$  často pohyblivé tyčinky, které nejsou náročné na výživu. Tato čeleď je fakultativně anaerobní se schopností fermentovat. Tvoří malou část kožní flóry. Na kůži se vyskytují převážně ve vlhkých intertriginózních oblastech, mezi které patří podpaží a oblast mezi prsty. Vysoušení je hlavním faktorem bránící množení  $G^-$  bakterií na neporušené kůži. *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* a *Proteus spp.* jsou hojně se vyskytující  $G^-$  organizmy na povrchu kůže. Dají se identifikovat pomocí biochemických testů. V kosmetických přípravcích se především vyskytují druhy jako například *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* a *Escherichiae coli*, dále pak rody *Proteus* a *Klebsiella* [35].

### Sporulující bakterie

Hlavními zástupci sporulujících bakterií jsou rody *Bacillus* a *Clostridium*. Anaerobní sporulující rod *Clostridium* patří mezi  $G^+$  tyčky a vyskytuje se v půdě a ve stolici zvířat a člověka. Produkují exoenzymy, které ve tkáních způsobují infekce, především anaerobní myonekrózy. Mezi nebezpečné onemocnění způsobené klostridiovými exotoxiny patří tetanus a botulismus. Zvláště nebezpečná pro člověka je anaerobní myonekróza, spíše známá pod názvem plynatá sněť, jejímž původcem je především toxin produkovaný *C. perfringens*. Rod *Bacillus* se řadí mezi aerobní sporulující  $G^+$  tyčinky. Jeho příslušníci jsou běžně přítomni v přírodě, zejména v půdě. Většina druhů je nepatogenních, výjimku tvoří *Bacillus anthracis*, zčásti *Bacillus cereus*. Mnoho druhů se využívá k průmyslové produkci antibiotik. Bacily produkují endospory, odolné vůči teplu, radiaci a dezinfekčním přípravkům [37, s. 97-99], [44, s. 227].

## 2.2 Druhy antimikrobních látek používaných v antimikrobních gelech

Antibakteriální gely lze rozdělit do dvou skupin, a to na gely na bázi alkoholu a gely bez obsahu alkoholu. Izopropylalkohol a ethanol patří mezi dvě nejčastěji používané látky v dezinfekčních přípravcích. Ethanol o koncentraci 60 až 80 % spolehlivě inhibuje mikroorganismy, také kombinace s izopropylalkoholem je rovněž účinná. Gely na bázi alkoholu

zaujímají široké uplatnění především ve zdravotnických zařízeních jako dezinfekční činidla [45].

Alternativou gelů na bázi alkoholu jsou gely bez alkoholu, kde účinnou složku alkoholu nahrazuje triclosan nebo benzalkonium chlorid. Benzalkonium chlorid vyniká svými anti-septickými účinky, a proto je vhodný k prevenci infekcí způsobených drobnými poraněními. Triclosan má antibakteriální a fungicidní účinky. Kombinace těchto dvou látek je účinná proti *Staphylococcus aureus*, plísním, kvasinkám a prvokům. Dále hojně využívanou složkou v kosmetických výrobcích zaujímá methylparaben, který vykazuje dobrou antimikrobní aktivitu. Je především účinný proti houbám, dále proti bakteriím, a to konkrétně grampozitivním druhům. I přes četné výhody methylparabenů jako účinných konzervačních látek, některé studie naznačují, že mohou představovat potenciální riziko pro lidské zdraví. Alternativní způsob, jak vyřešit problém mikrobiální čistoty kosmetických přípravků je použití sloučenin, které nejsou konzervačními látkami, ale také vykazují antimikrobní aktivitu. Mezi takové sloučeniny se řadí látky přírodního původu, a to konkrétně rostlinné extrakty a esenciální oleje, u nichž byla prokázána antimikrobní účinnost. Díky tomu, lze tyto přírodní látky úspěšně využít v kosmetickém průmyslu jako antimikrobní činidla [45], [46, s. 232].

### 2.2.1 Alkoholy

Alkoholy se řadí mezi nejčastěji využívané aktivní látky v antimikrobních gelech a dezinfekčních přípravcích, které jsou v dnešní době hojně využívány z důvodu jejich snadného použití. Takovéto dezinfekční přípravky jsou velmi efektivní pro rychlé zničení některých patogenů, a to konkrétně gramnegativních bakterií na lehce znečištěných rukou [47, s. 2129-2131].

Optimální koncentrace alkoholu v dezinfekčních přípravcích se pohybuje v rozmezí 60 až 95 %, z toho plyne, že účinnost proti mikroorganizmům se zvyšuje se vzrůstající koncentrací alkoholu. Nevýhodou používání vysokých koncentrací alkoholu v dezinfekčních přípravcích je při jejich opakovaném používání nadměrné vysušování pokožky rukou, a proto je vhodné přidávat k takovýmto přípravkům glycerol nebo obdobnou hydratační složku, aby se podráždění kůže zabránilo [47, s. 2129-2131].

Antiseptický efekt dezinfekčních přípravků na bázi alkoholu se liší v závislosti na druhu použitého alkoholu, jeho koncentraci, použitím množství a expoziční době. Použití malých

množství alkoholu v kombinaci s krátkou dobou schnutí se výrazně snižuje účinnost, zvláště v případě znečištění rukou organickým materiálem (špína a mastnota) nebo viry [47, s. 2129-2131].

Většina dezinfekčních přípravků na bázi alkoholu obsahuje izopropylalkohol, ethanol, propanol nebo kombinaci těchto látek. Přípravky, které obsahují 50 až 70 % izopropylalkoholu nebo ethanolu jsou účinné ke snižování počtu bakterií na kontaminovaných rukou. Účinnost přípravků na bázi alkoholu proti virům je omezená, například proti rotavirům nebo virům způsobující hepatitidu A účinné nejsou [47, s. 2129-2131].

Gely nebo dezinfekční roztoky na bázi alkoholu mohou po aplikaci na pokožku rukou snižovat počty bakterií o 3,5 logaritmického řádu po 30 sekundách nebo o 4 až 5 logaritmických řádů po 1 minutě. Čas potřebný pro inaktivaci virů je natolik dlouhý, že alkohol již na kůži není aktivní [47, s. 2129-2131].

Antimikrobní aktivita gelů na bázi alkoholu je obvykle nižší než u kapalných přípravků, z důvodu použití gelotvorného činidla, nejčastěji kyseliny polyakrylové (Carbomer) a neutralizátoru (polyamin), které do jisté míry mohou ovlivňovat množství začleněného alkoholu do přípravku nebo gelotvorná síť může bránit v uvolňování alkoholu, čímž se snižuje účinnost přípravku. Z těchto důvodů je vhodnější ve formulaci použít minimálně 80 % roztok alkoholu [48, s. 223].

### 2.2.1.1 Ethanol

Nedenaturovaný ethanol se používá jako ochucující složka nebo jako rozpouštědlo v oblasti léčiv. V kosmetice se používá speciálně denaturovaný alkohol, skládající se z ethanolu s různými příměsemi. Konkrétní příměsí závisí na typu výrobku. Ethanol je přítomen ve vysokých koncentracích v některých produktech osobní hygieny, jako jsou například laky na vlasy, ústní vody, parfémy, kolínské vody a vody po holení [49, s. 127].

Ethanol je známé antimikrobiální činidlo, které bylo poprvé doporučeno pro ošetření pokožky rukou v roce 1888. Má silnou okamžitou baktericidní účinnost, která je pozorována již u 30% roztoku a se zvyšující se jeho koncentrací se účinnost zvyšuje. Účinnost proti *S. aureus*, *E. faecium* nebo *P. aeruginosa* je vyšší při použití 80% roztoku ethanolu než při použití 95% roztoku. Dále je také účinný proti různým druhům mykobakterií, houbám včetně kvasinek a dermatofytům. Spektrum virucidní aktivity je do značné míry závislé

na koncentraci ethanolu, protože vyšší koncentrace ethanolu mají lepší účinnost. Nevýhodou ethanolu je jeho nedostatečná aktivita vůči sporám bakterií. Ethanol je méně cytotoxický a méně dráždivý než propanol nebo izopropylalkohol [50, s. 875-879].

### **2.2.1.2 Benzylalkohol**

Benzylalkohol je klasifikován jako antimikrobní konzervační činidlo. Je bakteriostatický a mírně účinný proti  $G^+$  bakteriím, plísním, houbám a kvasinkám. Používá se jako solubilizující činidlo ve vodných nebo olejových přípravcích. Ve vyšších koncentracích se používá jako lokální anestetikum a dezinfekční přípravek. Různé kosmetické přípravky mohou obsahovat benzylalkohol jako konzervant, vonnou složkou nebo rozpouštědlo [49, s. 47].

### **2.2.1.3 Izopropylalkohol**

Izopropylalkohol je druhou nejčastěji používanou látkou v dezinfekčních gelech. Baktericidní aktivita je již při 30% koncentraci roztoku a se zvyšující se koncentrací se účinnost navyšuje [50, s. 875-879].

Izopropylalkohol o koncentraci 60 až 70 % má poměrně malou účinnost proti rezidentní kožní flóře, účinnost se ale zvyšuje s prodlužující se dobou aplikace (3 až 5 minut) a vyšší koncentrací izopropylalkoholu (80 až 90 %). I přes tato zjištění má 60% roztok izopropylalkoholu lepší baktericidní účinek na rezidentní kožní flóru než dezinfekční mýdla na bázi chlorhexidinu nebo triclosanu. Také se osvědčil izopropylalkohol (60 až 70 %) k odstranění aerobních  $G^-$  bakterií z pokožky rukou v porovnání s běžným mytím mýdlem. Izopropylalkohol samotný však nemá účinnost proti sporám [50, s. 875-879].

## **2.2.2 Hydroxy kyseliny**

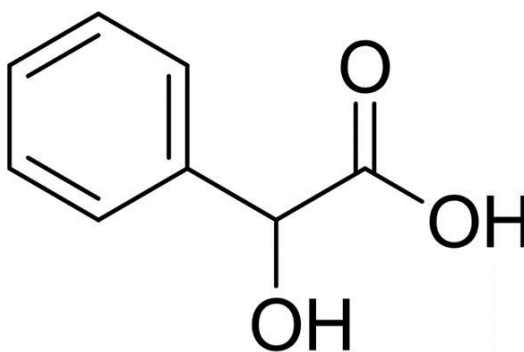
Hydroxy kyseliny patří mezi často využívané kosmetické ingredience. Dělí se na  $\alpha$ -hydroxy kyseliny,  $\beta$ -hydroxy kyseliny a poly-hydroxy kyseliny. V kosmetice se používají především  $\alpha$ -hydroxy kyseliny (AHA) [51, s. 16].

Hydroxy kyseliny a to konkrétně AHA, jsou třídou chemických sloučenin, které se skládají z karboxylové kyseliny s hydroxylovou skupinou na sousedícím uhlíku. Mohou být přírodního nebo syntetického původu. Obecně patří mezi slabé kyseliny, které ve vodných roztocích nejsou schopny zcela disociovat, proto se jejich síla odvozuje od jejich disociační konstanty  $K_a$ , která nabývá velmi nízkých hodnot [52, s. 9].

Jsou součástí výrobků redukující vrásky nebo příznaky stárnutí a celkově zlepšují vzhled kůže. Také se hojně využívají v chemických peelingových přípravcích. Mezi nejčastější AHA se řadí kyselina glykolová, kyselina mléčná, kyselina citronová a kyselina mandlová [52, s. 9].

### 2.2.2.1 Kyselina mandlová

Kyselina mandlová neboli kyselina fenylglykolová (Obr. 4.), řadí se mezi aromatické  $\alpha$ -hydroxy kyseliny, je bílá krystalická látka, rozpustná ve vodě a většině organických rozpouštědel. Především v lékařství se využívá jako antibakteriální látka, vhodná k léčení infekcí močových cest nebo jako orální antibiotikum [52, s. 11].



Obr. 4. Obecný vzorec kyseliny mandlové [53]

### 2.2.3 Esenciální oleje

Esenciální oleje nebo tzv. éterické oleje jsou těkavé, přírodní, komplexní sloučeniny, vyznačující se silnou vůní. Obvykle se získávají destilací s vodní parou. Především jsou známy pro své baktericidní, virucidní, fungicidní a léčivé vlastnosti. Pro své vlastnosti se využívají v kosmetice, k uchovávání potravin, dále pak jako antimikrobní, analgetické, sedativní, protizánětlivé a uklidňující přípravky [54, s. 447].

Esenciální oleje se získávají z různých aromatických rostlin, obvykle lokalizovaných v mírných až teplých oblastech, především ve Středomoří a tropických zemích, kde představují důležitou součást tradičního lékařství [54, s. 447].

Jsou kapalné, rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech, s obecně nižší hustotou než voda. Většinou mají čirou barvu, zvláště v čerstvém stavu, uchováváním snadno oxidují, zvyšují hustotu a tmavnou. Výjimku tvoří např. silice hřebíčkové, které mají žlutohnědé zbarvení nebo silice obsahující azulen zbarvené modrozeleně. Mohou být syntetizovány



ve všech rostlinných orgánech, a to konkrétně v pupenech, květech, listech, stoncích, větších, semenech, plodech, kořenech, dřevě nebo kůře. Extrakce produktů se může měnit co do kvality, množství a složení podle klimatu, složení půdy, rostlinného orgánu, stáří a vegetativní fáze růstu [54, s. 447], [55, s. 2]

Esenciální oleje jsou z velké části používány pro své vlastnosti, které byly pozorovány již v přírodě, a to pro jejich antibakteriální, antimykotické a účinky proti hmyzím škůdcům. V současnosti je známo zhruba 3000 éterických olejů, z nichž přibližně 300 je komerčně důležitých pro farmaceutický, zemědělský, potravinářský, zdravotnický, kosmetický a parfémový průmysl. Esenciální oleje nebo některé z jejich složek jsou používány v parfémtech a make-upových produktech, hygienických potřebách, v zubním lékařství a zemědělství nebo jako potravinářské konzervanty [54, s. 447].

Co se týče látek obsažených v esenciálních olejích, nejširší uplatnění mají například d-limonen, geranylacetát nebo d-karvon v parfémtech, krémech, mýdlech, v čistících přípravcích jako vonné látky, dále také v potravinářství jako ochucující složky. Éterické oleje je možné v kombinaci s rostlinnými oleji použít k masážím, koupelím nebo v aromaterapii [54, s. 447].

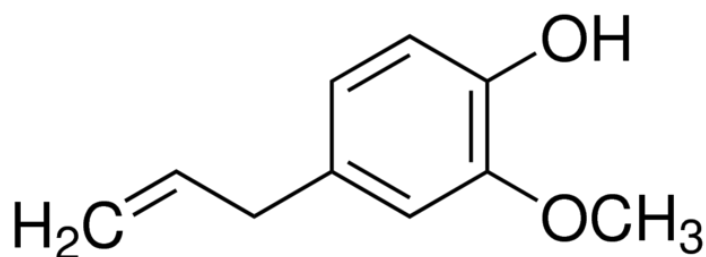
### **2.2.3.1 Chemické složení esenciálních olejů**

Chemické složení esenciálních olejů je velmi pestré a skládá se z velkého počtu chemických sloučenin. Bylo identifikováno více než 500 různých látek v esenciálních olejích, kdy jedna silice jich může obsahovat 50 a více. Hlavními složkami silic jsou mono- a seskviterpeny včetně sacharidů, alkoholů, éterů, aldehydů a ketonů se podílejí na vonných a biologických vlastnostech aromatických a léčivých rostlin. Zastoupení a množství jednotlivých látek v silicích je závislé na mnoha faktorech, především závisí na druhu a části rostliny, ze které se získávají, dále složení ovlivňují vnější faktory, mezi které patří doba sklizně, klimatické podmínky a mnoho dalších vlivů [55, s. 2], [56, s. 130].

#### **Hřebíčkový olej**

Hlavní sloučeniny hřebíčkového oleje jsou fenyylpropanoidy, a to konkrétně eugenol zastoupený ze 76,8 %,  $\beta$ -karyofylen (17,4 %),  $\alpha$ -humulen (2,1 %) a eugenol-acetát (1,2 %). Nejvíce zastoupený eugenol neboli 4-allyl-2-methoxyfenol (Obr. 5.), který je znám jako dobrý antioxidant, inhibitor monoaminoxidázy (MAO) a také pro své neuroprotektivní

účinky. Má vynikající baktericidní účinnost proti širokému spektru mikroorganismů (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *L. monocytogenes*). Eugenol narušuje cytoplazmatické membrány bakterií, což způsobuje jejich propustnost, kromě toho má hydrofobní charakter, který umožňuje proniknout přes lipopolysacharidy  $G^-$  bakterií a narušit tím buněčnou strukturu s následným únikem intracelulárního obsahu [57, s. 108], [58, s. 908-909].

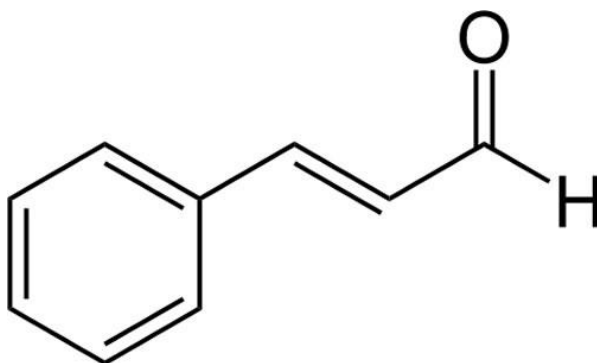


Obr. 5. Strukturální vzorec eugenolu [59]

### Skořicový olej

Skořicový esenciální olej je složen z hlavních sloučenin, mezi které patří cinnamaldehyd (68,95 %), benzaldehyd (9,94 %), cinnamyl acetát (7,44 %), limonen (4,42 %) a eugenol (2,77 %). Skořicová silice vykazuje silnou antimikrobní aktivitu proti grampozitivním bakteriím, a to zejména proti rodům *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*, dále pak proti gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním [60, s. 3276].

Hlavní složkou tohoto esenciálního oleje je cinnamaldehyd (strukturální vzorec je uveden na Obr. 6.), který je vysoce účinný proti některým druhům  $G^+$  a  $G^-$  bakterií, včetně rodu *Clostridium*, *Pseudomonas* a kvasinkám rodu *Candida*. Trans-cinnamaldehyd jako oxidovaná součást skořicového oleje má prokazatelně nejsilnější antifungální aktivitu ve srovnání s ostatními složkami oleje. Také bylo prokázáno, že cinnamaldehyd a eugenol inhibují produkci základních enzymů bakterií a poškozují jejich buněčné stěny [60, s. 3276].

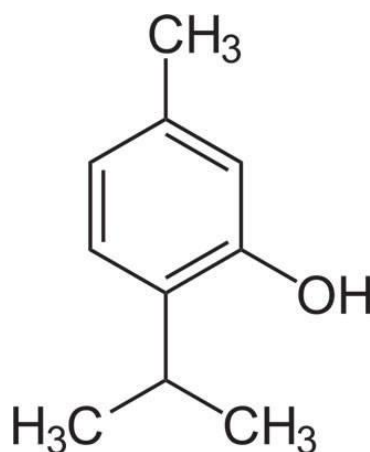


Obr. 6. Strukturální vzorec cinnamaldehydu [61]

### Tymiánový olej

Tymiánový esenciální olej obsahuje bioaktivní monoterpeny thymol, karvakrol a linalool, které společně s p-cymenem,  $\gamma$ -terpinenem, borneolem a  $\alpha$ -terpinenem patří mezi antimikrobní látky. Díky těmto látkám se řadí mezi nejvýznamnější antimikrobní činidlo, účinné i proti patogenním mikroorganismům s hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) 0,062 až 0,500 mg·ml<sup>-1</sup> [62, s. 2897].

Monoterpenické fenoly obsažené v tymiánovém oleji jako thymol (Obr. 7.) a karvakrol vykazují nejvyšší antimikrobní účinnost, linalool slabší a p-cymen, borneol,  $\alpha$ -terpinen a  $\gamma$ -terpinen vykazují nejnižší antimikrobní aktivitu. Bylo prokázáno, že kombinace monoterpenů se slabší a silnější antimikrobní aktivitou, jako např. thymol s cymenem má synergický efekt a umocňuje účinek proti mikroorganismům [62, s. 2897].



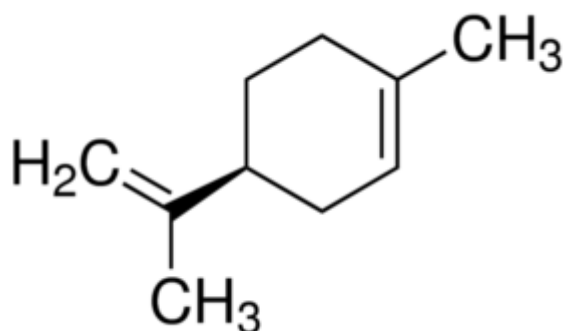
Obr. 7. Strukturní vzorec thymolu [63]

Způsob působení hlavní složky tymiánového oleje, thymolu, je založen na propustnosti membrán, obdobně je tomu u karvakrolu. Obě látky narušují enzymy buněčné stěny, v důsledku čehož se rozpadají vnější membrány bakterií, uvolňují se lipopolysacharidy a zvyšuje se propustnost cytoplazmatické membrány [64, s. 1016].

Studie s *B. cereus* ukázaly, že karvakrol interaguje s buněčnou membránou, kde se rozpouští ve fosfolipidové dvojvrstvě a předpokládá se, že se připojuje mezi řetězce mastných kyselin. Biologický prekurzor karvakrol p-cymen je hydrofobní a způsobuje botnění cytoplazmatické membrány do větší míry než karvakrol [64, s. 1016].

### Citronový olej

Hlavní těkavou sloučeninou citronového oleje je limonen (Obr. 8.), jehož obsah se pohybuje mezi 60 až 71 %, dále jsou obsaženy další monoterpenické uhlovodíky jako  $\beta$ -pinen (10-18 %),  $\gamma$ -terpinen (7-11 %),  $\alpha$ -pinen, sabinen a myrcen tvoří kolem 1 % těkavé frakce oleje. Aldehydy, zejména nerol a citral, jsou nejvíce reprezentovanou třídou kyslíkatých sloučenin, která v průměru obsahuje 2 až 7 % [65, 146-152].



Obr. 8. Strukturální vzorec limonenu [66]

Změny v těkavé frakci citronového oleje jsou pevně spjaty se sezónní sklizní, kdy v létě je nejvíce přítomno aldehydů, jako je citronellal, nonanal a alkenal a také navýšení monoterpenických uhlovodíků  $\beta$ -pinenu a sabinenu, zatímco množství limonenu se výrazně snižuje [65, s. 146-152].

#### 2.2.4 Vliv esenciálních olejů na mikroorganismy

Mechanismus účinku esenciálních olejů proti mikroorganismům není dosud plně objasněn, je však všeobecně známo, že antimikrobní působení olejů závisí na jejich hydrofilním nebo lipofilním charakteru. Terpenoidy jako látky lipofilního charakteru mohou ovlivňovat činnost membránových enzymů a ovlivňovat tím dýchací řetězec. Některé složky silic mohou působit jako přerušovače, interferující s protonovou translokací přes membránové váciky a zastavovat primární energetický metabolismus. Specifické terpenoidy s fenolickoalkoholickými nebo aldehydickými funkčními skupinami interagují s membránami nebo spojují enzymové proteiny, čímž dochází k zastavení jejich produkce nebo aktivity [67, s. 818].

Obecně, způsob účinku antimikrobních činidel závisí na typu mikroorganismu a souvisí především se strukturou buněčné stěny a uspořádáním vnější membrány. Gram-negativní

bakterie, např. *Pseudomonas aeruginosa* disponuje vysokou odolností proti široké škále esenciálních olejů, a to díky hydrofilnímu povrchu vnější membrány bohaté na lipopolysacharidy. Nicméně hydrofobní makromolekuly, jako jsou složky éterických olejů, mají schopnost proniknout membránami. Dá se říci, že účinnost antibakteriálních činidel se obecně zvyšuje s lipofilními vlastnostmi, v důsledku působení na cytoplazmatické membrány. Některé složky silice fenolické povahy, mezi které patří karvakrol a thymol působí na lipopolysacharidy vnější vrstvy a tím dochází k částečnému rozkladu vnější membrány [67, s. 818].

Některé éterické oleje, např. tea tree olej používaný proti *E. coli*, působí jako dobrý dezinfekční přípravek způsobující denaturaci membránových proteinů, která vede k narušení vnější membrány, následnému úniku draselných iontů, zastavení respirace a konečné lýzy buněk [67, s. 818].

Účinnost proti gram-pozitivním bakteriím a plísním je podobného typu jako u přechodných gram-negativních bakterií. Složky esenciálních olejů ničí bakteriální buněčné stěny a cytoplazmatické membrány s následným únikem cytoplazmy a její koagulaci. Nízké koncentrace seskviterpenů snižují růst *Staphylococcus aureus*, pravděpodobně v důsledku interakce s primárním energetickým metabolismem. Dále může u hub a bakterií působením éterických olejů docházet k inhibici syntézy DNA, RNA, proteinů a polysacharidů. U hub vyvolávají esenciální oleje podobné změny jako účinkem antibiotik [67, s. 818].

V Tab. 1. jsou uvedeny hlavní účinné látky esenciálních olejů a hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) převzaté z různých experimentů [56, s. 135].

Tab. 1a. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace rostlinných esenciálních olejů a jejich hlavní účinné látky [56, s. 135]

Rostlina	Účinná látka	Mikroorganismus	MIC [ppm]
Nové koření	eugenol	houby, kvasinky	200
Bazalka	linalool, methylchavikol	houby, kvasinky, bakterie	>1250
Bobkový list	eugenol, linalool, 1,8-cineol	bakterie	400 – 5000
Skořice	skořicový aldehyd, eugenol	kvasinky, bakterie	200 – 750

Tab. 1b. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace rostlinných olejů a jejich hlavní účinné látky [56, s. 135]

Rostlina	Účinná látka	Mikroorganismus	MIC [ppm]
Hřebíček	eugenol	houby, kvasinky, bakterie	250 – 1000
Česnek	allicin	houby, kvasinky, bakterie	200 – 1000
Citronová tráva	citral, limonen	houby, bakterie	1000, 5000
Hořčice	allylthiokyanát	houby, kvasinky, bakterie	0,034 – 600
Oregano	thymol, karvakrol	houby, bakterie	100 – 1000
Rozmarýn	linalool, kafr, 1,8-cineol	bakterie	>1000
Šalvěj	thujon, 1,8-cineol	G <sup>-</sup> bakterie	750 – 3750
Tymián	thymol, karvakrol, cymen	houby, kvasinky, bakterie	200 – 1000

### 2.2.5 Změny nastávající u esenciálních olejů

Esenciální oleje vzhledem ke svému pestrému chemickému složení mění vlivem stárnutí své vlastnosti. V průběhu času tmavnou, houstnou a také dochází ke změnám vůně. Vlivem chemických nebo enzymatických změn dochází u éterických olejů k autooxidaci, polymeraci nebo hydrolyze esterů. Chemické změny mohou být podpořeny teplotou, vyšší vlhkostí, vzdušným kyslíkem nebo vlivem záření [55, s. 3], [68, s. 41-42].

Terpenoidy mají tendenci být nestálé a termolabilní, snadno podléhají oxidaci nebo hydrolyze v závislosti na chemické struktuře. Například u citrusového esenciálního oleje dochází k nejrychlejší změně silic, jelikož obsahují vysoké množství nenasycených terpenických uhlovodíků, které snadno oxidují a přenášejí kyslík na další složky silice a spouštějí celé řetězové reakce. Takové změny mají zásadní vliv na vůni silic, kdy původní vůně, např. citrusové silice nabývá terpentýnového zápachu. Kromě organoleptických změn, některé esenciální oleje, stejně jako oxidované terpenoidy, způsobují senzibilizaci pokožky, vedoucí až ke vzniku kontaktních alergických dermatitid [55, s. 3], [68, s. 41-42].

Hydroperoxydy vzniklé oxidací terpenoidů se rozkládají v přítomnosti světla, tepla nebo při zvyšující se kyselosti. Také bylo zjištěno, že peroxidové produkty vzniklé oxidací monoterpenů degradují i při pokojové teplotě [68, s. 41-42].

Éterické oleje bergamotový a levandulový obsahují vysoké množství esterů, které vlivem uchovávání částečně zmýdelňují, v důsledku přibývajícího obsahu kyselin. Také se často mění silice obsahující aldehydy a fenoly, na rozdíl od silic obsahujících jako hlavní složku alkoholy, které jsou poměrně stálé [55, s. 3].

### 2.2.6 Faktory ovlivňující stabilitu esenciálních olejů

Degradace esenciálních olejů je závislá na mnoha chemických i přírodních faktorech, které se podílejí na schopnosti oxidace a také na celkovém průběhu reakcí v silicích, proto vnější faktory, mezi které patří teplota, světlo a dostupnost atmosférického kyslíku by se měly zohlednit při manipulaci a uchovávání esenciálních olejů. Také celkové složení nebo zastoupení jednotlivých složek éterických olejů, případná přítomnost nečistot může ovlivnit jejich stabilitu [68, s. 43-45].

#### 2.2.6.1 Teplota

Okolní teplota zásadně ovlivňuje základní stabilitu olejů, a to v několika ohledech. Obecně platí, že chemické reakce jsou urychlovány rostoucí teplotou v důsledku závislosti teploty na reakční rychlosti vyjádřené podle Arrheniovy rovnice. Na základě toho, zákon van't Hoff říká, že zvýšení teploty o 10 °C přibližně zdvojnásobí rychlost chemické reakce, což může předpovídat stabilitu při různých teplotách. Z tohoto důvodu autooxidace urychluje rozklad hydroperoxidů se zvyšující se teplotou, také může teplota přispět k počáteční tvorbě volných radikálů [68, s. 43-45].

Stabilita těkavých extraktů rostlin a esenciálních olejů klesá s prodlužující se dobou skladování a zvyšující se teplotou. Při zvýšení teploty dochází ke změnám v éterických olejích, např. z kardamomu, hřebíčku, levandule, borovice a rozmarýnu, a to konkrétně snižováním množství terpenických uhlovodíků  $\beta$ -karyofylenu,  $\beta$ -myrcenu,  $\beta$ -pinenu, sabinenu nebo  $\gamma$ -terpinenu a ke vzrůstu p-cymenu [68, s. 43-45].

Terpenoidy, konkrétně terpeny a aldehydy, jsou obecně známé při zvýšené teplotě svojí termolabilitou a náchylností k přesmykovým reakcím. Bylo prokázáno, že při dvoutýden-

ním skladování citronového esenciálního oleje pod inertním plynem při 50 °C došlo k chemickým změnám, především ke ztrátě nerolu a terpenických uhlovodíků a ke zvýšení p-cymenu. Naproti tomu jiné studie prováděné při laboratorní teplotě zjistily, že citronový i fenyklový olej při skladování v atmosféře dusíku jsou poměrně stabilní [68, s. 43-45].

### 2.2.6.2 *Záření*

Ultrafialové a viditelné záření jsou považovány za urychlovače autooxidačních procesů, vedoucích k tvorbě alkylových skupin. Změny ve složení esenciálních olejů obecně nastávají mnohem rychleji na světle než ve tmě. Zejména monoterpeny se vlivem světelného záření rychle rozkládají. U různých druhů éterických olejů se může reakce na světlo projevit jiným způsobem, např. tymiánový esenciální olej světlo vůbec neovlivňuje, na rozdíl od rozmarýnového, který je velmi citlivý na denní světlo a dochází u něj ke změnám chemického složení [68, s. 43-45].

### 2.2.6.3 *Přístup kyslíku*

Jelikož oxidační reakce jsou jednou z hlavních příčin kažení esenciálních olejů, je zřejmé, že přístup kyslíku hraje rozhodující roli v základní stabilitě esenciálních olejů. Spotřeba kyslíku při skladování různých monoterpenů byla zaznamenána změnou ve složení a také fyzikálně-chemické vlastnosti silic byly výrazně změněny v případech, kdy byly oleje uchovávány v nádobách, které byly naplněny jen z poloviny oproti plně naplněným [68, s. 43-45].

Oxidací oleje se zvyšuje koncentrace rozpuštěného kyslíku, která do značné míry závisí na parciálním tlaku kyslíku a okolní teplotě. Podle Henryho zákona je kyslík vysoce rozpustný při nízkých teplotách a jeho rozpustnost klesá se zvyšující se teplotou. Proto peroxidové radikály a hydroperoxy jsou četnými sloučeninami vznikajícími při oxidaci jedlých olejů při nízkých teplotách. Studiemi bylo prokázáno, že složení různých éterických olejů je různě náchylné k oxidaci, a proto u některých, jako např. u levandulového a tymiánového došlo k navýšení obsahu peroxidů při skladovací teplotě 5 °C, zatímco u rozmarýnového a borovicového k navýšení došlo i při teplotě laboratorní [68, s. 43-45].

Ideální uchovávání esenciálních olejů je pod inertním plynem (argon), aby se zabránilo tvorbě peroxidů, jelikož konkrétní silice a teplota okolního prostředí oxidaci nemusí ovlivňovat [68, s. 43-45].



### 3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provést literární rešerši na téma vliv teploty na stabilitu antimikrobní účinnosti kosmetických gelů. To znamenalo, zaměřit se různé druhy gelotvorných látek, jejich vlastnosti, zejména na jejich změny při různých teplotách skladování. Dále bylo nutné se věnovat přehledu antimikrobních látek, které se v kosmetických přípravcích využívají.

Praktická část práce je věnována především stabilitě připravených gelů, a to konkrétně sledování změn v jejich struktuře, na základě měření jejich viskozity a dále jejich antimikrobní účinnosti v různých teplotních režimech.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie a zařízení

Destilovaná voda

Carbomer, Polygel CA, Miča a Harašta, s.r.o., Česká republika

Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Kyselina mandlová 99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Tymiánový olej, Nobilis Tilia, Česká republika

Skořicový olej, Nobilis Tilia, Česká republika

Citronový olej, Nobilis Tilia, Česká republika

Hřebíčkový olej, Nobilis Tilia, Česká republika

Pufr ftalátový, pH 4

Pufr fosfátový, pH 7

Ethanol 98%

Chlorid sodný, LACH-NER s.r.o., Česká republika

Chloramin, BOCHEMIE, Česká republika

Savo, Unilever Slovensko, spol. s r. o.

Běžné laboratorní sklo

Běžné laboratorní plasty

Plastové hokejky sterilní

Mikrotitrační destičky sterilní

Plastové Petriho misky (Ø 9 mm) sterilní

Digitální váhy KERN 440-45N, KERN & SOHN GmbH, Německo

Digitální váhy EW 420-3NM, KERN & SOHN GmbH, Německo

Míchadlo magnetické MM4, LAVAT, Česká republika

Vpichový pH-metr WaterProof, pH Spear, USA

Rotační viskozimetr MYR V2-L, Viscotech Hispanie, Španělsko

Software Viscosoftplus

Mikropipety Discovery comfort, HTL, Polsko

Mikropipety INTECH, MERCI, Česká republika

Laminární box BIO-II-A, Telstar, Německo

Autokláv WOLF SANOcav, Německo

Autokláv Variklav H+P Labortechnik AG, Německo

Vortex Heidolph REAX top, Německo

Denzilometr Densi-La-Meter, Emo, Německo

Termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha

Inkubátor mikrobiologický, Memmert

Inkubátor model B15, Heraeus

## 4.2 Použité mikroorganismy

Mikroorganismy, které byly v práci použity byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně, konkrétně se jednalo o *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Micrococcus luteus* (CCM 734), *Candida albicans* (CCM 8275) a *Candida parapsilosis* (CCM 8276).

## 4.3 Příprava gelů

Pro přípravu všech gelů byly použity postupy již z dřívějších experimentů (Bochňáková, Modifikace antimikrobní složky kosmetických gelů [69]) a postupy popsané v následujících kapitolách.

### 4.3.1 Příprava gelů s esenciálními oleji

Na přípravu gelů s esenciálními oleji byla použita gelotvorná látka na bázi syntetických pryskyřic, a to konkrétně Carbomer (Polygel CA). Množství použitého Carbomeru bylo vždy 0,1 hm%, které bylo smícháno ve skleněných kádinkách o objemu 250 ml s vypočteným množstvím destilované vody (Tab. 2.). Takto připravený základ se nechal botnat po dobu 24 hodin, při laboratorní teplotě. Po uplynutí 24 hodin bylo přidáno 0,75 g příslušného esenciálního oleje (hřebíčkový, skořicový, tymiánový a citronový), což odpovídalo 0,5 hm%. Vše bylo důkladně promícháno a následně zneutralizováno 0,23 ml 1M roztoku NaOH. Poté bylo vše dokonale zamícháno, aby došlo k promísení všech složek.

Tab. 2. Složení gelu s esenciálním olejem

Složka	Obsah složky [hm%]	Navážka [g]
Carbomer	0,1	0,15
Esenciální olej	0,5	0,75
Destilovaná voda	99,5	149,1

### 4.3.2 Příprava směsných gelů

Směsné gely byly připraveny obdobným způsobem jako gely s esenciálními oleji, navíc byly tyto gely akorát obohaceny přidavkem roztoku kyseliny mandlové. Celé složení je uvedeno v Tab. 3. Carbomer o obsahu 0,5 hm% byl navážen do kádinky (250 ml) a ponechán v klidu 24 hodin botnat s vypočteným množstvím destilované vody. Do nabotnaného Carbomeru bylo dováženo 0,75 g odpovídajícího esenciálního oleje (0,5 hm%) a vše důkladně promícháno. Následně byl přidán 10% vodný roztok kyseliny mandlové v množství 3 hm% ke gelům s hřebíčkovým, skořicovým a tymiánovým esenciálním olejem. Ke gelu s citronovým esenciálním olejem byl přidán 15% roztok kyseliny mandlové také v množství 3 hm% z celkové receptury.

Před přidavkem kyseliny mandlové musela být tato nejprve zneutralizována 1M roztokem NaOH na výsledné pH okolo 3,5. Po přidavku kyseliny mandlové byly všechny složky znovu důkladně promíchány a následně byla provedena neutralizace celého gelu 1M roztokem NaOH na výslednou hodnotu pH, která se pohybovala mezi 5,5 až 6.

Tab. 3. Složení směsného gelu

Typ esenciálního oleje	Obsah Carbomeru [hm%]	Navážka Carbomeru [hm%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]	Navážka roztoku kyseliny mandlové [g]
Hřebíček	0,5	0,75	10	1,5
Skořice	0,5	0,75	10	1,5
Tymián	0,5	0,75	10	1,5
Citron	0,5	0,75	15	1,5

Pozn. Obsah roztoku kyseliny mandlové činil 3 hm%

## 4.4 Testování stability gelů

U vyrobených gelů byla testována stabilita na základě příručky Guidelines on stability testing of cosmetic products [70], kterou vypracovala asociace Colipa, nyní již známá jako Cosmetic Europe - The Personal Care Association ve spolupráci s CTFA (Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association), podle které by se měla volit teplota a doba testování v závislosti na druhu výrobku a potřebách výrobce. Obvykle se testování provádí při teplotách 37 °C, 40 °C nebo 45 °C po dobu 1, 2, 3 a více měsíců.

### 4.4.1 Skladování gelů a intenzita měření

U vzorků gelů vystavených různým teplotním režimům, a to laboratorní teplotě, 37 a 50 °C, bylo měřeno pH, viskozita a dále jejich antimikrobní účinnost. Také byla v průběhu času a v jednotlivých teplotních režimech sledována změna barvy a vůně gelů. Celé testování probíhalo po dobu 56 dní. Měření pH, viskozity a antimikrobní testování bylo nejprve prováděno nultý den, kdy byly gely připraveny a následně byly tyto gely skladovány v jednotlivých teplotních režimech. V případě měření pH a viskozity byly vzorky proměřovány každý den, po dobu 7 dní a následně byla četnost měření snížena na každý sedmý den a před závěrečným měřením byl rozestup 14 dní. Testování antimikrobní účinnosti probíhalo obdobně, až na to, že další testování po přípravě gelů bylo až po 7 dnech, oproti měření pH a viskozity, které se prvních 7 dní měřilo intenzivně každý den.

### 4.4.2 Měření pH

K měření pH u vyrobených gelů byl využit vpichový pH-metr s přesností měření  $\pm 0,1$  pH. Sondu pH-metru bylo třeba před každým měřením nakalibrovat na příslušné pufrы s hodnotami pH 4 a 7. Po kalibraci přístroje byla sonda vložena do gelu a po ustálení hodnoty na displeji přístroje hodnota pH gelu zaznamenána.

#### 4.4.3 Měření viskozity

Viskozita byla měřena pomocí rotačního viskozimetru Viscotech MYR V2-L, za použití speciálních spindlů určených pro měření viskozity gelů. Viskozimetr byl připojen k počítači s nainstalovaným softwarem Wiscosoft Plus, ve kterém se daly nastavit potřebné parametry pro měření, konkrétně typ spindlu, rychlost a počet otáček, dále pak doba měření a počet hodnot, které přístroj zaznamenával. Měření viskozity gelů je určeno normou ISO 2555 a příslušných ASTM norem [71], které specifikují parametry přístroje (torzi, tvar spindlů a rychlost otáček). Měření bylo provedeno podle metody dle Brookfielda.

Vlastní měření viskozity bylo prováděno tak, že do vzorku gelu ve 150ml plastových nádobách byl ponořen spindl v závislosti na předpokládané viskozitě gelu. Výběr spindlu a počet otáček byl závislý na výsledném točivém momentu, který se pohyboval v rozmezí 10 až 50 %. V případě, kdy přístroj ukazoval hodnoty točivého momentu vyšší než 50 %, bylo třeba upravit počet otáček, zatímco v případě snížení točivého momentu pod 10 %, bylo třeba nahradit typ spindlu za jiný.

Převážná většina vzorků byla měřena spindlem typu PD při 6 rpm (počet otáček). K závěru stabilitního experimentu bylo třeba u některých vzorků gelů vyměnit spindl z důvodu výrazného snížení jejich viskozity, jelikož typ spindlu PD byl určen pro měření více viskózních gelů.

U gelů bylo měřeno vždy 50 hodnot po dobu 60 s, což odpovídalo záznamu hodnot viskozity každé 1,2 sekundy. Každý vzorek byl proměřen třikrát vedle sebe, kdy výsledná hodnota viskozity byla získána výpočtem z průměru 40 hodnot a všech tří měření. Prvních 10 hodnot bylo u každého měření pro výpočet zanedbáno, z důvodu ustálení měření.

#### 4.4.4 Příprava živných médií

Aby bylo možné otestovat antimikrobní účinnost připravených gelů, bylo potřeba připravit živná média, a to v závislosti na testovacích mikroorganismech, které byly při experimentu využity.



#### 4.4.4.1 *Mueller Hinton agar No. 2*

Mueller Hinton agar (viz. Tab. 4) se používá pro testování mikrobiálního růstu mikroorganismů, jedná se o nutričně výživnější půdu než je Nutrient agar, vhodnou pro jamkovou metodu. Půda byla připravena navážením 38 g Mueller Hinton agaru do infuzní lahve a doplněna destilovanou vodou do objemu 1 litru. Dále byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a po následném zchladnutí rozlita do sterilních plastových Petriho misek.

Tab. 4. Složení Mueller Hinton agaru No. 2

Složení půdy	Množství složky [g·l <sup>-1</sup> ]
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5
Hovězí srdeční infuze	2
Škrob, rozpustný	1,5
Agar	17

#### 4.4.4.2 *Chloramphenicol Yeast Glucose Agar*

Pro testování růstu kvasinek byla využita půda Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, která je obohacena o chloramfenikol, který inhibuje růst bakterií. Půda pro testování kvasinek byla připravena do infuzní lahve rozpuštěním 40 g této agarové půdy v 1 litru vody. Dále byla tato směs autoklávována obdobným způsobem jako v předchozím případě a rozlita do sterilních Petriho misek. Přesné složení Chloramphenicol Yeast Glucose Agar je uvedeno v Tab. 5.

Tab. 5. Složení Chloramphenicol Yeast Glucose Agar

Složení půdy	Množství složky [g·l <sup>-1</sup> ]
Kvasniční extrakt	5
Dextrosa	20
Chloramfenikol	0,1
Agar	14,9

#### 4.4.4.3 Nutrient agar

V Tab. 6 je uvedeno složení Nutrient agaru, kterého bylo využito pro kultivaci mikroorganismů *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *M. luteus*, tyto mikroorganismy byly využity i u doplňkové metody. Dále bylo postupováno jako v předchozích dvou případech, s rozdílem v navážce půdy, která v tomto případě činila 28 g.

Tab. 6. Složení Nutrient agaru

Složení půdy	Množství složky [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
Masový pepton	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasniční extrakt	1,5
Chlorid sodný	5
Agar	15

#### 4.4.4.4 Nutrient Broth

Tekutá půda Nutrient Broth byla použita pro kultivaci bakterií, které byly využity jednak u jamkové a jednak u doplňkové metody. Tekutá půda byla připravena rozpuštěním 13 g práškové půdy v 1 l destilované vody v infuzní lahvi. Po řádném promíchání byl bujon rozpipetován po 5 ml do skleněných zkumavek, zkumavky byly uzavřeny a podrobeny sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Složení tekuté půdy je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7. Složení Nutrient Broth

Složení tekuté půdy	Množství složky [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
Masový pepton	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasniční extrakt	1,5
Chlorid sodný	5

#### 4.4.4.5 Malt Extract Broth Base

Pro kultivaci kvasinek (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) byla využita tekutá půda Malt Extract Broth Base (Tab. 8), která byla připravena navážením 20 g půdy a jejím rozpuštěním v 1 l destilované vody a následně rozplněna do skleněných zkumavek (5 ml) a sterilována při 115 °C/10 minut.

Tab. 8. Složení Malt Extract Broth Base

Složení tekuté půdy	Množství složky [g·l <sup>-1</sup> ]
Sladový extrakt	17
Mykologický pepton	3

#### 4.4.5 Příprava pracovních kultur mikroorganismů

Pracovní kultury mikroorganismů byly získány ze zmrazených sbírkových kmenů mikroorganismů, konkrétně se jednalo o bakterie *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* a *M. luteus*, dále pak o kvasinky *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

Nejprve bylo třeba mikroorganismy oživit, a to tak, že z rozmrazených sbírkových kmenů mikroorganismů bylo odebráno vždy po 5 µl inokula do zkumavky s 5 ml tekuté půdy Nutrient Broth pro bakterie a Malt Extract Broth Base pro kvasinky. Následně byla provedena kultivace podle podmínek pro jednotlivé mikroorganismy, kdy *E. coli* a *S. aureus* byly kultivovány 24 hodin při 37 °C, *M. luteus* 48 hodin při 37 °C a *P. aeruginosa* 24 hodin při 30 °C. Kvasinky byly kultivovány 48 hodin při laboratorní teplotě. Po oživení mikroorganismů v tekutých půdách následovalo očkování na pevné agarové plotny křížovým roztěrem sterilní plastovou bakteriologickou kličkou. Pro získání první subkultury bakterií bylo nezbytné, na půdě Nutrient Agar u bakterií a Chloraphenicol Yeast Glucose Agar u kvasinek, provést křížový roztěr s následnou kultivací (viz výše). Z první subkultury bakterií byla tímto způsobem získána druhá subkultura, která sloužila jako pracovní kultura pro testování antimikrobní účinnosti vyrobených gelů. Pracovní kultury byly poté uchovávány v chladničce (4 ± 2 °C) a každé dva týdny přeočkovány na nové agarové plotny.

#### 4.4.6 Jamková difuzní metoda

Pro provedení jamkové difuzní metody bylo nejprve potřebné připravit suspenze mikroorganismů přenesením pracovních kultur mikroorganismů sterilní plastovou bakteriologickou kličkou do zkumavek se sterilním bujonem (5 ml) a inkubovat je (24 hodin *E. coli*, *S. aureus* a *M. luteus* při 37 °C, *P. aeruginosa* při 30 °C - tekutá půda Nutrient Broth, kvasinky tekutá půda Malt Extract Broth Base při laboratorní teplotě). Ze získané suspenze bylo následně napipetováno inokulum mikroorganismů do sterilní plastové zkumavky se 3 ml fyziologického roztoku na hodnotu zákalu 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice.

Z takto připraveného inokula bylo odebráno 100 µl a nanášeno na Petriho misku s Mueller Hinton agar pro bakterie a pro kvasinky na Chloramphenicol Yeast Glucose Agar a rozetřeno sterilní plastovou bakteriologickou hokejkou. Do takto připravených misek bylo vždy sterilním korkovrtem vytvořeno 7 děr o průměru 7 mm. Do jednotlivých otvorů byly napipetovány vytvořené gely tak, aby bylo množství gelu v rovině s povrchem agaru a jeden otvor tvořil kontrolu naplněnou destilovanou vodou.

Inkubace proběhla následujícím způsobem - *E. coli* a *S. aureus* byly kultivovány 24 hodin/37 °C, *M. luteus* 48 hodin/37 °C, *P. aeruginosa* 24 hodin/30 °C a kvasinky 48 hodin při laboratorní teplotě.

#### 4.4.7 Doplnková metoda

Doplnková metoda sloužila k ověření výsledků získaných jamkovou difuzní metodou a zároveň byla provedena u testovaných gelů na začátku a na konci experimentu. Mikroorganismy pro práci byly připraveny stejným způsobem jako v kapitole 4.4.6 na hodnotu McFarlandovy zákalové stupnice rovno 0,5.

Nejprve bylo napipetováno na sterilní mikrotitrační destičku 20 µl testovaného inokula mikroorganismů a následně přidáno 200 µl testovaných gelů, promícháno a necháno inkubovat 1 hodinu při 30 °C.

Po uplynutí jedné hodiny bylo z jednotlivých jamek destičky odebráno po 100 µl suspenze na misky s Nutrient agar pro bakterie a pro kvasinky na Chloramphenicol Yeast Glucose Agar a rozetřeno sterilní plastovou hokejkou. Test byl proveden dvakrát vedle sebe. Petriho misky byly následně kultivovány dnem vzhůru podle teplotních náležitostí jednotlivých mikroorganismů, jako tomu bylo i u výše popsané metody.

## 4.5 Zátěžový test

Zkouška zátěžového testu byla provedena na základě ČSN EN ISO 11930 [72]. Tato norma byla pro naše podmínky poupravena.

Pro zátěžový test byly připraveny nové gely podle receptur uvedených v kapitole 4.3.1 a 4.3.2, navíc byl připraven kontrolní gel bez použití aktivních látek, který byl připraven stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.3.1, kdy byl vynechán přídavek esenciálního oleje a došlo u něj pouze k jeho neutralizaci. Test byl proveden za použití zástupců z řad gram-pozitivních (*S. aureus*) a gram-negativních (*E. coli*) mikroorganismů.

Příprava suspenze mikroorganismů byla obdobná jako v případě kapitoly 4.4.6, s rozdílem v naředění suspenze bakterií na hodnotu 1 McF. Do sterilních plastových zkumavek se špičatým dnem bylo napipetováno 5 ml vzorku gelu a následně přidáno 100  $\mu$ l inokula bakterií, vše bylo následně důkladně promícháno. Do sterilní mikrotitrační destičky bylo následně napipetováno do 5 jamek po 200  $\mu$ l konkrétního zaočkovaného testovaného vzorku gelu, který byl následně do vedlejších jamek naředěn sterilní tekutou půdou Nutrient Broth desítkovým ředěním tak, že z první jamky bylo odebráno 20  $\mu$ l zaočkovaného testovaného vzorku gelu do 180  $\mu$ l bujony, obdobně bylo pokračováno až do ředění  $10^{-3}$ . Dále, jako negativní kontrola byl použit testovaný gel bez zaočkování bakteriemi. Pro kontrolu růstu mikroorganismů byla negativní kontrolou tekutá půda Nutrient agar (200 $\mu$ l) a pozitivní kontrolou tekutá půda zaočkováná příslušným mikroorganizmem v poměru 180  $\mu$ l tekuté půdy ku 20  $\mu$ l testovaného inokula mikroorganismů s hodnotou 1 McF a opět provedeno desítkové ředění až na hodnotu  $10^{-3}$ . Po napipetování všech destiček následovalo proměření optické denzity na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm, která odpovídá exponenciální fázi růstu bakterií. Po proměření na spektrofotometru následovala inkubace mikrotitračních destiček s testovanými gely při 37 °C po dobu 24 hodin. Následující den bylo opět provedeno měření optické denzity.

## 4.6 Ověření mikrobiální čistoty gelů

Mikrobiální čistota vzorků gelů byla ověřena jednoduchým testem, a to tak, že byla připravena tekutá půda Nutrient Broth podle kapitoly 4.4.4.4, která byla rozpipetována do skleněných zkumavek po 5 ml a nechána sterilizovat při 121 °C po dobu 15 minut. Do jednotlivých zkumavek se sterilním bujónem bylo následně napipetováno od každého vzorku gelu po 100 µl a toto necháno inkubovat při 30 °C po dobu 48 hodin a následně vizuálně sledován případný zákal, tzn. růst mikroorganismů.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzhledem k tomu, že se práce zabývá testováním stability připravených gelů, s přidavkem netradičních antimikrobních látek (esenciálních olejů -hřebíčkový, skořicový, tymiánový a citronový a kyseliny mandlové), bylo nezbytné zjistit, jakou si dovedou gely udržet stabilitu, především z hlediska jejich konzistence (viskozity) a dále, jakou antimikrobní účinnost budou mít po delší době skladování v různých teplotních režimech.

### 5.1 Měření pH v průběhu skladování a různých teplotních podmínkách

V průběhu testování stability vyrobených antimikrobních gelů bylo nutné v určitých časových intervalech (0, 1, 2, 3, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 dní) měřit pH gelů a sledovat, zda má teplota a doba skladování vliv na změnu jejich pH. Jak je patrné z Tab. 9., teplota a doba skladování u gelů s přidavkem esenciálního oleje neměla zásadní vliv na pH, přesto však jisté snížení v průběhu skladování nastalo, a to o hodnoty pH 0,06 až 0,26. Také bylo patrné, že vyšší teplota skladování, konkrétně 37 a 50 °C měla větší vliv na pH, jelikož při těchto teplotách došlo k většímu snížení pH, v porovnání s laboratorní teplotou (22±2 °C).

Tab. 9. Hodnoty pH gelů v různých teplotních režimech

Den	Gely s přidavkem EO											
	Hřebíčkový			Skořicový			Tymiánový			Citronový		
	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C
<b>0</b>	5,96			5,89			6,13			6,09		
<b>1</b>	6,95	5,91	5,92	5,90	5,87	5,89	6,10	6,14	6,10	6,09	6,09	6,10
<b>2</b>	6,94	5,91	5,92	5,89	5,87	5,83	6,10	6,12	6,08	6,08	6,09	6,10
<b>3</b>	6,95	5,90	5,90	5,88	5,84	5,79	6,09	6,12	6,08	6,10	6,08	6,09
<b>6</b>	6,92	5,89	5,90	5,86	5,85	5,72	6,07	6,06	6,09	6,08	6,08	6,09
<b>7</b>	5,92	5,87	5,91	5,85	5,79	5,79	6,08	5,97	5,97	6,08	6,08	6,08
<b>14</b>	5,89	5,83	5,89	5,84	5,82	5,79	6,06	5,97	5,98	5,93	6,04	6,00
<b>21</b>	5,88	5,80	5,87	5,85	5,84	5,77	6,04	5,98	5,99	5,93	6,05	5,98
<b>28</b>	5,88	5,79	5,87	5,85	5,83	5,77	6,03	5,96	5,99	5,92	5,98	5,95
<b>35</b>	5,85	5,78	5,81	5,84	5,82	5,76	6,04	5,96	5,89	5,94	5,96	5,94
<b>42</b>	5,86	5,76	5,77	5,84	5,83	5,77	6,05	5,95	5,90	5,92	5,94	5,93
<b>56</b>	5,83	5,75	5,77	5,82	5,83	5,76	6,02	5,93	5,87	5,91	5,93	5,93



V případě směsných gelů, které byly navíc obohacené kyselinou mandlovou, neměla teplota a doba skladování téměř žádný vliv na změnu pH, což je patrné z Tab. 10. Ke snížení pH u těchto gelů došlo v rozmezí hodnot pH 0,02 až 0,11, toto snížení bylo mnohem nižší v porovnání s gely s přidavkem esenciálních olejů, u kterých došlo ke snížení mnohem většímu.

Tab. 10. Hodnoty pH gelů v různých teplotních režimech

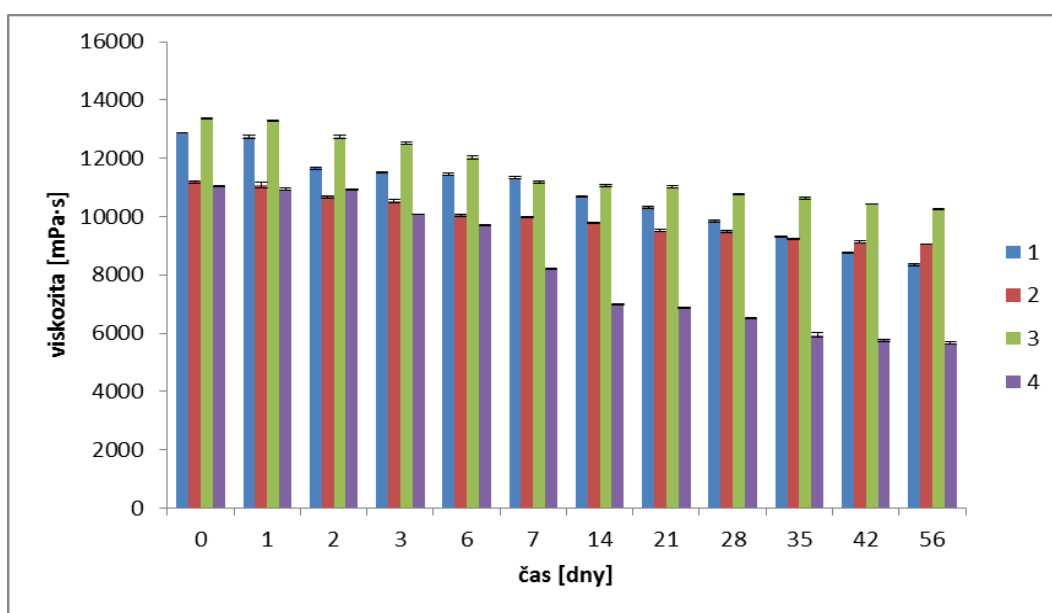
Den	Směsné gely s přidavkem EO											
	Hřebíčkový			Skořicový			Tymiánový			Citronový		
	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C	22±2 °C	37 °C	50 °C
<b>0</b>	5,61			5,69			5,69			6,19		
<b>1</b>	5,61	5,61	5,61	5,69	5,70	5,70	5,70	5,69	5,68	6,20	6,19	6,19
<b>2</b>	5,61	5,60	5,62	5,69	5,68	5,68	5,69	5,68	5,66	6,20	6,19	6,18
<b>3</b>	5,62	5,60	5,61	5,68	5,69	5,67	5,69	5,68	5,67	6,21	6,20	6,19
<b>6</b>	5,60	5,61	5,62	5,68	5,69	5,67	5,68	5,69	5,67	6,21	6,20	6,19
<b>7</b>	5,60	5,61	5,62	5,69	5,68	5,69	5,69	5,69	5,68	6,21	6,20	6,19
<b>14</b>	5,58	5,60	5,62	5,68	5,68	5,68	5,69	5,70	5,68	6,19	6,20	6,19
<b>21</b>	5,59	5,60	5,61	5,67	5,67	5,65	5,67	5,69	5,67	6,17	6,12	6,11
<b>28</b>	5,60	5,57	5,58	5,67	5,68	5,63	5,66	5,67	5,65	6,15	6,11	6,10
<b>35</b>	5,59	5,57	5,56	5,68	5,66	5,63	5,66	5,65	5,64	6,16	6,11	6,10
<b>42</b>	5,58	5,54	5,56	5,67	5,66	5,64	5,67	5,65	5,62	6,14	6,10	6,10
<b>56</b>	5,57	5,54	5,56	5,66	5,63	5,60	5,67	5,66	5,64	6,14	6,10	6,08

Je tedy možné říci, že přídavek roztoku kyseliny mandlové by mohl mít potenciálně příznivý vliv na stabilitu pH gelů nebo by to mohlo být způsobeno v důsledku vyššího obsahu Carbomeru v systému než tomu bylo u gelů s esenciálními oleji.

## 5.2 Vliv teploty na viskozitu antimikrobních gelů

Jak již bylo řečeno výše, hlavním cílem práce bylo zjistit, jaký má vliv teplota na stabilitu gelů, a to především z hlediska jejich viskozity.

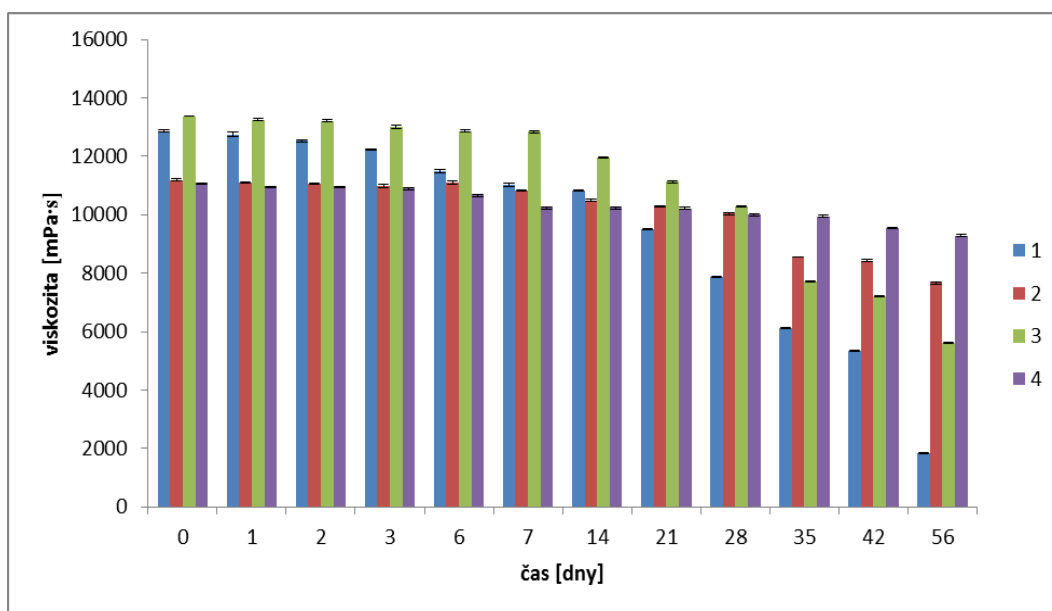
Při skladování gelů s esenciálními oleji při laboratorní teplotě ( Obr. 9.), což odpovídalo teplotě přibližně  $22\pm 2$  °C nastalo první výrazné snížení viskozity 7. den skladování, a to především u gelu s přídavkem citronového esenciálního oleje, v dalších dnech skladování již tak markantní snížení u měřených vzorků tohoto gelu nenastalo. U ostatních gelů bylo snížení viskozity postupné a nebylo tak výrazné jako v případě gelů s citronovým esenciálním olejem.



Obr. 9. Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) při  $22\pm 2$  °C

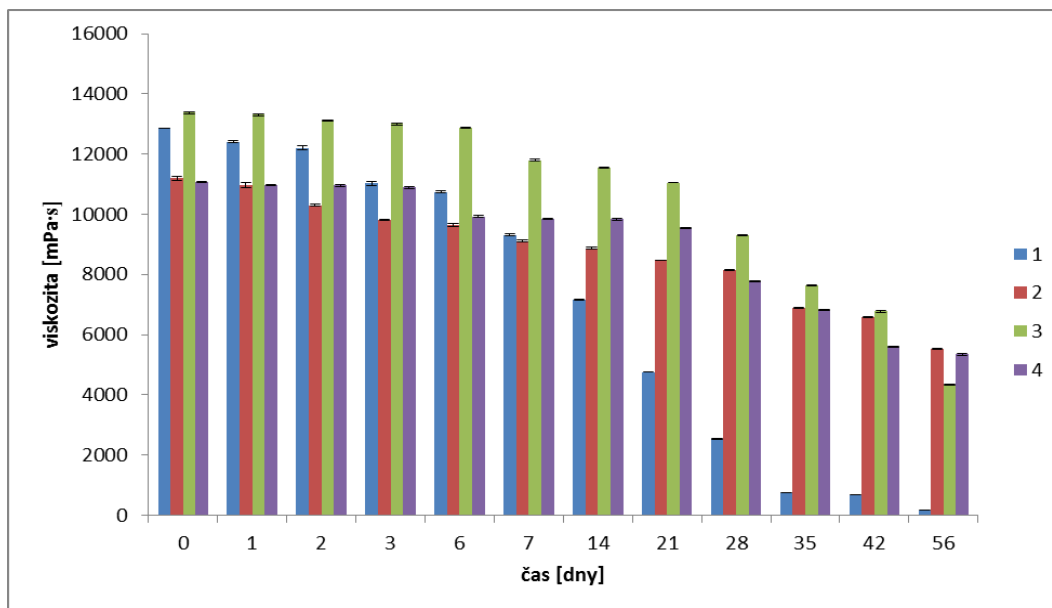
Při skladování vzorků gelů při 37 °C ( Obr. 10.), bylo zřejmé, že prvních 7 dní nedocházelo k výrazným nebo až na výjimky (gel s hřebíčkovým olejem) žádným změnám viskozity, a to až od 14. dne, kdy došlo k výraznějšímu snížení viskozit u všech testovaných vzorků gelů, konkrétně na gel s přídavkem hřebíčkového esenciálního oleje měla tato tep-

lota největší vliv a naopak na gel s přidavkem citronového esenciálního oleje měla vliv nejnižší.



Obr. 10. Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) při 37 °C

Teplota 50 °C měla na vzorky gelů s esenciálními oleji největší negativní vliv. Od sedmého dne totiž docházelo ke snižování viskozity, které lze názorně vidět na Obr. 11. Na konci testování došlo k výrazným změnám ve viskozitě všech testovaných gelů oproti původním hodnotám. Zásadní vliv měla teplota především na gel s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje, u něhož jeho gelovitá strukturní síť téměř zanikla.

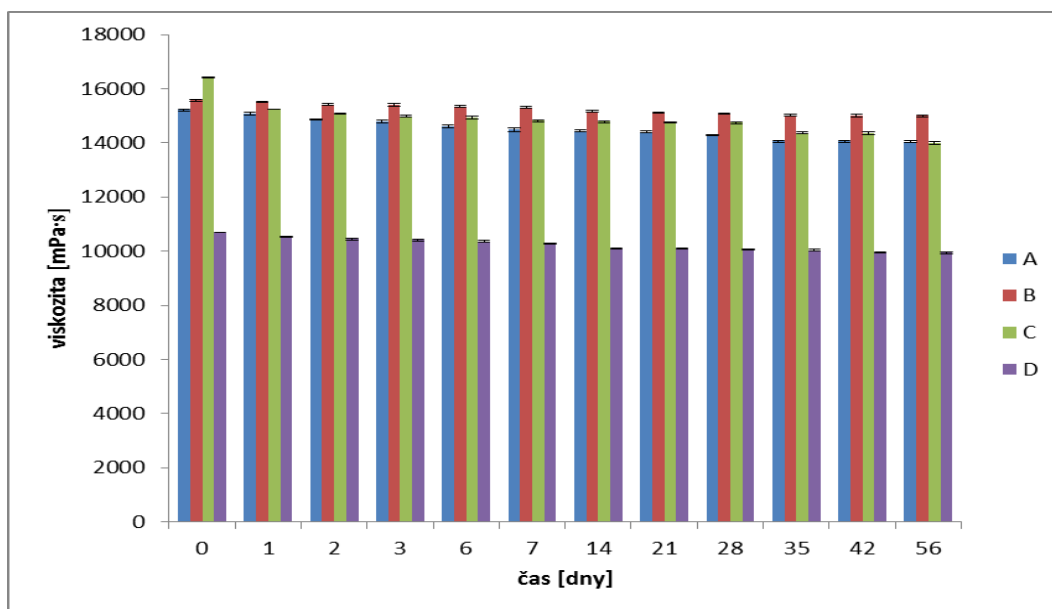


Obr. 11 Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíčček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) při 50 °C

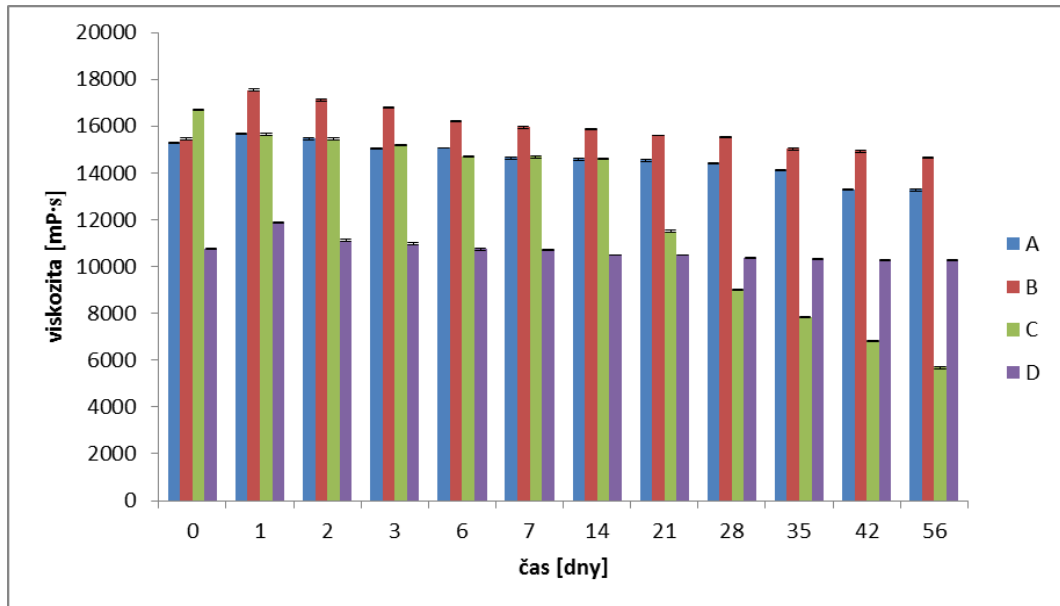
Při skladování vzorků gelů s přísadkami esenciálních olejů po dobu 56 dní měla prokazatelně největší vliv na stabilitu (viskozitu) všech gelů teplota nejvyšší, tedy 50 °C. Laboratorní teplota měla zásadní vliv především na viskozitu gelů s přísadkou citronového oleje, zatímco gel s přísadkou tymiánového oleje si udržel viskozitu nejvyšší. Zajímavé bylo, že v případě skladování těchto gelů při 37 °C nebyl počáteční pokles viskozity v porovnání s laboratorní teplotou tak výrazný a nastal později. Přesto byla u vzorků gelů v závěru testování při 37 °C skladování výrazně nižší viskozita oproti jejich skladování při laboratorní teplotě. Další zajímavostí byla změna viskozity gelu s přísadkou citronového oleje, která při skladování při laboratorní teplotě klesla mnohem výrazněji, než tomu bylo při skladování při 37 °C. Viskozita v případě gelů s přísadkou esenciálního skořicového a tymiánového oleje klesala v závislosti na čase a zvyšující se teplotou skladování přibližně stejně. Dále bylo zjištěno, že teplota měla největší destruktivní vliv na gel s přísadkou hřebíčkového esenciálního oleje, kdy byl zaznamenán nejvyšší pokles viskozity a 56. den testování měl tento gel spíše konzistenci roztoku než gelu.

Je tedy zřejmé, že na základě získaných výsledků zvýšená teplota společně s přibývajícím dobou skladování měla negativní vliv na viskozitu gelů a postupně docházelo k destrukci sítě gelu.

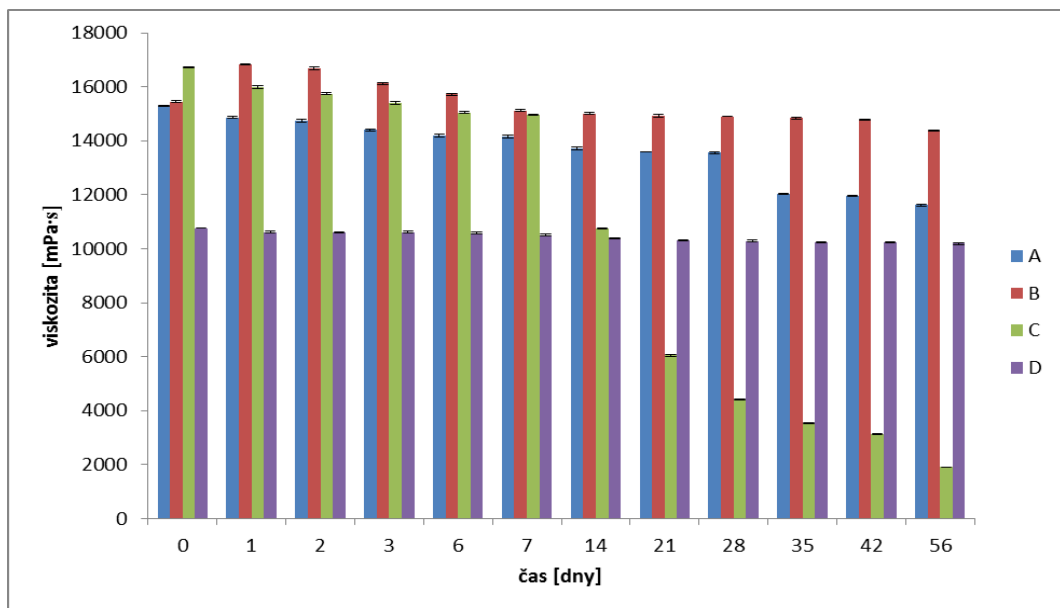
V případě směsných gelů, tj. gelů obohacených roztokem kyseliny mandlové, jejichž výsledné grafické znázornění naměřených hodnot viskozit při různých skladovacích podmínkách je znázorněno na Obr. 12., Obr. 13., Obr. 14. lze říci, že laboratorní teplota při jejich skladování neměla po celou dobu testování na viskozitu těchto gelů výraznější vliv. Při vyšších teplotách skladování však docházelo v prvních dnech testování u některých vzorků gelů dokonce k navýšení jejich viskozity. U všech vzorků směsných gelů, až na gel s přídavkem tymiánového oleje, nedošlo při vyšších teplotách skladování k výrazným poklesům viskozity. Jak již bylo zmíněno výše, u jediného směsného gelu s tymiánovým esenciálním olejem došlo vlivem teploty k výraznému poklesu jeho viskozity.



Obr. 12. Graf závislosti viskozity na čase směsného gelu s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kyselinou mandlovou při  $22\pm 2$  °C



Obr. 13. Graf závislosti viskozity na čase směsných gelů s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kyselinou mandlovou při 37 °C



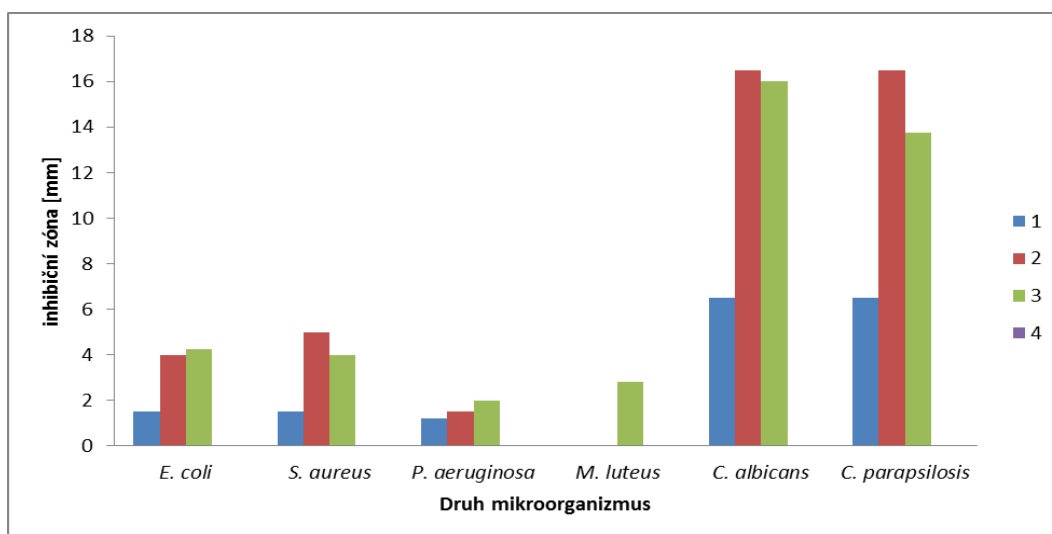
Obr. 14. Graf závislosti viskozity na čase směsných gelů s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kyselinou mandlovou při 50 °C

Porovnáním výsledných hodnot viskozit obou sérií vzorků, jak gelů pouze s přidavkem esenciálních olejů, tak směsných gelů obohacených o přidavek roztoku kyseliny mandlové, lze říci, že teplota měla výrazný vliv na gely obsahující pouze esenciální olej, zatímco přidavek kyseliny mandlové měl nejspíše podpurný a stabilizační vliv, s ohledem na jejich viskozitu.

### 5.3 Antimikrobní testování gelů

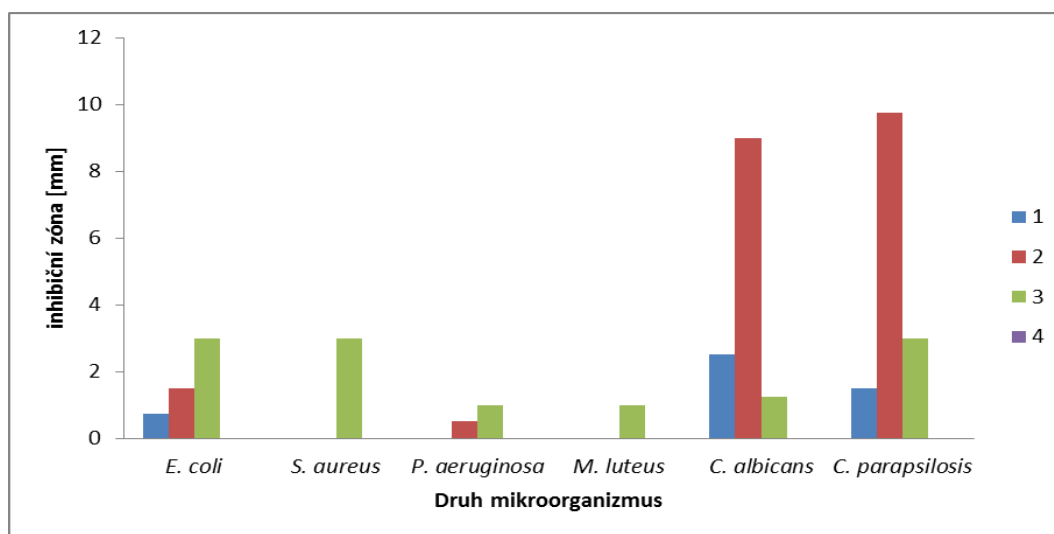
Antimikrobní testování bylo prováděno pomocí jamkové difuzní metody, kdy byly využity gram-pozitivní (*S. aureus* a *M. luteus*) a gram-negativní (*P. aeruginosa* a *E. coli*) bakterie, dále pak kvasinky *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Testování bylo prováděno jak v den přípravy gelů, tak potom následně 7., 14., 21., 28., 35., 42. a 56. den. Teploty testování gelů byly stejné, jako tomu bylo u sledování stability gelů.

Na základě výsledků jamkové difuzní metody provedené u gelů s esenciálními oleji, skladovaných při laboratorní teplotě bylo zjištěno, že gely vykazovaly poměrně dobrou antimikrobní účinnost proti použitým testovacím mikroorganismům, až na gel s obsahem citrónového esenciálního oleje, který nevykazoval inhibiční účinnost proti žádnému z testovacích mikroorganismů. Dále, účinnost proti *M. luteus* vykazoval pouze gel s přidavkem tymiánového oleje. Velikosti inhibičních zón testovaných gelů s přidavky esenciálních olejů na počátku testování (0. den) jsou uvedeny na Obr. 15.



Obr. 15. Antimikrobní účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citrón) na počátku testování

Při laboratorní teplotě si gely s přidavkem esenciálních olejů udržely dobré inhibiční účinky proti testovacím mikroorganismům po celou dobu testování (56 dnů). Výjimku tvořil gel s přidavkem hřebíčkového a skořicového esenciálního oleje, jelikož tyto nevykazovaly inhibiční účinky vůči *S. aureus* a *M. luteus* (Obr. 16.), navíc gel s přidavkem esenciálního hřebíčkového oleje nebyl účinný ani proti *P. aeruginosa*. Gel s přidavkem citronového esenciálního oleje nebyl účinný proti žádnému z testovacích mikroorganismů, a to v průběhu celého testování. Dále bylo z výsledků patrné, že s přibývajícím dobou skladování se snižuje účinnost proti testovacím mikroorganismům.



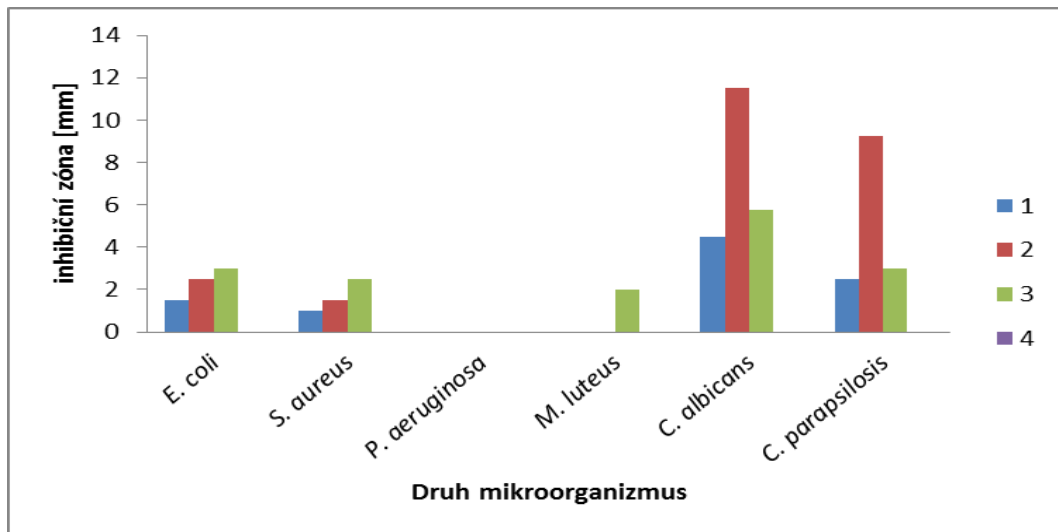
Obr. 16. Inhibiční účinky gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 56. den při 22±2 °C

Nejlepší antimikrobní účinnost sledovanou při laboratorní teplotě vykazoval tedy gel s přidavkem esenciálního tymiánového oleje, a to jak proti gram-pozitivním, tak gram-negativním bakteriím, vůči kvasinkám vykazoval v prvních dnech testování velmi dobrou účinnost, která se bohužel v průběhu skladování výrazně snížila. Gel s přidavkem esenciálního skořicového oleje vykazoval v prvních dnech testování nejlepší antimikrobní účinnost ze všech testovaných vzorků gelů, a to především vůči *S. aureus* a kvasinkám, poslední den testování však vůči *S. aureus* již účinnost nevykazoval, zato vůči kvasinkám si gel udržel dosti vysokou účinnost po celou dobu jeho testování.

Účinnost vůči mikroorganismům se snižovala s dobou skladování gelů a při zvýšené teplotě skladování. Konkrétně při 37 °C byl úbytek velikosti inhibičních zón dosti znatelný

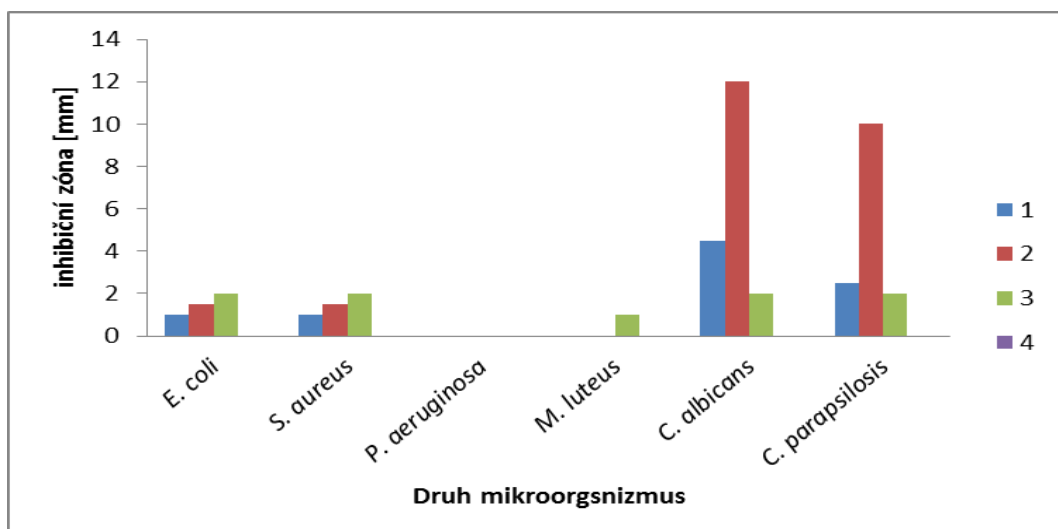


( Obr. 17.), kdy žádný z testovaných gelů s přísávkou esenciálních olejů nevykazoval již žádnou účinnost vůči *P. aeruginosa*.



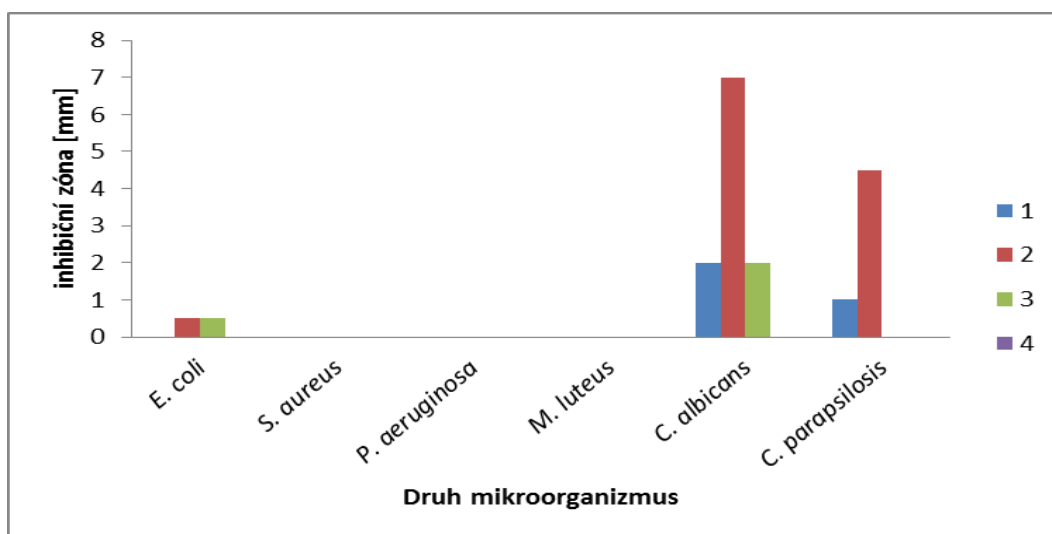
Obr. 17. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 7. den při 37 °C

Podobné inhibiční účinky, jako tomu bylo 7. den testování si gely udržely po dobu 28. dnů ( Obr. 18.), poté již gely s obsahem hřebíčkového a skořicového oleje nevykazovaly inhibiční účinnost vůči *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *M. luteus*.



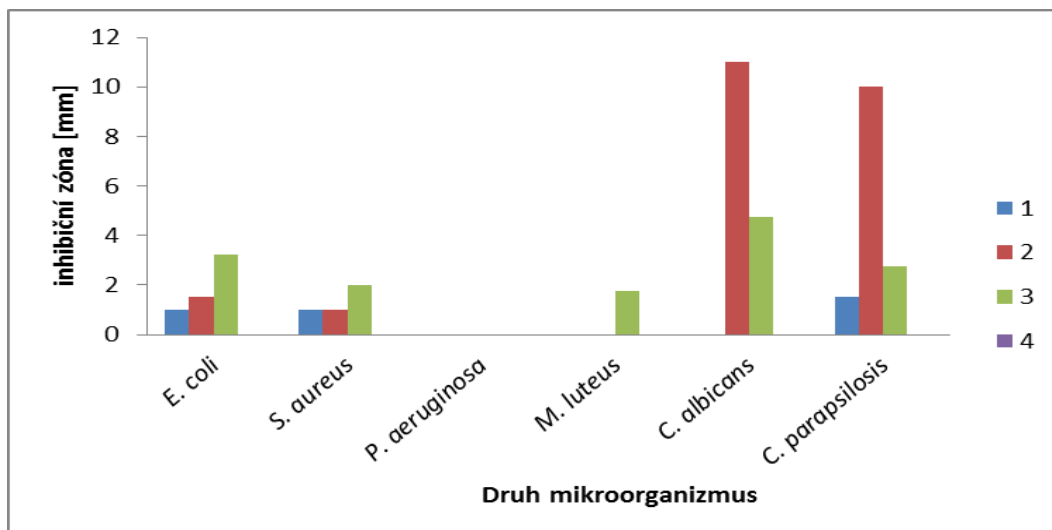
Obr. 18. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 28. den při 37 °C

Poslední den testování (56. den, Obr. 19) výrazně poklesly účinky gelů vůči sledovaným mikroorganismům. Téměř všechny vyrobené gely s obsahem esenciálních olejů, skladovaných při teplotě 37 °C a po dobu 56 dní vykazovaly inhibiční účinky jen vůči *E. coli* a kvasinkám. Gel s aktivní složkou hřebíčkovým olejem již neměl účinnost proti žádné ze sledovaných bakterií a gel s obsahem tymiánového oleje neměl účinnost vůči kvasince *C. parapsilosis*.



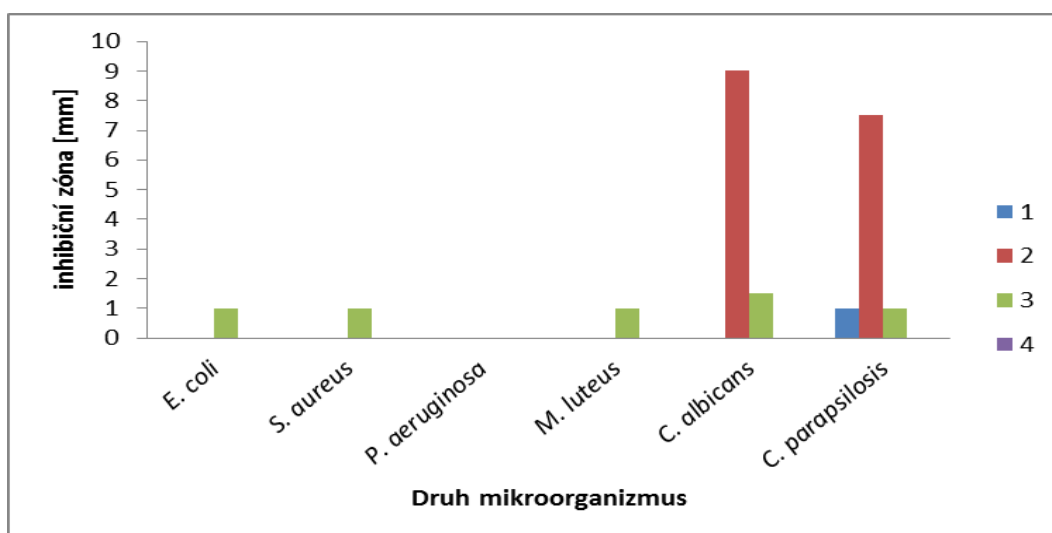
Obr. 19. Inhibiční účinky gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 56. den při 37 °C

Při nejvyšší teplotě skladování (50 °C) došlo u gelů po sedmi dnech jejího skladování k nejvýraznějšímu snížení jejich antimikrobní účinnosti, což je také názorně vidět na Obr. 20. Tak jako v předchozím případě, již od 7. dne testování nevykazovaly gely s obsahem esenciálních olejů žádnou účinnost proti *P. aeruginosa*, také gel s přídavkem hřebíčkového esenciálního oleje nebyl již účinný ani proti *C. albicans*.



Obr. 20. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 7. den při 50 °C

Obdobnou účinnost vykazovaly gely i do 21. dne jejich testování. V dalších dnech testování byla jejich antimikrobní účinnost už výrazně nižší, a to konkrétně pouze u gelu s přídavkem tymiánového esenciálního oleje byla zjištěna účinnost vůči bakteriím (Obr. 21.), ostatní gely (s obsahem hřebíčkového a skořicového oleje) účinkovaly spíše proti kvasinkám.

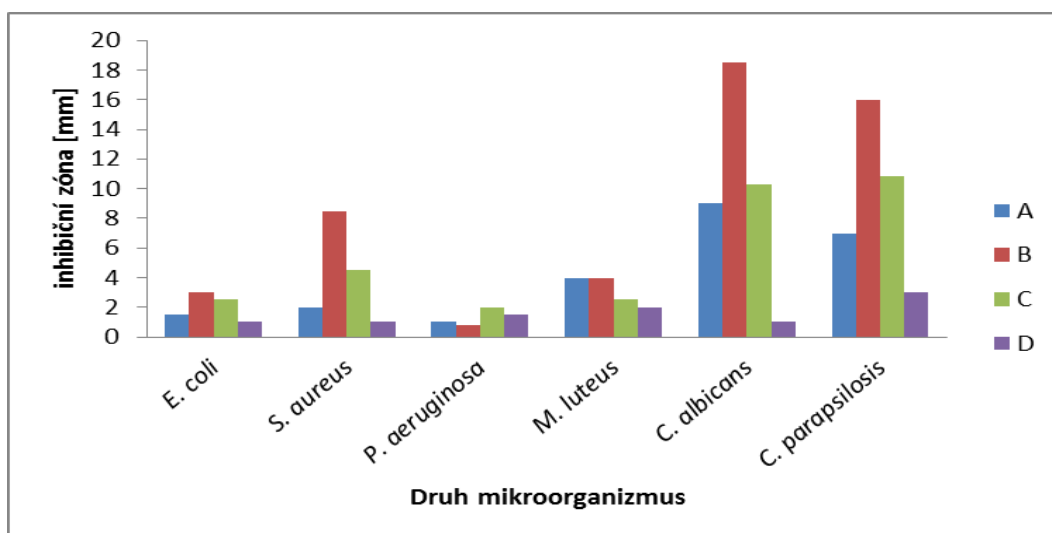


Obr. 21. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 28. den při 50 °C

Poslední den testování (56. den) při teplotě 50 °C již žádný z gelů nevykazoval jakoukoliv inhibiční aktivitu proti sledovaným mikroorganismům, výjimku tvořil pouze gel s obsahem skořicového esenciálního oleje, který vykazoval malou antimikrobní aktivitu vůči *C. parapsilosis*.

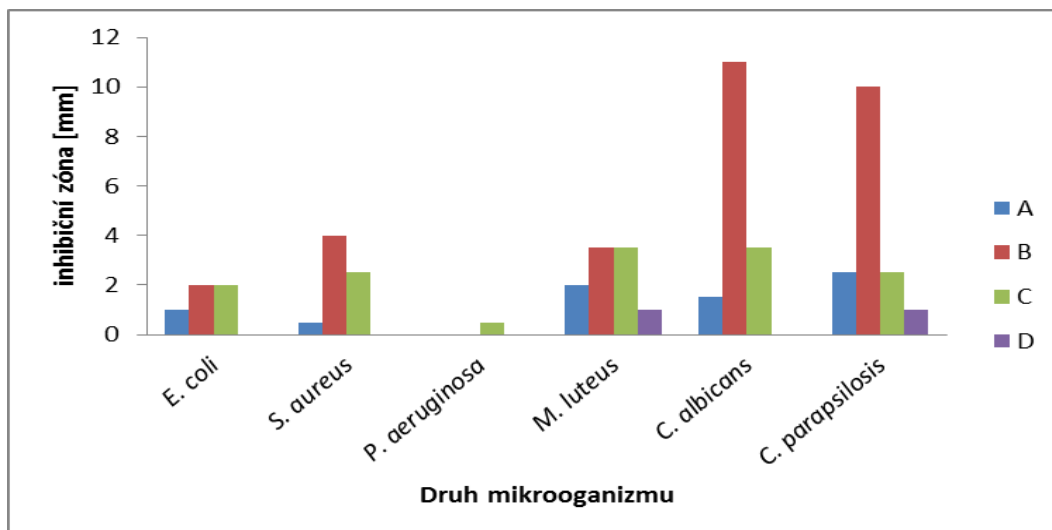
Ze získaných výsledků lze tedy říci, že teplota a doba skladování má výrazný vliv na antimikrobní účinnost testovaných gelů. Především zvýšená teplota nejvíce negativně ovlivňovala složení esenciálních olejů obsažených v gelech, a to vlivem jejich oxidace.

Antimikrobní účinnost směsných gelů obohacených navíc přidavkem roztoku kyseliny mandlové na počátku testování byla velmi dobrá, všechny připravené gely totiž vykazovaly dostatečnou antimikrobní účinnost proti všem testovacím mikroorganismům. Velikost inhibičních zón těchto gelů je názorně vidět na Obr. 22.



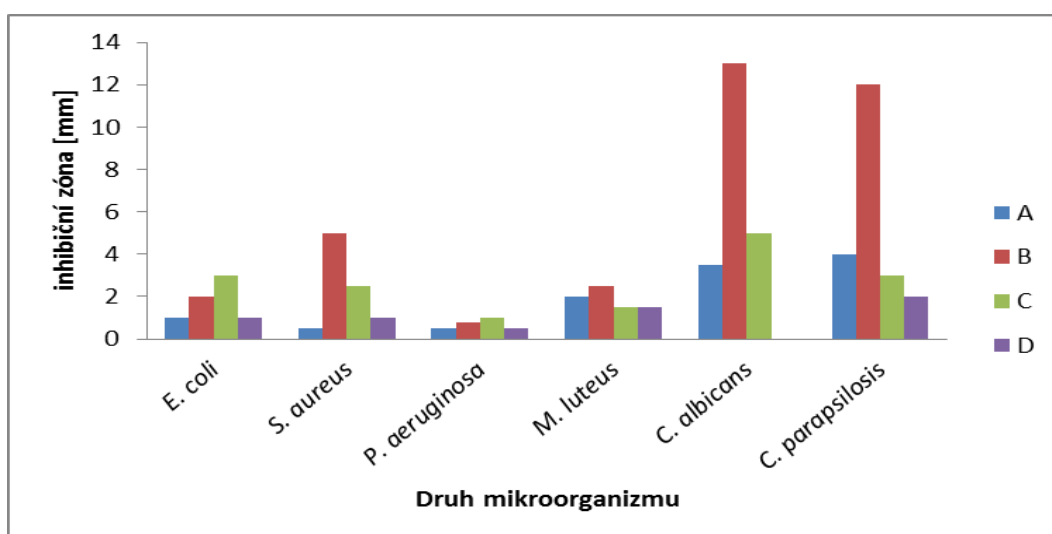
Obr. 22. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 0. den při 22±2 °C

Stejně tak i poslední den testování (56. den) si gely udržely při teplotě 22±2 °C stále dobrou antimikrobní účinnost (viz. Obr. 23.). Poslední den testování směsné gely, s výjimkou směsného gelu s obsahem tymiánového oleje nevykazovaly účinnost proti *P. aeruginosa*. Také antimikrobní účinnost směsného gelu s obsahem citronového oleje již nebyla žádná vůči *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans*. Ostatní gely obohacené o kyselinu mandlovou a esenciální hřebíčkový, skořicový a tymiánový olej si však udržely dobrou inhibiční účinnost vůči testovacím mikroorganismům.



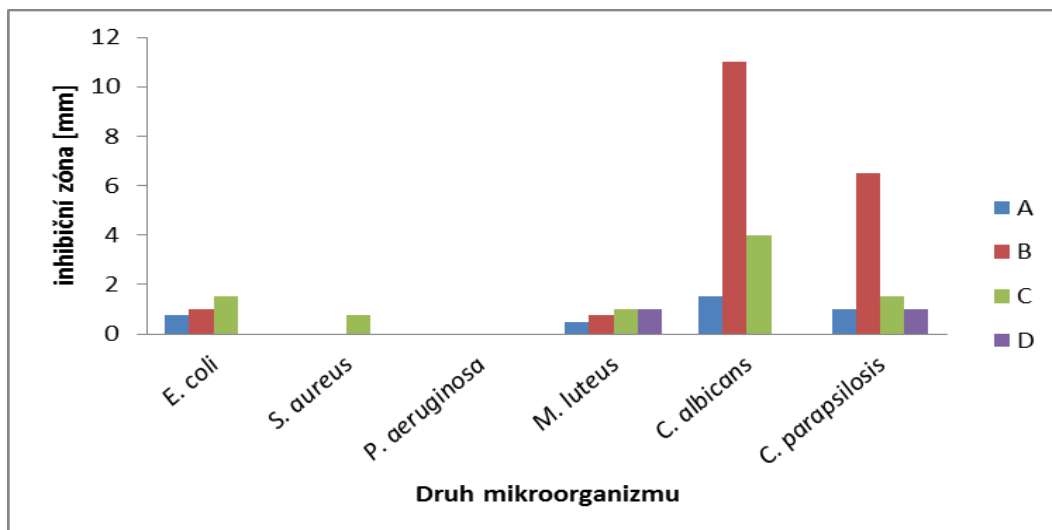
Obr. 23. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 56. den při  $22\pm 2$  °C

U gelů skladovaných při vyšší teplotě, konkrétně 37 °C ( Obr. 24.), jejich antimikrobní účinnost klesla oproti gelům skladovaných při laboratorní teplotě jen nepatrně, největší snížení bylo zaznamenáno u směsného gelu s obsahem citronového oleje, který již nevykázal žádnou účinnost proti kvasince *C. albicans*. Ostatní směsné gely si udržely i po týdnu skladování při 37 °C velmi dobrou inhibiční účinnost.



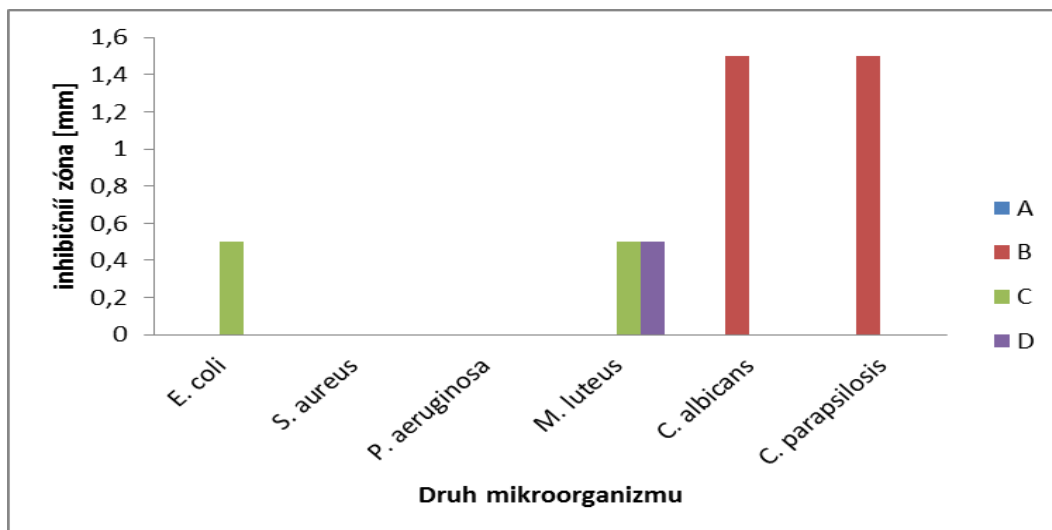
Obr. 24. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 7. den při 37 °C

Jak je patrné z Obr. 25., antimikrobní účinnost proti některým testovacím mikroorganismům si směsné gely udržely i po dobu 28. dnů. Výjimku tvořila *P. aeruginosa*, u které nebyly u žádného z testovaných gelů zaznamenány jakékoliv antimikrobní účinky, dále vůči *S. aureus* vykazoval účinnost pouze směsný gel s přidavkem tymiánového oleje.



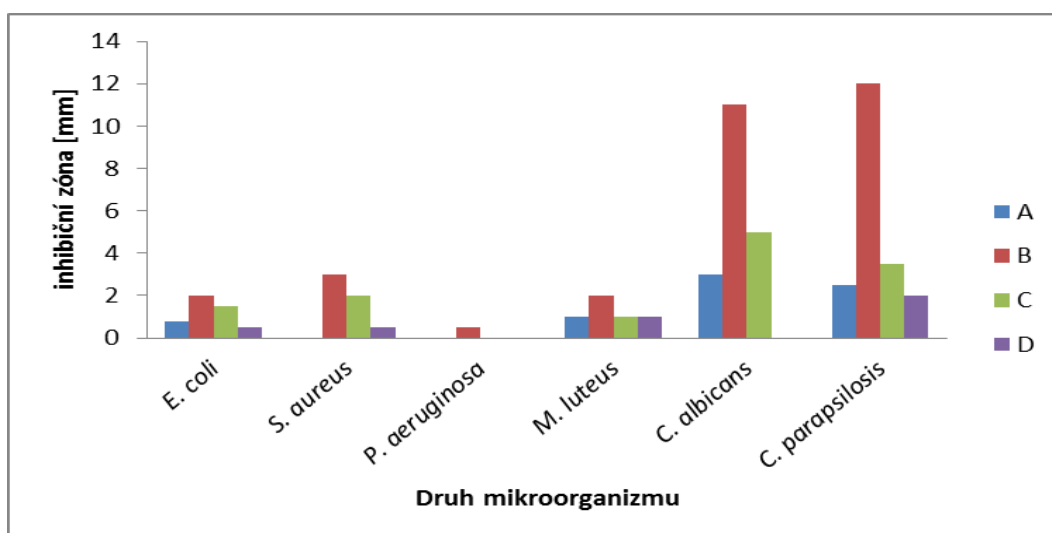
Obr. 25. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 28. den při 37 °C

Na konci testování při teplotě 37 °C (Obr. 26.) byla účinnost směsných gelů razantně snížena, kdy směsný gel obohacený o hřebíčkový esenciální olej již nevykazoval účinnost ani proti bakteriím, ani proti kvasinkám. Dále, žádný testovaný gel nevykazoval účinnost vůči *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Proti bakterii *M. luteus* byly v poslední den testování účinné pouze směsné gely s obsahem tymiánového a citronového oleje. Vůči *E. coli* byl účinný pouze směsný gel s přidavkem tymiánového oleje. Proti oběma druhům kvasinek byl účinný pouze směsný gel s obsahem skořicového esenciálního oleje.



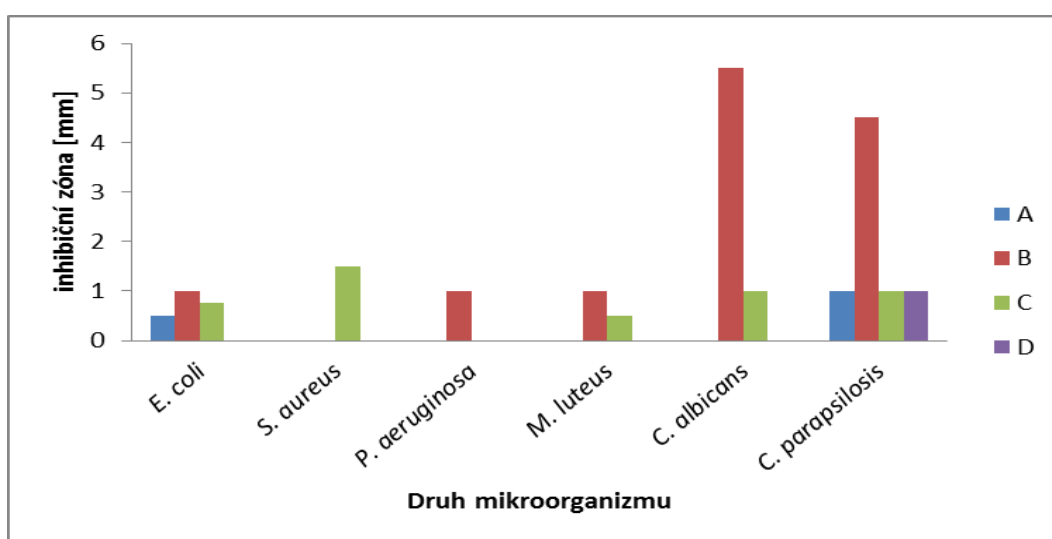
Obr. 26. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 56. den při 37 °C

Na Obr. 27. lze zase názorně vidět, jaký má teplota 50 °C působící na směsné gely po týdnu skladování razantní vliv na jejich účinnost vůči sledovaným mikroorganismům. Po týdnu skladování již nevykazovaly směsné gely s obsahem hřebíčkového, tymiánového a citronového oleje účinnost vůči *P. aeruginosa* a stejně jako tomu bylo i u teploty 37 °C, směsný gel s obsahem citronového oleje již nevykazoval účinnost vůči *C. albicans*.



Obr. 27. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 7. den při 50 °C

Po uplynutí 21 dnů v teplotě 50 °C, směsné gely výrazně svoji antimikrobní účinnost ztratily, a to vůči všem testovacím mikroorganismům. Dvacátý první den byl posledním dnem, kdy směsné gely vykazovaly alespoň malou odolnost vůči některým mikroorganismům, což je také znázorněno i na Obr. 28. Nejlepší antimikrobní účinky si zachovaly směsné gely s obsahem tymiánového a skořicového oleje, kdy směsný gel s obsahem tymiánového oleje nevykazoval účinnost pouze proti *P. aeruginosa* a směsný gel s obsahem skořicového oleje nevykazoval inhibiční účinnost jen vůči *S. aureus*. Poslední den testování, tedy 56. den, nevykazoval již žádný ze směsných gelů jakoukoliv inhibiční účinnost proti sledovaným mikroorganismům.



Obr. 28. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 21. den při 50 °C

Porovnáním výsledků jamkové difuzní metody gelů s esenciálními oleji a směsných gelů lze říci, že počáteční antimikrobní účinnost vůči všem sledovaným mikroorganismům byla dostatečná, a to i v případě směsných gelů, u kterých byla především u směsného gelu s obsahem citronového oleje zaznamenána antimikrobní účinnost. Přesto gely s obsahem pouze esenciálních olejů si udržely výrazně lepší antimikrobní účinnost v průběhu celé doby testování, a to i při působení vyšších teplot.

Lze tedy z výsledků vyvodit, že nejenom zvyšující se teplota, ale i celková doba skladování má výrazný vliv na antimikrobní účinnost, a to jak u gelů s obsahem esenciálních olejů, tak i směsných gelů. Získané poznatky korespondují s prací TUREK et. al., 2013 [68], kte-



rá říká, že u esenciálních olejů klesá stabilita a dochází ke změnám chemického složení vlivem zvýšené teploty při skladování, což může mít neblahý vliv na výslednou antimikrobní účinnost.

#### 5.4 Vyhodnocení doplňkové metody

Doplňková metoda byla provedena pro ověření výsledků získaných na základě jamkové difuzní metody, a to jak u gelů s obsahem esenciálních olejů, tak u směsných gelů. Testování pomocí této metody proběhlo na počátku, tj. v nultý den a následně na konci (56. den) testování.

V tabulkách (Tab. 11, Tab. 12., Tab. 13., Tab. 14.) jsou shrnuty výsledky doplňkové metody na počátku a konci experimentu. Ze získaných výsledků lze říci, že se tyto plně shodují s výsledky získanými jamkovou difuzní metodou (kap. 5.3). Některé výsledky získané z výsledků doplňkové metody ukazují, že některé z gelů mají dokonce lepší účinnost vůči testovacím mikroorganismům, než tomu bylo u jamkové metody.

Tab. 11. Vyhodnocení doplňkové metody gelů na počátku experimentu

Vzorek gelu	Druh Mikroorganismu					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>1</b>	-	++	-	+++	-	-
<b>2</b>	-	-	+	++	-	-
<b>3</b>	-	-	-	-	-	-
<b>4</b>	++	+++	+++	+++	++	++
<b>A</b>	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>	-	-	-	-	-	-
<b>C</b>	-	-	-	-	-	-
<b>D</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Kontrola</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. - žádný nárůst, + slabý růst, ++ střední růst, +++ silný růst; Druh EO (1, A hřebíček, 2, B skořice, 3, C tymián, 4, D citron)

Tab. 12. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 22±2 °C

Vzorek gelu	Druh Mikroorganismu					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>1</b>	+	+	++	++	-	-
<b>2</b>	-	-	+	++	-	-
<b>3</b>	-	-	-	-	-	-
<b>4</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>A</b>	+	+++	++	-	-	-
<b>B</b>	-	+++	-	-	-	-
<b>C</b>	-	+	-	-	-	-
<b>D</b>	++	+++	++	-	+	-
<b>Kontrola</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. - žádný nárůst, + slabý růst, ++ střední růst, +++ silný růst; Druh EO (1, A hřebíček, 2, B skořice, 3, C tymián, 4, D citron)

Tab. 13. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 37 °C

Vzorek gelu	Druh Mikroorganismu					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>1</b>	+	+++	++	+++	-	-
<b>2</b>	-	+++	+++	+++	-	-
<b>3</b>	-	+++	++	+	-	+
<b>4</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>A</b>	++	+++	++	+	++	++
<b>B</b>	+++	+++	+	++	-	-
<b>C</b>	-	+	-	-	+	+
<b>D</b>	++	+++	++	-	+++	+++
<b>Kontrola</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. - žádný nárůst, + slabý růst, ++ střední růst, +++ silný růst; Druh EO (1, A hřebíček, 2, B skořice, 3, C tymián, 4, D citron)

Tab. 14. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 50 °C

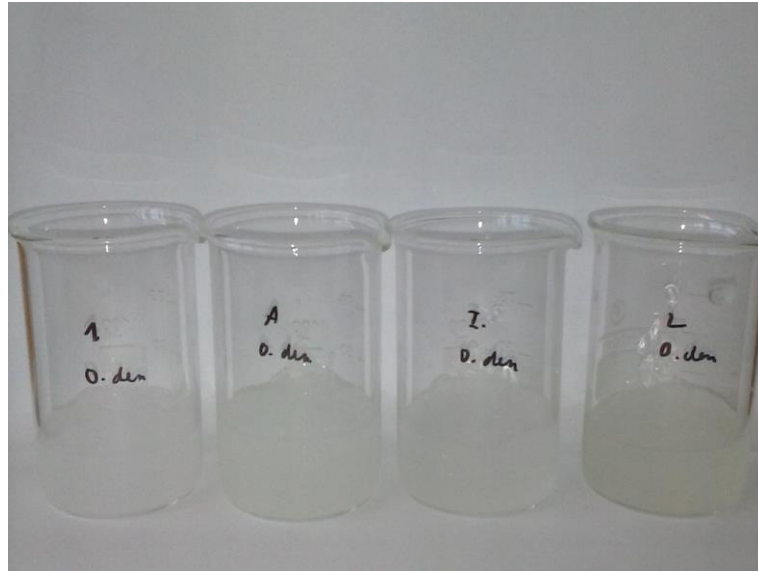
Vzorek gelu	Druh Mikroorganismu					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>1</b>	+++	+++	+++	+++	+	-
<b>2</b>	+	+++	+++	+++	-	-
<b>3</b>	-	+++	-	+	-	+
<b>4</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>A</b>	+++	+++	+++	+++	++	++
<b>B</b>	+++	+++	++	++	+	+
<b>C</b>	++	++	++	+	++	++
<b>D</b>	++	+++	++	+	+++	++
<b>Kontrola</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. - žádný nárůst, + slabý růst, ++ střední růst, +++ silný růst; Druh EO (1, A hřebíček, 2, B skořice, 3, C tymián, 4, D citron)

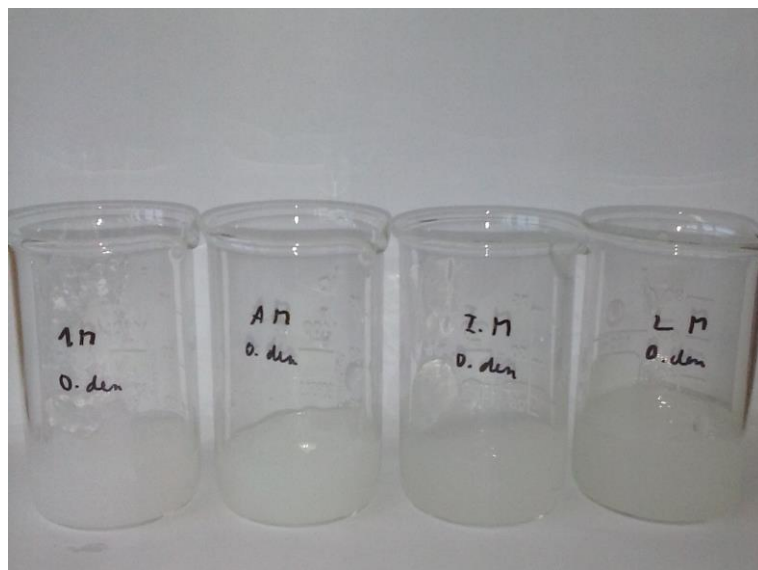
## 5.5 Změny barvy a vůně gelů v průběhu testování stability

Při testování stability je dalším důležitým faktorem sledování sensorických vlastností výrobků, proto byla v průběhu testování sledována i vůně a barva vyrobených gelů.

Na Obr. 29. a Obr. 30. lze názorně vidět vzhled čerstvě vyrobených gelů, a to jak směsných, tak i těch s přidavkem pouze esenciálních olejů, kdy jsou všechny tyto mléčně zakažené s mírnými odstíny do hněda nebo šeda. Toto zbarvení je způsobeno přidavkem esenciálních olejů. Dále si lze povšimnout, že u gelů došlo přidavkem esenciálních olejů k výraznému úbytku bublin, které jsou pro gely charakteristické.



*Obr. 29. Připravené gely zleva s hřebíčkovým, skořicovým, tymiánovým esenciálním olejem*



*Obr. 30. Připravené směsné gely s kys. mandlovou a zleva s hřebíčkovým, skořicovým, tymiánovým a citronovým esenciálním olejem*

V průběhu skladování došlo u gelů s přidavkem hřebíčkového oleje ke změně jeho zbarvení, prvotní barevná změna nastala 21. den skladování při teplotě 50 °C, kdy výsledný gel byl zbarven do světle hněda. Tato barevná změna se v průběhu času ještě více zintenzivni-

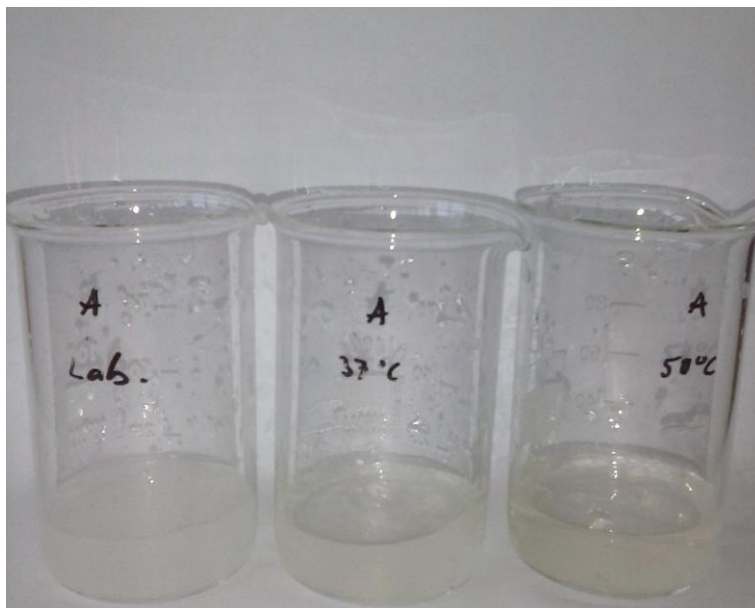
la, a to až do výsledného zbarvení, které je znázorněno na Obr. 31. vpravo. Výrazně také poklesla i viskozita gelu. Barevná změna také proběhla u téhož vzorku skladovaného při 37 °C, ale až ke konci testování (42. den). Skladování gelů při laboratorní teplotě nemělo na výsledné zbarvení gelu téměř žádný vliv, došlo zde pouze k mírnému vyčeření, v důsledku snížení viskozity gelu.



*Obr. 31. Změny barvy gelu s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

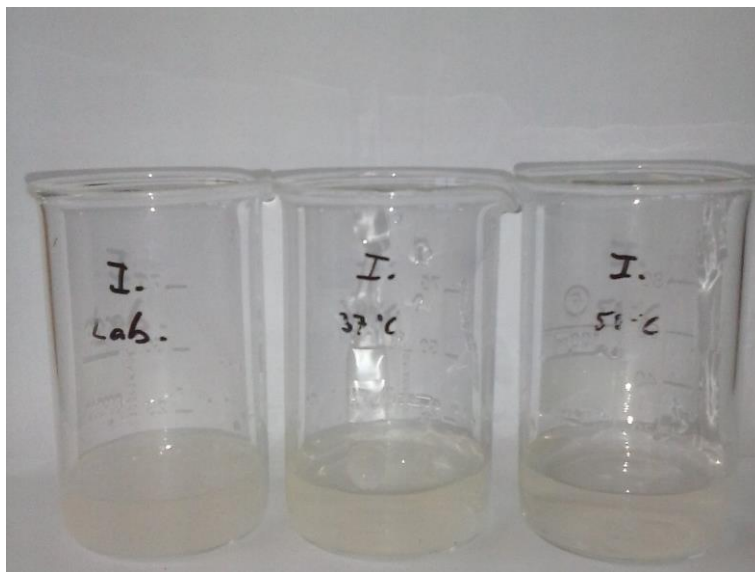
Po celou dobu testování si gely zachovaly charakteristickou vůni po hřebíčku, která se skladováním ještě zintenzivnila, v případě vyšších teplot došlo na konci testování k mírnému nepříjemnému štiplavému podtónu.

Gely s přidavkem skořicového oleje (Obr. 32.), v závislosti na přibývajícím čase a teplotě skladování průběžně ztransparentněly, k výrazným barevným změnám u těchto gelů však nedošlo. Jejich vůně byla na začátku testování velmi intenzivní skořicová, která však s teplotou a dobou skladování klesala, charakter esenciálního oleje byl však zachován po celou dobu testování toho gelu.



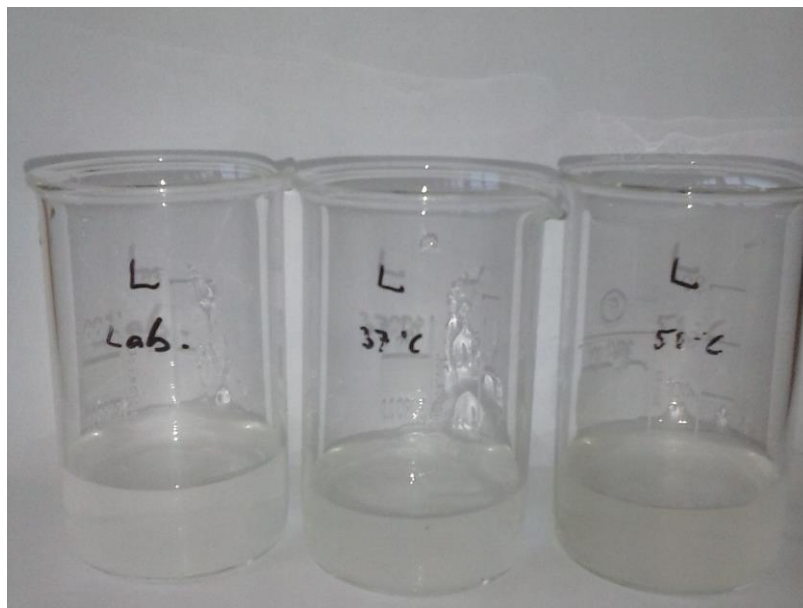
*Obr. 32. Změny barvy gelu s přidavkem skořicového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

V případě gelu, kde byla použita jako účinná látka tymiánový olej, došlo v průběhu jeho skladování k nejrychlejším změnám ve zbarvení, kdy již 14. den při 50 °C nastalo jeho mírné zhnědnutí a další týden byl tento gel už tmavě hnědý. Čtyřicátý druhý den testování došlo k výraznému snížení jeho viskozity a výsledný gel zesvětlal. Poslední den byl dokonce téměř čirý. U ostatních dvou vzorků skladovaných při laboratorní teplotě a při 37 °C nedošlo v jejich zbarvení téměř k žádným změnám, výraznější změna nastala pouze při 37 °C, kdy vzorek gelu nabyl transparentního charakteru. Výsledné barevné změny gelu lze vidět na Obr. 33.



*Obr. 33. Změny barvy gelu s přidavkem tymiánového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

Gely s obsahem citronového oleje v průběhu skladování při různých teplotách, se vlivem jejich výrazného snížení viskozity staly transparentní, a to nejen při vyšších teplotách, ale dokonce i při teplotě laboratorní. Změna barvy nastala jen při skladování při teplotě 50 °C, kdy výsledná barva gelu byla do šedého odstínu. Výsledné zbarvení jednotlivých vzorků gelů poslední den testování je znázorněno na Obr. 34.

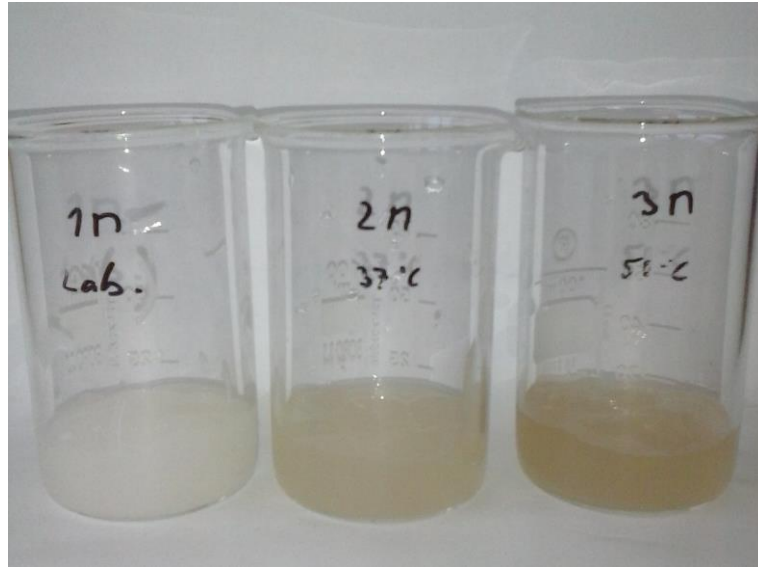


*Obr. 34. Změny barvy gelu s citronovým esenciálním olejem 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

Oproti ostatním vzorkům gelů nastal zde vlivem zvýšené teploty výrazný úbytek citronové vůně, a to především při teplotě 50 °C, zatímco při laboratorní teplotě se intenzita vůně výrazně zvýšila.

U směsného gelu obsahujícího mimo kyselinu mandlovou i hřebíčkový olej, došlo vlivem odlišných skladovacích podmínek k následujícím změnám (Obr. 35.), konkrétně se jednalo o mírnou změnu zbarvení 28. den při 50 °C, která se do konce testování výrazně zvýšila. Při 37 °C barevná změna nastala až na konci testování, kdy gel získal světle hnědé zbarvení. Gel skladovaný při laboratorní teplotě byl po celou dobu jeho testování zbarven stejně.

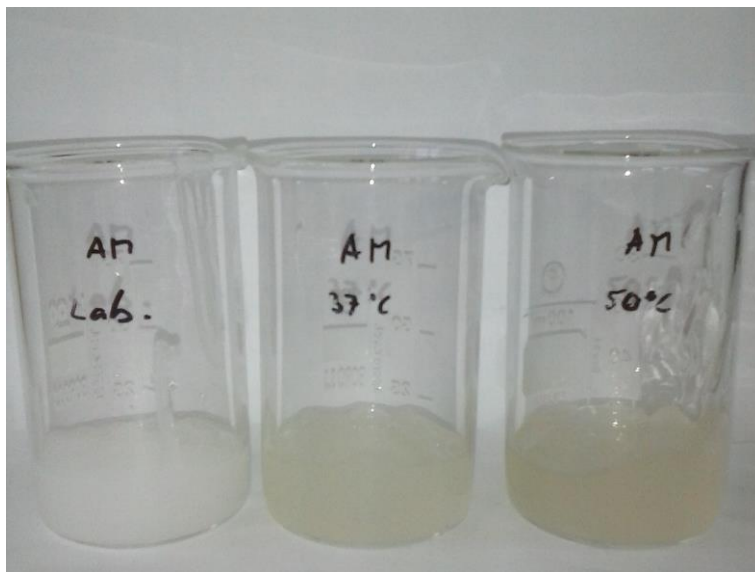




*Obr. 35. Změny barvy směsného gelu s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22 \pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

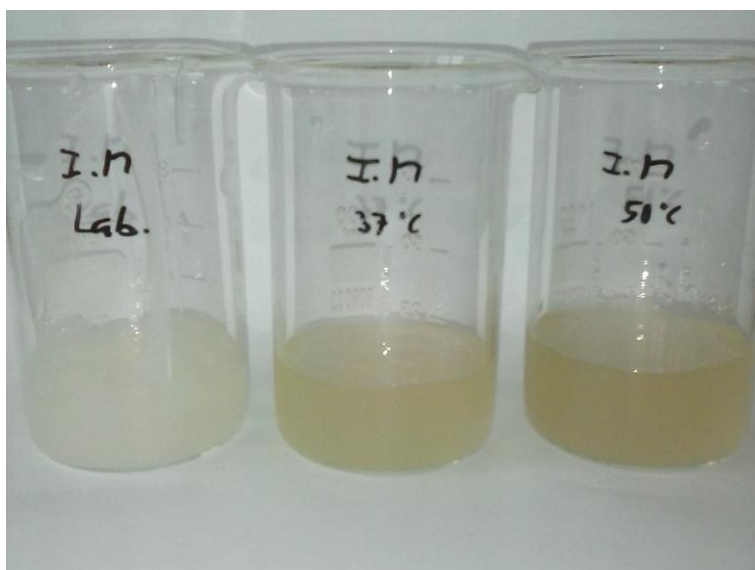
Po celou dobu testování si také vůně zachovala svůj charakter, pouze zvýšená teplota ke konci testování u gelů způsobila nepříjemně štiplavý nádech.

U vzorků směsného gelu obohaceného navíc skořicovým olejem nenastala po celou dobu jeho testování změna ve viskozitě, přesto jeho barevná změna ke konci testování byla v porovnání s gely obsahující pouze esenciální olej daleko výraznější. Jak již bylo řečeno, k výraznějším změnám došlo až na konci testování, což je názorně vidět i na Obr. 36. Změna vůně nastala až při vyšší teplotě, tedy 50 °C, kdy intenzita skořicové vůně byla snížena.



*Obr. 36. Změna barvy směsného gelu s přidavkem skořicového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

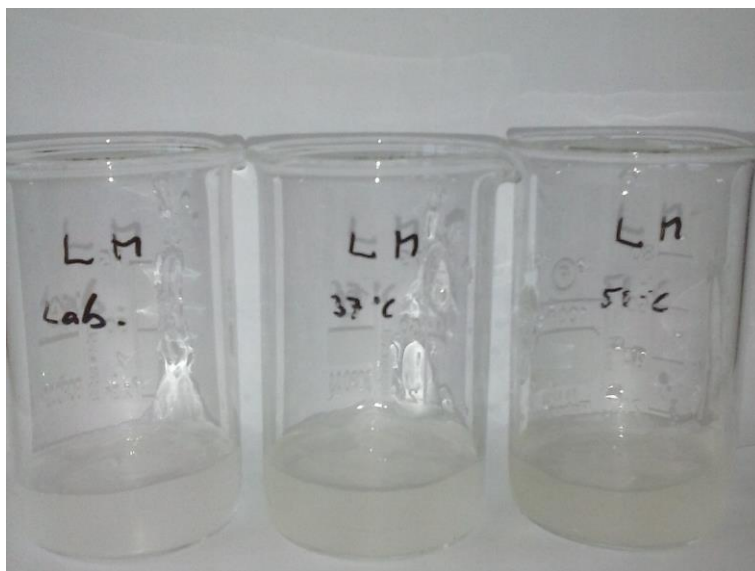
Změna ve zbarvení v průběhu skladování u směsných gelů obsahujících tymiánový olej, nastala 21. den, a to konkrétně při 50 °C a následující týden (28. den testování) došlo k barevné změně i při 37 °C, která se s postupem času dále zintenzivňovala. Při laboratorní teplotě nedošlo k žádné barevné změně ani změně v konzistenci. Barevné změny gelů v závěru testování jsou znázorněny na Obr. 37.



*Obr. 37. Změna barvy směsného gelu s přidavkem tymiánového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)*

Vůně tohoto směsného gelu byla po celou dobu charakteristicky tymiánová a v závěru testování při teplotě 50 °C nabyla mírně zemitý zápach.

Směsný gel obohacený navíc citronovým olejem neprošel v průběhu skladování výraznými barevnými změnami, a to ani při zvýšených teplotách. Došlo spíše k zesvětlení mléčného zabarvení, které navíc u vzorku skladovaného při 50 °C získalo šedý nádech (viz Obr. 38.).



*Obr. 38. Změna barvy směsného gelu s přidavkem citronového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích podmínkách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C)*

Vůně byla po celou dobu skladování intenzivně citronová, v závěru testování tato intenzita výrazně poklesla, především při skladování v teplotě 50 °C.

## **5.6 Výsledky zátěžového testu**

V další části práce byly připravené gely podrobeny zátěžovému testu, který by měl zjistit, zda jsou esenciální oleje a kyselina mandlová použité v gelech účinnými konzervačními látkami zabraňujícími v růstu mikroorganismů. Testování bylo provedeno na základě ČSN EN ISO 11930 [72], která byla pro naše účely mírně modifikována. Konkrétně bylo třeba zjistit, zda místo běžného testování mikrobiálního růstu pomocí metody roztěru na Petriho miskách by bylo možné využít měření optické denzity na spektrofotometru.

Na začátku testování bylo nezbytné provést několik pre-experimentů, kdy se nejprve zkoušelo proměřovat optickou denzitu u gelů s obsahem tymiánového a citronového oleje, které byly úmyslně kontaminovány gram-negativní bakterií *E. coli*. Nejprve byly tedy vzorky kontaminovány a následně naředěny v mikrotitrační destičce tekutou půdou desítkovým ředím od  $10^{-1}$  až do  $10^{-4}$ , také byl použit pro kontrolu sterilní bujon, bujon zaočkováný *E. coli* a vzorek bez úmyslné kontaminace bakterií. Následovalo změření optické denzity a kultivace mikrotitrační destičky s gely a mikroorganismy do druhého dne při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , následně pak opětovné proměření optické denzity. Při porovnání hodnot optické denzity bylo zjištěno, že u naředěných vzorků gelů s obsahem tymiánového oleje nebyl zjištěn žádný růst sledované bakterie, zatímco u gelu s obsahem citronového oleje byl nárůst viditelný. Kontrolní vzorky vyšly podle předpokladů, tzn. že gel s obsahem tymiánového oleje měl natolik silné antimikrobní vlastnosti, že inhiboval růst sledované bakterie, zatímco u gelu s obsahem citronového oleje byl růst *E. coli* zjištěn a to tak, že se zvyšujícím se ředěním vzorků gelu byla hodnota optické denzity vyšší, tzn. že s ubývajícím množstvím účinné látky, tedy citronového esenciálního oleje, byl nárůst *E. coli* vyšší.

Bylo také nezbytně nutné zjistit, zda bude hodnota optické denzity zaznamenána i u gelů neředěných. Z tohoto důvodu byly do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky napipetovány jak gely bez obsahu mikroorganismů, tak úmyslně kontaminovány a opět provedeno jejich ředění až na hodnotu  $10^{-3}$ . Po proměření optické denzity byly získané hodnoty z počátku měření dosti překvapivé, jelikož vzorky gelů zaočkovány *E. coli* měly mnohem nižší naměřenou optickou denzitu v porovnání s gely bez přítomnosti *E. coli*. I přesto byla tato mikrotitrační destička dále podrobena kultivaci při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následující den byla u ní opět změřena optická denzita. Výsledkem bylo, že u všech jamek s obsahem gelů došlo ke snížení optické denzity, což bylo pravděpodobně způsobeno 24 hodinovou inkubací, kdy následkem teploty ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mohlo dojít k mírnému porušení gelové sítě a vzorky byly tak více naředěny.

Na základě výsledků pre-experimentu bylo zjištěno, že měření optické denzity není pro gelové formy přípravků příliš vhodné, jelikož počáteční naměřené hodnoty neposkytly žádané výsledky a další testování, které by proběhlo striktně dle doporučení normy, nebylo již dále z časových důvodů provedeno.

## 5.7 Mikrobiální čistota gelů

U nově vyrobených gelů i u gelů skladovaných 56 dní v různých teplotních režimech proběhlo testování jejich mikrobiologické čistoty, a to tak, že byl použit jednoduchý test, kdy do skleněných sterilních zkumavek s tekutou půdou byly napipetovány příslušné vzorky gelů a následně tyto dva dny inkubovány při 30 °C. Tento test byl proveden především proto, že vzorky jednotlivých gelů nemohly být před zahájením jejich antimikrobního testování podrobeny sterilizaci, a to především z důvodu nestability použitých aktivních látek (esenciálních olejů) vůči vysokým teplotám a také proto, že by vysoká teplota sterilace mohla mít negativní vliv na gelovou síť (snížení viskozity gelu).

Po inkubaci byly tedy všechny zkumavky vizuálně zkontrolovány, zda v nich není patrný zákal, což by znamenalo růst mikroorganismů. V Tab. 15. jsou pak uvedeny výsledky testování mikrobiální čistoty vyrobených gelů. Z výsledků tedy vyplývá, že vyrobené gely jsou mikrobiálně čisté, jelikož u testovaných vzorků gelů nedošlo k zakalení zkumavek, kromě vzorku gelu s přídavkem citronového esenciálního oleje, kde se po dvou denní inkubaci objevil slabý zákal. V případě ostatních vzorků gelů podrobených různým teplotním režimům tomu bylo již jinak. U některých vzorků gelů se objevila různá intenzita zákalu, ale mírná kontaminace těchto vzorků se dala předpokládat, vzorky gelů byly v průběhu testování jejich stability každý týden podrobovány měření pH a viskozity a následně z nich byly odebírány i vzorky pro testování jejich antimikrobní účinnosti. Tím pádem se kontaminaci nedalo výrazným způsobem zabránit, protože jak měření pH, tak měření viskozity se provádí v běžných laboratorních podmínkách, kde není sterilní prostředí.

Tab. 15. Vyhodnocení testování mikrobiální čistoty gelů

Testované vzorky gelů	Nově připravené gely	Teplota skladování 56. den testování		
		22±2 °C	37 °C	50 °C
<b>1</b>	-	-	+	+++
<b>2</b>	-	-	-	++
<b>3</b>	-	-	+	-
<b>4</b>	+	++	++	++
<b>A</b>	-	-	-	+
<b>B</b>	-	+	++	+
<b>C</b>	-	-	+	-
<b>D</b>	-	-	+	++

Pozn. - bez zákal, + slabý zákal, ++ střední zákal, +++ silný zákal; Druh EO

(1 a A hřebíček, 2 a B skořice, 3 a C tymián, 4 a D citron)

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na vliv teploty na stabilitu a antimikrobní účinnost kosmetických gelů s obsahem netradičních antimikrobních látek. Teoretická část je věnována nejpoužívanějším gelotvorným látkám a jejich vlastnostem, dále pak byla antimikrobním látkám, a to jak běžně používaným v antibakteriálních gelech (alkoholy), tak i netradičním, mezi něž patří esenciální oleje a hydroxy kyseliny.

Experimentální část popisuje přípravu jednotlivých antimikrobních gelů a jejich následné testování stability, měření pH, viskozity a pozorování změn sensorických vlastností. Další částí bylo i ověřování antimikrobní účinnosti jednotlivých gelů a také jejich celková mikrobiální čistota.

V průběhu testování stability, po dobu 56 dní, bylo v určitých intervalech měřeno pH u vzorků gelů s přídavkem hřebíčkového, skořicového, tymiánového a citronového esenciálního oleje a u směsných gelů obohacených navíc roztokem kyseliny mandlové. Tyto vzorky gelů byly vystaveny různým skladovacím teplotám ( $22 \pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C). Na základě výsledků bylo zjištěno, že teplota, společně s prodlužující dobou skladování neměla markantní vliv na změnu hodnot pH, jak u gelů s přídavkem esenciálních olejů, tak směsných gelů. U gelů došlo při zvýšených teplotách skladování pouze k nepatrnému snížení pH. Byl také pozorovatelný rozdíl mezi jednotlivými typy gelů, kdy u směsných gelů došlo k mnohem menšímu poklesu hodnot pH oproti gelům s esenciálními oleji, lze tedy usuzovat, že kyselina mandlová má pozitivní vliv na udržení pH v gelových formách přípravků.

U měření viskozity gelů bylo zřejmé, že u gelů s přídavkem esenciálních olejů došlo v průběhu skladování, jak při laboratorní teplotě ( $22 \pm 2$  °C), tak při zvýšených teplotách skladování (37 °C a 50 °C) k výraznému snížení hodnot viskozit. Snížení viskozity bylo u jednotlivých vzorků gelů s esenciálními oleji rozdílné, zřejmě vlivem odlišného chemického složení jednotlivých typů esenciálních olejů. V případě výsledných hodnot viskozit u směsných gelů nedošlo ani při pokojové teplotě, ani při zvýšených teplotách k výrazným změnám ve viskozitě, pouze u gelu s přídavkem tymiánového esenciálního oleje byl pokles největší. Ostatní gely si udržely poměrně dobrou viskozitu po celou dobu testování. Lze tedy říci, že kyselina mandlová má nejen podpůrný vliv na pH, ale i na viskozitu gelů. Sa-

motný přídavek esenciálních olejů má spíše negativní vliv na stabilitu (viskozitu) gelů, který se umocňuje při delším skladování a zvyšující se teplotě.

Při testování antimikrobní účinnosti gelů bylo zjištěno, že počáteční antimikrobní účinky byly v případě směsných gelů obohacených roztokem kyseliny mandlové podpořeny především u gelu s citronovým esenciálním olejem, v porovnání s gelem s přídavkem citronového esenciálního oleje bez přídavku roztoku kyseliny mandlové, který nevykazoval žádnou antimikrobní účinnost. Dále pak přídavek roztoku kyseliny mandlové podpořil antimikrobní účinnost směsných gelů především s přídavkem hřebíčkového a skořicového esenciálního oleje proti *S. aureus*, *M. luteus* a *C. albicans*. Přídavek kyseliny mandlové mírně snižoval účinnost jen v případě testování směsných gelů s tymiánovým esenciálním olejem. I přes tyto velmi příznivé počáteční výsledky antimikrobní účinnosti směsných gelů, které se v průběhu skladování a vlivem zvýšených teplot razantně snížily v porovnání s gely, kde byly účinnou látkou pouze esenciální oleje, které si udržely lepší inhibiční účinky v průběhu testování. Ze všech testovaných gelů měl nejlepší inhibiční účinky proti bakteriím gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje a směsný gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje, také směsný gel s přídavkem skořicového esenciálního oleje měl v počátcích testování velmi dobré inhibiční účinky. Nejsilnější inhibiční účinek proti kvasinkám vykazovaly jak gel s přídavkem skořicového esenciálního oleje, tak i směsný gel s přídavkem stejného esenciálního oleje. Lze tedy říci, že prodlužující se doba skladování a zvýšená teplota má negativní vliv na antimikrobní účinnost gelů obohacených esenciálními oleji a roztokem kyseliny mandlové.

Pro ověření výsledků získaných z jamkové difuzní metody byla provedena ještě doplňková metoda. Bylo prokázáno, že výsledky jamkové difuzní metody korespondují s výsledky doplňkové metody.

Jedním z dalších parametrů stabilitního testování jsou senzorycké vlastnosti, které by si měl vzorek udržet po celou dobu testování na přijatelné úrovni. Vizualním hodnocením v průběhu celého testování bylo zjištěno, že zvýšená teplota (37 a 50 °C) společně s přibývajícím dobou skladování měla negativní vliv na zbarvení gelů. Především přídavek hřebíčkového a tymiánového esenciálního oleje do gelové formy zbarvuje gel do hněda, pravděpodobně se tak dělo následkem degradace chemických sloučenin v esenciálních olejích. Co se týče změny vůně, základní charakter vůně po použitých esenciálních olejích byl v gelech zach-



ván, jen u vzorků skladovaných při 50 °C se intenzita vůně snížila nebo získala nepříjemný štiplavý, případně zemitý podtón.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. Vyd. Maxdorf, 2005, 341 s. ISBN 80-734-5046-1.
- [2] OSADA, Yoshihito a Kanji KAJIWARA. *Gels handbook*. San Diego: Academic Press, c2001. ISBN 01239496454.
- [3] KVÍTEK, L. PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, [online]. 2007. 52 s. [cit. 2014-12-3]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>.
- [4] NOVÁK, Josef a kol. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1 Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 264-506. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [5] KREJČÍ, Jiří. *Kosmetika a kosmetologie*. Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů. FT UTB Zlín. Registrační číslo CZ. 1.07/2.2.00/28.0132.
- [6] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [7] RÄHSE, W. *Design of Skin Care Products, in Product Design and Engineering: Formulation of Gels and Pastes* (eds U. Bröckel, W. Meier and G. Wagner), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2013. DOI: 10, 1002/9783527654741.ch3.
- [8] OTTENBRITE, R. M. *Biomedical Applications of hydrogels handbook*. Springer Science and Business Media, New York, 2010.
- [9] ENAS, M. Ahmad. *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications*. Journal of Advanced Research. Science Direct, [online]. 2013. DOI: 10,1016/j.jare.2013.07.006. [cit. 2014-12-6]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969>.
- [10] HOFFMAN, Allan S. *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews. [online]. 2012, vol 64, s. 18-23. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.010. [cit. 2014-12-6]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002700>.
- [11] ZÁHEJSKÝ, J. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-155-1.

- [12] WILLIAMS, P., HICKEY, M. *Fluid Gels Based on Natural Polymers for Cosmetic Applications*. *Cosmetics & Toiletries® Magazine*, [online]. 2006. [cit. 2014-12-7] Dostupné z:  
<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/viscositymod/2672031.html>.
- [13] HÁDEK, K. *Gely, pokožka a money*. *Časopis Aromaterapie*. Vyd. 1, [online]. 2012. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: [http://www.karelhadek.eu/upload/journal/files/Aromka\\_1\\_2012.pdf](http://www.karelhadek.eu/upload/journal/files/Aromka_1_2012.pdf).
- [14] KNOWLTON, J. and PEARCE, S. *Handbook of cosmetic science and technology*. 1st ed. Oxford, UK: Elsevier Advanced Technology, ©1993, viii, 581 p. ISBN 18-561-7197-3.
- [15] O Carbomeru. *Cosmetics info: The Science & Safety Behind Your Favorite Products*, [online]. 2014. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: <http://cosmeticsinfo.org/ingredient/carbomer-0>.
- [16] Colgate-Palmolive Company. *Gelled organic liquids*. [online]. Inventors: Wesley, John N. Int.Cl. C10L7/04 New York, 15. 10. 1997. EP0580246 B1. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/EP0580246B1?cl=en>
- [17] LOTT J. R., MCALLISTER J. W., ARVIDSON S. A., BATES F. S. and LODGE T. P. *Fibrillar Structure of Methylcellulose Hydrogels*. *Biomacromolecules* [online]. 2013, vol. 14, issue 8, s. 2484-2488. DOI: 10.1021/bm400694r. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400694r>.
- [18] CHEMNET. *Hydroxy Propyl Methyl Cellulose*. Zhejiang Netsun Co., Ltd. [online]. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: <http://www.chemnet.com/dict/dict--9004-65-3--id.html>.
- [19] KIRK, Raymond E. *Encyclopedia of chemical technology*. Vol. 4: Calcium compounds to chloraphenicol. New York: John Wiley & Sons, 1964.
- [20] DESBRIES, J. *Thermogelation of methylcellulose: rheological considerations*. *Polymer*. [online]. 2000. Vol. 41 issue 7, s. 2451-2461. DOI: 10.1016/S0032-2386(99)00413-9. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0032386199004139>.
- [21] GODDARD E., D., GRUBER J., V. *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. New York: Marcel Decker, 1999. ISBN 978-020-3907-948.

- [22] MP Biomedicals. *Carboxymethylcellulose sodium salt*. [online]. ©2014. [cit. 2014-12-15]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02101278&country=56>.
- [23] FELLER, Robert and WILT, M. *Evaluation of cellulose ethers for conservation*. Marina del Rey, Calif., USA: Getty Conservation Institute, ©1990, 161 p. ISBN: 08-923-6099-2.
- [24] KASKOVÁ, Zdeňka. *Antimikrobní látky*. Digitální učební materiály ve škole. Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická. České Budějovice. CZ.1.07/1.5.00/34.0527. [online]. [cit. 2015-03-09] Dostupné z: [http://www.szscb.wz.cz/info/projekty/sablony/oz1/vy\\_32\\_inovace\\_oz1-ka-04.pdf](http://www.szscb.wz.cz/info/projekty/sablony/oz1/vy_32_inovace_oz1-ka-04.pdf).
- [25] SPENCER, J. and Alicia L. RADGOUT DE SPENCER. *Public health microbiology: method and protocols*. Totowa, N. J.: Human Press, ©2004, xvii, 548 p. Methods in molecular biology (Clifton, N. J.), v. 268. ISBN: 15-882-9117-0.
- [26] WILSON, Jennie. *Infection control in clinical practice*. 3rd ed. New Yor: Elsevier, 2006. ISBN: 07-020-2761-8.
- [27] MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Čištění a dezinfekce pokožky*. [online]. 2013. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: [http://www.adera.cz/clanky/dezinfekce/7\\_cisteni-a-dezifekce-pokozky/](http://www.adera.cz/clanky/dezinfekce/7_cisteni-a-dezifekce-pokozky/).
- [28] GRICE, Elizabeth A. and Julia A. SEGRE. *The skin microbiome*. Nature Reviews Microbiology. [online]. 2011, vol. 9, issue 4, s. 244-253. DOI: 10.1038/nrmicro2537. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535073/>.
- [29] HIPLER, U and Peter ELSNER. *Biofunctional textiles and the skin*. New York: Karger, 2006, x, 204 p. ISBN 978-380-5581-219.
- [30] CHILLER, Katarina, Bryan A. SELKIN and George J. MURAKAWA. *Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin*. Journal of investigative Dermatology Symposium Proceedings. [online]. 2001, vol 6, issue 3, s. 170-174. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>.

- [31] GILLASPY, A. F. and J. J. IANDOLO. *Staphylococcus*. Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, [online]. 2009, s. 293. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00237-6. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445002376>.
- [32] DWORKIN, Martin and Stanley FALKOW. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3rd ed. London: Springer, ©2006, v. 1-6. ISBN 978-038-7254-920.
- [33] SHIRTLIFF, Mark and Jeff G. LEID. *The role of biofilms in device-related infections*. Berlin: Springer, ©2009, xii, 269 p. Springer series on biofilms, 3. ISBN 35-406-8119-1.
- [34] ENGELKIRK, Paul G. and Janet L. DUBEN-ENGELKIRK. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology*. Baltimore: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams, ©2008, xiv, 754 p. ISBN 07-817-9701-2.
- [35] DAVIS C., P. *Normal flora*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. [online]. 1996. Chapter 6. [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>.
- [36] VOROBEVA, Lena I. *Propionibacteria*. Boston: Kluwer Academic Publishers, ©1999, xi, 291 p. ISBN 07-923-5884-8.
- [37] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac.* Vyd. Praha: Grada, 2014, 215 s. xxiv s. obr. příl. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.
- [38] PÁNKOVÁ, Růžena. *Komplexní léčba kandidóz*. Urol praxi. Olomouc: Solen, [online]. 2012, 13(5): 209-211. ISSN: 1803-5299. [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/05/05.pdf>.
- [39] WILSON, Michael. *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease*. New York: Cambridge University Press, 2005, xviii, 455 p. ISBN 05-218-4158-5.
- [40] BOEKHOUT, T. *Malassezia and the skin: science and clinical practice*. Heidelberg: Springer, 2010, xi, 319 p. ISBN 36-420-3616-3.
- [41] ANDERSON, E., Bryan. *The Netter collection of medical illustrations*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. 2012. ISBN 978-145-5726-646.

[42] FLANAGAN, Madeleine. *Wound healing and skin integrity: principles and practice*. John Wiley & Sons. 2013, xiii, 298 p. ISBN 978-1-118-44202-9.

[43] MILLER, H., Chris and Charles John PALENIK. *Infection control and management of hazardous materials for the dental team*. 5th ed. St Louis, Mo: Elsevier Mosby, ©2014. ISBN 9780323082570.

[44] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-2380-297-6.

[45] RAJI, Liliam, M. *Antibacterial Hand gel Ingredients*. LIVESTRONG. [online]. 2014. [cit 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.livestrong.com/article/137660-antibacterial-hand-ingredients/>.

[46] HERMAN, A., DOMAGALSKA, B. W., MŁYNARCZYK, A. *Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion*. Indian Journal of Microbiology. 2013, 53(2): 232-237. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0.

[47] TODD, E., C., D., MICHAELS, B., S., HOLAH, J., SMITH, D., GREIG, J., D., BARTLESON, C., A. *Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease*, part 10. Alcohol based antiseptics for hand disinfection and a comparison of their effectiveness with soap. Journal of Food Protection. [online]. 2010, 73 (11), 2128-2140. [cit 2015-04-10]. Dostupné z:

<http://search.proquest.com/docview/763139154?accountid=15518>.

[48] GUILHERMETTI, M., L., A., WIRZLER, M., et al. *Antimicrobial efficacy of alcohol-based hand gels*. Journal of Hospital Infection. 2010, vol. 74, issue 3, p. 219-224. DOI: 10.1016/j.jhin.2009.09.019.

[ 49 ] SMOLINSKÉ, Susan, C. *Handbook of food, Drug and Cosmetic Excipients*. 1. vyd. United States: CRC Press, 1992. ISBN 0-8493-3585-X.

[50] KAMPF, Günter, KRMER, Axel. *Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrub and Rubs*. Clinical Microbiology Reviews. 2004, vol. 17, no. 4, s. 863-893. DOI: 10.1128/CMR.17.4.863-893.2004.

[51] MURAD, Alam and HAYES, B. *Cosmetic dermatology*. Edinburgh: Saunders, 2009. ISBN 978-070-2031-434.

- [52] TUNG, Rebecca, C. and Mark G. RUBIN. *Chemical peels*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders. 2011. ISBN 978-143-7719-246.
- [53] Wuhan Runder Pharmda Technology CO. *DL-mandelic acid*. [online]. 2012. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.pharmnetcn.com/pro-en/id/31.html>.
- [54] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK and M. IDAOMAR. *Biological effects of essential oils- A review*. Food and Chemical Toxicology, 2008. Vol. 46, issue 2, s. 446-475. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [55] BACÍLKOVÁ, Bronislava a Hana PAULUSOVÁ. *Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*. Národní archiv, Praha. 2012. Dostupné z: <http://www.nacr.cz/Z-files/silice/silice.pdf>.
- [56] OHLSSON, Thomas and Nils, BENGTSSON. *Minimal processing technologies in the food industry*. Cambridge: Woodhead Pub, 2002. ISBN 18-557-3547-4.
- [57] DEVI, K. P., NISHA, S. A., SAKTHIVEL, R., PANDIAN, S. K. *Eugenol (An Essential Oil of Clove) Acts as an Antibacterial Agent Against Salmonella Typhi by Disrupting the cellular Membrane*. Journal of Ethnopharmacology. 2010, vol. 130, no. 1, s. 107-115. DOI: 10.1016/j.jep.2010.04.025.
- [58] MOON, Sang-Eun, KIM, Hye-Young, CHA, Jeong-Dan. *Synergistic Effect Between Clove Oil and Its Major Compounds and Antibiotics Against Oral Bacteria*. Archives of Oral Biology. 2011, vol. 56, no. 9, s. 907-916. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.005.
- [59] Eugenol. MP Bimedical. [online]. ©2014. [cit. 2015-04-16]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02151106>.
- [60] UNLU, Gulhan Vardar, UNLU, Mehmet, ERGENE, Emel, Zeytinoglu, Hulya Sivas, VURAL, Nilufer. *Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from Cinnamomum zeylanicum Blume (Lauraceae)*. Food and Chemical Toxicology. 2010, sv. 48, č. 11, s. 3274-3280. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.001.
- [61] HELMENSTINE, A., M. *Chemical Structures Starting with the Letter C: Cinnamaldehyde*. About education. [online]. 2014. [cit. 2015-04-16].
- [62] AHMAD, A., VAN VUUREN, S., VILIOEN, A. *Unravelling the Complex Antimicrobial Interaction of Essential Oils – the Case of Thymus Vulgaris (Thyme)*. MOLECULES. 2014, vol. 19, no. 3, s. 2896-2910. DOI: 10.3390/molecules19032896.

- [63] Thymol. Look For Diagnosis. [online]. ©2014. [cit. 2015-04-16]. Dostupné z: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Thymol&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Thymol&lang=1).
- [64] MILADINOVIĆ, Drogljub, ILIĆ, Budimir, MIHAJLOV-KRSTEV, Tatjana, NIKOLIĆ, Nikola, MILADINOVIĆ, Ljiljana, CVETKOVIĆ, Olga. *Investigation of the Chemical Composition-antibacterial Activity Relationship of Essential Oils by Chemometric Methods*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012, vol. 403, no. 4, s. 1007-1018. DOI: 10.1007/s00216-012-5866-1.
- [65] SAWAMURA, Masayoshi. *Citrus essential oils: flavor and fragrance*. Hoboken, N.J: Wiley, c2010, xii, 398 p. ISBN 04-703-7218-4.
- [66] Limonene. Sigma-Aldrich Co. LLC. [online]. ©2015. [cit. 2015-04-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w504505?lang=en&region=CZ>
- [67] KALEMBA, D., A. KUNICKA. Antibacterial and antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, vol. 10, issue 10, s. 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719.
- [68] TUREK, Claudia and Florian C. STINTZING. *Stability of Essential Oils: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2013. Vol. 12, issue 1, p. 40-53. DOI: 10.1111/1541-4337.12006.
- [69] BOCHŇÁKOVÁ, Eliška. Modifikace antimikrobní složky kosmetických gelů [online]. Zlín, 2014 [cit. 2014-04-16]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí diplomové práce Pavlína Egner.
- [70] Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. CTFA and Colipa. [online]. 2004. [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.packangingconsultancy.com/pdf/cosmeticscolipa-testing-guidelines.pdf>.
- [71] ČSN ISO 2555. Plasty-Pryskyřice v kapalném, emulgovaném nebo disperzním stavu. Stanovení zdánlivé viskozity podle Brookfielda. Praha. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1. 6. 1997. Třídící znak 640340.
- [72] ČSN EN ISO 11930. Kosmetika-Mikrobiologie-Hodnocení antimikrobní ochrany kosmetického výrobku. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1. 6. 2012. Třídící znak 681561.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MC	Methylcelulóza
DS	Stupeň substituce
CMC	Karboxymethylcelulóza
G <sup>+</sup>	Gram-pozitivní bakterie
G <sup>-</sup>	Gram-negativní bakterie
AHA	$\alpha$ -hydroxy kyselina
MAO	Monoaminoxidáza
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
RPM	Počet otáček
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
McF	McFarlandova zákalová stupnice

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Struktura carbomeru [16]</i> .....	16
<i>Obr. 2. Struktura methylcelulózy [18]</i> .....	16
<i>Obr. 3. Struktura karboxymethylcelulózy [22]</i> .....	17
<i>Obr. 4. Obecný vzorec kyseliny mandlové [53]</i> .....	32
<i>Obr. 5. Strukturní vzorec eugenolu [59]</i> .....	34
<i>Obr. 6. Strukturní vzorec cinnamaldehydu [61]</i> .....	34
<i>Obr. 7. Strukturní vzorec thymolu [63]</i> .....	35
<i>Obr. 8. Strukturní vzorec limonenu [66]</i> .....	36
<i>Obr. 9. Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček , 2 skořice, 3 tymián , 4 citron) při 22±2 °C</i> .....	58
<i>Obr. 10. Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček , 2 skořice, 3 tymián , 4 citron)při 37 °C</i> .....	59
<i>Obr. 11 Graf závislosti viskozity na čase při testování gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček , 2 skořice, 3 tymián , 4 citron) při 50 °C</i> .....	60
<i>Obr. 12. Graf závislosti viskozity na čase směsného gelu s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kyselinou mandlovou při 22±2 °C</i> .....	61
<i>Obr. 13. Graf závislosti viskozity na čase směsných gelů s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron)a kyselinou mandlovou při 37 °C</i> .....	62
<i>Obr. 14. Graf závislosti viskozity na čase směsných gelů s esenciálním olejem (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron)a kyselinou mandlovou při 50 °C</i> .....	62
<i>Obr. 15. Antimikrobní účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) na počátku testování</i> .....	63
<i>Obr. 16. Inhibiční účinky gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 56. den při 22±2 °C</i> .....	64
<i>Obr. 17. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 7. den při 37 °C</i> .....	65
<i>Obr. 18. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 28. den při 37 °C</i> .....	65
<i>Obr. 19. Inhibiční účinky gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 56. den při 37 °C</i> .....	66

<i>Obr. 20. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 7. den při 50 °C .....</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 21. Inhibiční účinnost gelů s esenciálními oleji (1 hřebíček, 2 skořice, 3 tymián, 4 citron) 28. den při 50 °C .....</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 22. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 0. den při 22±2 °C .....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 23. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 56. den při 22±2 °C .....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 24. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 7. den při 37 °C .....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 25. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 28. den při 37 °C .....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 26. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 56. den při 37 °C .....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 27. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 7. den při 50 °C .....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 28. Inhibiční účinnost směsných gelů s esenciálními oleji (A hřebíček, B skořice, C tymián, D citron) a kys. mandlovou 21. den při 50 °C .....</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 29. Připravené gely zleva s hřebíčkovým, skořicovým, tymiánovým esenciálním olejem .....</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 30. Připravené směsné gely s kys. mandlovou a zleva s hřebíčkovým, skořicovým, tymiánovým a citronovým esenciálním olejem .....</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 31. Změny barvy gelu s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C) .....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 32. Změny barvy gelu s přidavkem skořicového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C) .....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 33. Změny barvy gelu s přidavkem tymiánového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C) .....</i>	<i>79</i>
<i>Obr. 34. Změny barvy gelu s citronovým esenciálním olejem 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C) .....</i>	<i>80</i>
<i>Obr. 35. Změny barvy směsného gelu s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva 22±2 °C, 37 °C a 50 °C) .....</i>	<i>81</i>

- Obr. 36. Změna barvy směsného gelu s přidavkem skořicového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C) ..... 82*
- Obr. 37. Změna barvy směsného gelu s přidavkem tymiánového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích teplotách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C) ..... 82*
- Obr. 38. Změna barvy směsného gelu s přidavkem citronového esenciálního oleje 56. den při různých skladovacích podmínkách (zleva  $22\pm 2$  °C, 37 °C a 50 °C)..... 83*

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1a. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace rostlinných esenciálních olejů a jejich hlavní účinné látky [56, s. 135] .....</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 2. Složení gelu s esenciálním olejem .....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 3. Složení směsného gelu .....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 4. Složení Mueller Hinton agaru No. 2.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 5. Složení Chloramphenicol Yeast Glucose Agar.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 6. Složení Nutrient agaru.....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 7. Složení Nutrient Broth .....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 8. Složení Malt Extract Broth Base .....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 9. Hodnoty pH gelů v různých teplotních režimech.....</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 10. Hodnoty pH gelů v různých teplotních režimech.....</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 11. Vyhodnocení doplňkové metody gelů na počátku experimentu .....</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 12. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 22±2 °C.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 13. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 37 °C.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 14. Vyhodnocení doplňkové metody vzorků gelů poslední den experimentu při 50 °C.....</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 15. Vyhodnocení testování mikrobiální čistoty gelů.....</i>	<i>86</i>