

Kosmetické přípravky s antimikrobiálním účinkem

Bc. Vladimíra Šístková

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Vladimíra Šístková
Osobní číslo:	T20008
Studijní program:	N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Kosmetické přípravky s antimikrobiálním účinkem

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o antimikrobiálních látkách použitelných v kosmetických přípravcích, zaměřte se na esenciální oleje a další látky vhodné ke kombinaci.
2. Popište zdravou a patogenní mikroflóru kůže, zaměřte se na kůži obličeje.
3. Shrňte možnosti léčby akné.
4. Experimentálně připravte modelové vzorky různých kosmetických přípravků s přídatkem esenciálních olejů či dalších látek.
5. Proveďte základní fyzikálně-chemickou charakteristiku připravených systémů.
6. Stanovte jejich antimikrobiální účinnost vůči vybraným bakteriím a kvasinkám.
7. Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry.

Seznam doporučené literatury:

- [1] ASBAHANI, A. EI, K. MILADI, W. BADRI, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, 483(1-2), 220-243. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- [2] BENSON, Heather A. E. *Cosmetic formulation: principles and practice*. Boca Raton, Florida: CRC Press, [2019], 1 online zdroj (xvi, 479 stran). Dostupné z: doi:9780429529085.
- [3] DRAELOS, Zoe Kececioğlu, ed. *Cosmetic dermatology: products and procedures*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010, xvi, 532 s. Dostupné z: doi:9781444317657.
- [4] DRÉNO, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2017, 31, 8-12. ISSN 09269959. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.14374.
- [5] MARTINS, Isabel M., Maria F. BARREIRO, Manuel COELHO a Alírio E. RODRIGUES. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2014, 245, 191-200. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.02.024.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Kosmetické přípravky s antimikrobiálními účinky přírodního původu získávají stále více na popularitě. Diplomová práce se zabývá antimikrobiální aktivitou vybraných esenciálních olejů a kyseliny mandlové v emulzích. V teoretické části je charakterizován mikrobiom zdravé a patogenní kůže obličeje se zaměřením na možnosti léčby akné. V praktické části byla vyrobena emulze a do jednotlivých vzorků byly zakomponovány vybrané esenciální oleje a kyselina mandlová. Jejich inhibiční účinky byly ověřeny v testu přežití mikroorganismů. Dále byl na kůži dobrovolníků posuzován vliv emulzí na změny hydratace, transepidermální ztrátu vody a pH v průběhu času. Na závěr proběhla senzorická analýza emulzí vyhodnocená statistickými metodami.

Klíčová slova: esenciální olej, kyselina mandlová, mikroorganismy

ABSTRACT

Cosmetics with antimicrobial effects of natural origin are gaining more and more popularity. The diploma thesis deals with the antimicrobial activity of selected essential oils and mandelic acid in emulsions. The theoretical part characterizes the microbiome of healthy and pathogenic facial skin with a focus on acne treatment options. In the practical part, an emulsion was made and selected essential oils and mandelic acid were incorporated into individual samples. Their inhibitory effects were verified in a microorganism survival test. Furthermore, the effect of the emulsions on hydration changes, transepidermal water loss and pH over time was assessed on the skin of the volunteers. Finally, sensory analysis of emulsions evaluated by statistical methods was performed.

Keywords: essential oil, mandelic acid, microorganisms

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za její cenné rady a inspirativní nápady a především za její čas, ochotu, vstřícnost a trpělivost. Také děkuji Ing. Pavlíně Egner, Ph.D. a Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D. za pomoc a organizaci práce na Ústavu kosmetiky.

Ještě bych ráda poděkovala svým rodičům a především své dceři a svému příteli, kteří mě po celou dobu podporovali a pomáhali mi.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KŮŽE JAKO BIOLOGICKÁ STRUKTURA	12
1.1 KŮŽE OBLIČEJE	13
1.2 MIKROFLÓRA KŮŽE	14
1.2.1 Zdravá mikroflóra kůže.....	15
1.2.2 Patogenní mikroflóra kůže	15
1.3 AKNÉ	16
1.3.1 Léčba akné	16
2 LÁTKY S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM POUŽITELNÉ V KOSMETICE	19
2.1 MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK	19
3 ESENCIÁLNÍ OLEJE	21
3.1 ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	21
3.1.1 Lisování.....	21
3.1.2 Parní destilace	22
3.1.3 Frakcionace	23
3.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	23
3.3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	24
4 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	27
4.1 FORMY KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	27
4.1.1 Roztoky	27
4.1.2 Lotiony	27
4.1.3 Emulze.....	28
4.1.4 Gely	28
4.1.5 Pěny.....	28
5 CÍLE PRÁCE	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
6 MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ, VZORKY	31
6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	31
6.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	32
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY.....	33
6.3.1 Fyziologický roztok	33
6.3.2 Nutrient agar.....	33
6.3.3 Mueller Hinton agar	33
6.3.4 RCA agar.....	33
6.3.5 Sabouraud agar.....	34

6.4	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	34
6.4.1	Grampozitivní bakterie.....	34
6.4.2	Gramnegativní bakterie	34
6.4.3	Kvasinky	34
7	METODY	35
7.1	PŘÍPRAVA SUSPENZÍ MIKROORGANISMŮ	35
7.2	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA	35
7.3	PŘÍPRAVA EMULZÍ	37
7.4	TEST PŘEŽÍVÁNÍ BAKTERIÍ V EMULZI	38
7.5	KOŽNÍ TESTY	40
7.5.1	Corneometrické měření	41
7.5.2	Měření TEWL	42
7.5.3	Měření pH	42
7.6	SENZORICKÉ TESTY	43
7.6.1	Pořadové zkoušky	43
7.6.2	Párová zkouška.....	44
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
8.1	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	46
8.2	KOŽNÍ TESTY	49
8.2.1	Hydratace pokožky.....	49
8.2.2	Transepidermální ztráta vody (TEWL).....	53
8.2.3	pH pokožky	56
8.3	TEST PŘEŽÍVÁNÍ BAKTERIÍ V EMULZI.....	60
8.4	VYHODNOCENÍ SENZORICKÉHO MĚŘENÍ	63
8.4.1	Pořadová zkouška na roztíratelnost.....	63
8.4.2	Pořadová zkouška preference konkrétního vzorku	64
8.4.3	Párová zkouška vstřebatelnosti	65
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	76
	SEZNAM PŘÍLOH.....	77

ÚVOD

Kosmetický průmysl je jedno z nejrychleji se rozvíjejících odvětví a každý rok se na trhu objevují nové výrobky. Spotřebitelé se v posledních letech stále více zaměřují na enviromentální problematiku a reagují na nové trendy přírodní, tzv. zelené kosmetiky. Mezi uživateli se zároveň zvyšují případy alergických reakcí na suroviny syntetického původu použité v kosmetických přípravcích. Rozporuplnými prostředky jsou zejména konzervační látky, které jsou na jedné straně nezbytnými pro antimikrobiální ochranu kosmetických výrobků, na druhé straně jsou velkým zdrojem alergií a některé jsou i v podezření z karcinogenních účinků. Existuje řada studií, které naznačují, že za zdravotními problémy mohou stát škodlivé účinky konzervantů, přestože jsou v kosmetice mezi povolenými látkami a to i přesto, že jsou používány v nízkých koncentracích. I z tohoto důvodu se vývojová oddělení kosmetických firem snaží hledat řešení, která by byla účinná a zároveň co nejméně škodlivá jak pro spotřebitele, tak pro životní prostředí.

V přírodě existuje obrovské množství látek, u kterých se na základě prováděných studií odhalují nové rozmanité účinky, jak antimikrobiální, tak antioxidační, antivirové a další. Většina těchto účinků je připisována sekundárním metabolitům, produkovaných rostlinami. Jedná se zejména o fenolické látky, které slouží jako obrana proti býložravým predátorům, ale také k přilákání hmyzu za účelem opylení. U mnohých těchto látek byla zjištěna silná antimikrobiální aktivita. Mezi nejznámější sekundární metabolity rostlin patří esenciální oleje.

Esenciální oleje byly pro své terapeutické účinky používány po staletí. Dnešní věda dokáže identifikovat stovky složek obsažených v těchto olejích. Nicméně mnohé z těchto sloučenin se v přírodních produktech nachází pouze ve stopovém množství a jejich synergický účinek nelze nahradit průmyslovou výrobou jednotlivých složek.

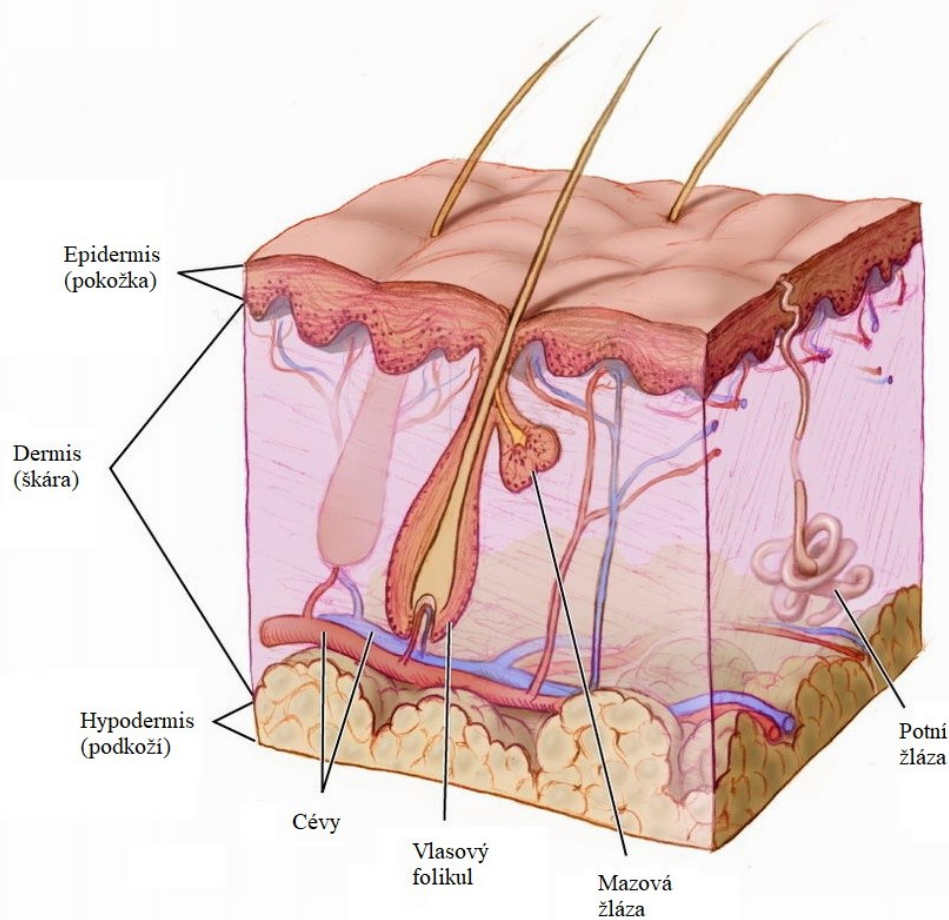
Tato diplomová práce se zaměřuje na zhodnocení antimikrobiálních účinků vybraných esenciálních olejů na růst mikroorganismů, jak v jejich neředěné formě, tak zakomponovaných do emulze. Jako další antimikrobiální látka byla použita kyselina mandlová, která se řadí mezi hydroxykyseliny a díky svému složení je schopna potlačovat projevy akné. Ve vzorcích emulzí byly použity kombinace esenciálních olejů a kyseliny mandlové a jejich vliv na stav pokožky z hlediska hydratace, transepidermální ztráty vody a změny pH byl hodnocen pomocí kožních testů, provedených na dobrovolnících. Poté byly vzorky vyhodnocovány posuzovateli z hlediska jejich sensorického vnímání. Nejpřínosnější částí bylo měření přežívání životaschopných mikroorganismů v emulzích.

Diplomová práce se svým zaměřením snaží získat empirická data inhibice růstu mikroorganismů v emulzích přírodními produkty rostlin a přispět tak ke studiu těchto látek využitelných v kosmetických formulacích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE JAKO BIOLOGICKÁ STRUKTURA

Kůže je jedním z největších orgánů lidského těla. Pokrývá celý jeho povrch a vykonává především funkci hraniční bariéry mezi vnitřním prostředím organismu a vnějším okolím. Zaujímá plochu 1,5 – 2 m² v závislosti na výšce a konstituci jedince. Je nositelem celé řady dalších funkcí. Kromě zmiňované fyzikální bariérové funkce je to i bariéra chemická a biologická, chránící organismus před nepříznivými vlivy látek a patogenních mikroorganismů. Neméně důležitá je její funkce metabolická, regulační, sekreční, imunologická, sensorická, depotní a v neposlední řadě i funkce psychosociální [1, s. 15, 23-25, 27]. Tloušťka kůže je dle anatomické lokalizace rozdílná, od 0,5 mm na očních víčkách až po cca 4 mm v dlaňoploskových oblastech. Kůže (*integumentum commune*) se skládá ze tří základních vrstev (Obrázek 1) – pokožky (*epidermis*), škára (*coria, dermis*) a podkoží (*tela subcutanea, hypodermis*). Součástí kůže jsou kožní adnexa, mezi něž patří vlasy, nehty, mazové a potní žlázy [2, s. 200, 201].



Obrázek 1 Struktura kůže [3, upraveno].

Struktura *epidermis* je charakterizována jako vícevrstevný dlaždicový epitel ektodermálního původu různě diferencovaných keratinocytů. Proces keratinizace buněk začíná ve *stratum basale*, kde trvale mitoticky aktivní vrstva bazálních buněk produkuje dceřiné buňky, které podléhají epidermální diferenciaci. Ve *stratum spinosum* se nachází polyedrické keratinocyty obsahující cytokeratinová filamenta, která jsou pevně svázána a zakotvena v desmozomech [4, s. 14]. Ve *stratum granulosum* dochází ke vzniku keratohyalinových granulí, tvořených profilagrinem a k dokončení keratinizačního procesu [4, s. 15]. V nejsvrchnější vrstvě zvané *stratum corneum* se keratinocyty mění na korneocyty, odumřelé buňky sestávající z keratinu a buněčných stěn bez jader. Kromě keratinocytů se v *epidermis* nacházejí také melanocyty, syntetizující melanin, antigen prezentující Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky, které fungují jako mechanoreceptory [5, s. 4].

Hlavní strukturální součástí kůže je *dermis*, skládající se z papilární a retikulární vrstvy. Převládajícími buňkami jsou fibroblasty, které jsou zodpovědné za syntézu kolagenu a elastinu. Základní substancí *dermis* je amorfní hmota, která vyplňuje mezibuněčné prostory. Je složena z glykosaminoglykanů a kyselých mukopolysacharidů, které poskytují kůži viskozitu a hydrataci [5, s. 8]. Nachází se zde nervová vlákna, vlasové folikuly, mazové a potní žlázy a bohaté cévní zásobení [1, s. 18].

Hypodermis je nejhluběji uloženou kožní vrstvou, tvoří ji vazivová a tuková tkáň. Základními stavebními buňkami podkožního tuku jsou adipocyty. Tloušťka podkožního tuku je variabilní, ovlivňuje ji především výživa, hmotnost jedince a anatomická lokalizace. Nejvíce se podkožní tuk ukládá na břicho, hýždích a stehnech, kde plní jednak ochrannou funkci hlouběji uložených orgánů, jednak funkci energetického rezervoáru [1, s. 19].

1.1 Kůže obličeje

Obličej a jeho kůže odráží nejen naše emoce, ale i celkový stav tělesného a duševního zdraví. Je zde umístěno sídlo všech smyslů – zrak, sluch, čich, chuť i hmat. Kůže obličeje včetně mazových žláz je osídlena symbiotickou i fakultativně patogenní flórou [6, s. 13].

Kůže obličeje a krku má oproti ostatním tělesným oblastem relativně rychlý čas obratu *epidermis*. V případě zdravé tkáně se jedná jen o přibližně sedm dní oproti obecně udávaným 28-30 dnům na ostatním tělesném povrchu, z čehož vyplývá skutečnost, že rohová vrstva je zde výrazně tenčí a bariérová funkce je prokazatelně omezená. Svědčí pro to i vysoké hodnoty transepidermální ztráty vody (TEWL – Transepidermal Water Lose), které jsou srovnatelné s hodnotami u deskvamujících chronických dermatóz [4, s. 24].

Kůže obličejů u člověka, bez ochranné srsti jako u ostatních savců a nekrytá oděvem jako ostatní místa, je denně vystavována vlivům zevního prostředí, což sebou nese zvýšenou citlivost. Pokud se v obličejích vyskytuje jakákoliv chronická dermatóza, působí často tyto vlivy jako spouštěče [6, s. 13-14].

1.2 Mikroflóra kůže

Trvalé osídlení člověka mikrobiální flórou je nezbytnou podmínkou jeho vývoje a zdraví. Největší část bakterií osidluje zažívací trakt, zejména střevo, menší část pak kůži, ústní dutinu, horní cesty dýchací, vagínu a oko. Složení fyziologické bakteriální flóry se v různých lokalitách těla zásadně liší a je závislé na věku, dietě, úrovni hygieny, geografické lokalitě a řadě dalších faktorů [7, s. 123].

Lidská kůže je domovem velkých a rozmanitých populací bakterií, virů a hub, které společně tvoří kožní mikroflóru. Nedávné studie zabývající se zkoumáním funkcí kožního mikrobiomu odhalily silný symbiotický vztah mezi mikroflórou kůže a organismem jedince. Dysbióza mikrobiomu a další faktory ovlivňují povrchovou mikroflóru a mohou ovlivnit homeostázu a funkci keratinocytů [8].

Bakteriální buňka je od okolí ohraničena cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou s peptidoglykanem, jejíž stavba umožňuje rozdělení bakterií na grampozitivní a gramnegativní [7, s. 15]. Rozlišení G^+ a G^- bakterií je prováděno pomocí diagnostického Gramova barvení, kdy u G^+ bakterií zůstává krystalová violet v komplexu s jódem vázána v buňce a díky silné stěně není vyplavena při odbarvování acetonem.

Peptidoglykan tvoří u G^+ bakterií asi 20 nm silnou vrstvu, kterou kolmo probíhají řetězce kyseliny teikoové a lipoteikoové spojené s cytoplazmatickou membránou [7, s. 23, 25]. Teikoová kyselina je kovalentně navázána na kyselinu muramovou, tj. glukosamin spojený etherovou vazbou s kyselinou mléčnou.

Na rozdíl od grampozitivních bakterií je buněčná stěna gramnegativních bakterií podstatně tenčí, ale složitěji uspořádaná. Skládá se z vnější membránové vrstvy a vnitřní tenké peptidoglykanové vrstvy [9, s. 32]. Vnější třívrstevná membrána obsahuje proteiny, lipopolysacharidy a lipoproteiny [11, s. 15]. Mezi vnější membránou a peptidoglykanovou vrstvou je periplazmatický prostor, který je tvořen hydrolytickými enzymy a metabolity. Obsah lipidů v buněčné stěně umožňuje bakteriální buňce zvýšenou odolnost vůči aniontovým povrchově aktivním látkám. Termostabilní lipopolysacharidové komplexy

fungují jako endotoxiny, které působí jako velmi silný antigen a při masivním uvolnění mohou způsobit systémovou zánětlivou odpověď organismu až toxický šok [9, s. 32, 33].

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotické organismy, které jsou řazeny mezi houby (*Fungi*), tvoří však jednotnou taxonomickou skupinu [9, s. 45].

Kvasinkové mikromycety jsou jednobuněčné organismy, které mají převážně tvar kulatých, oválných, případně protáhlých buněk o velikosti cca 3-15 μm . Mezi lékařsky významné patří zejména rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* a *Malassezia* [10, s. 301].

1.2.1 Zdravá mikroflóra kůže

Pokožka poskytuje rozmanité mikroprostředí, které se liší kyselostí, teplotou, vlhkostí a obsahem kožního mazu. Na kůži se nachází průměrně kolem 2 000 aerobních bakterií na 1 cm^2 , ve vlhkých nebo zapařených kožních záhybech je ale na 1 cm^2 i více než 80 000 bakterií. Bakterie se nacházejí jak na povrchu, tak i v hlubších vrstvách pokožky, zejména ve vlasových folikulech, v mazových a potních žlázách, kde umožňují přežívání anaerobních bakterií [7, s. 129-130]. Například druhy *Cutibacterium* jsou dominantní v mazových oblastech, zatímco *Staphylococcus* a *Corynebacterium* jsou nejhojnějšími druhy kolonizujícími vlhké oblasti. Suchá místa jsou domovem smíšené populace mikroorganismů, kterým dominují gramnegativní bakterie [8]. Hlavní složkou normální mikroflóry na zdravé lidské kůži je *Staphylococcus epidermidis* [12].

Na kůži a většině sliznic brání fyziologická bakteriální flóra usídlení patogenů. Mechanismem této ochrany je jednak kompetice o živiny, jednak zábrana usídlení patogenů z důvodu obsazení povrchu fyziologickou flórou. Bakterie rezidentní komenzální mikroflóry produkují antimikrobiální peptidy, které jsou hlavními přispěvateli k imunitní obraně. Kromě kožních žláz produkují i některé bakterie kyselé substance, což vede k nízkému pH pokožky, pohybující se v rozmezí 4,2 až 5,5, které pak tvoří chemickou ochrannou bariéru [7, s. 78, 79, 130]. Také lysozym produkovaný mimo keratinocyty též stafylokoky působí nepříznivě hlavně na gramnegativní bakterie [12].

1.2.2 Patogenní mikroflóra kůže

Narušení normální kožní mikrobiální flóry, ať už topickými čisticími prostředky, poraněním nebo systémovou expozicí antibiotikům, může narušit imunitní obranu kůže. Nerovnováha

mikroorganismů, zvaná dysbióza, provází řadu neinfekčních kožních onemocnění, jako je akné vulgaris, atopická dermatitida, psoriáza a rosacea [12].

Z mnoha kožních onemocnění je bakteriální původ významný hlavně u těch, která se projevují hnisáním nebo vředy. Jejich původci bývá nejčastěji *Staphylococcus aureus*, způsobující kožní abscesy [7, s. 178]. Také v suchých částech kůže pacientů s atopickou dermatidou je *S. aureus* častěji detekován [13].

Streptococcus pyogenes je samostatně nebo v kombinaci s bakterií *S. aureus* původcem impetiga, vysoce nakažlivé bakteriální kožní infekce, která se nejčastěji vyskytuje u malých dětí [14].

Velmi nebezpečná je infekce popálenin vyvolaná *Pseudomonas aeruginosa*. Benigní, ale nepříjemná, je infekce mazových žláz, akné, způsobená zvýšenou kolonizací *Cutibacterium acnes* [7, s. 178].

1.3 Akné

Dle současných studií je akné výsledkem několika patogenetických faktorů. Jedná se o hormonálně podmíněnou zvýšenou tvorbu mazu (seborea), folikulární retenční hyperkeratózu, zvýšenou kolonizaci *Cutibacterium acnes* a imunopatologický zánět. Seborea a zvýšená keratinizace folikulárního epitelu vytvářejí příznivé prostředí pro přemnožení kutibakterií, které patří k rezidentní kožní mikroflóře a za normálních okolností nejsou patogenní. Akné se projevuje komedony, papulami, pustulami, noduly, změnou pigmentace a jizvami. Lokalizací je oblast kůže se zvýšeným výskytem mazových žláz. Nejčastěji bývá postižen obličej, méně často záda, hrudník a oblast ramen. Dle věku postižených se akné dělí na novorozeneckou akné, dětskou akné, předpubertální akné, akné dospívajících a akné dospělých. Nejčastěji se ovšem vyskytuje v pubertálním období a mladším dospělém věku [6, s. 22, 24, 31].

1.3.1 Léčba akné

Před rozhodnutím o tom, jaké prostředky budou k léčbě akné zvoleny, je nutno vzít v úvahu závažnost kožních projevů, věk pacienta a jeho kvalitu života. Hlavními cíli léčby akné jsou zhojení existujících lézí, prevence jizvení a potlačení tvorby nových klinických lézí. Vzhledem k chronické povaze onemocnění se jedná o kombinaci léčby lokální, systémové i fyzikální. [6, s. 44-46].

Díky své multifaktoriální patogenitě se k potlačení progresu akné používají různá léčiva, od regulátorů produkce kožního mazu, keratolytik, nesteroidních protizánětlivých léků až po antibiotika [15]. K nejvíce osvědčeným lokálním lékům se řadí retinoidy, kyselina azelaová, antibiotika a benzoylperoxid [6, s. 47].

Retinoidy

Jedná se o deriváty vitamínu A v dnešní době existují již tři generace léků. Účinnými látkami jsou například tretinoin, izotretinoin, acitretin, adapalen aj. [16]. Mají účinky především komedolytické, keratolytické a některé i mírně protizánětlivé a sebestatické. Uplatňují se také v kombinaci s řadou lokálních i celkových léčiv. Nevýhodou jsou jejich nežádoucí vedlejší účinky jako zarudnutí, svědění, pálení [6, s. 47]. Také je nesmí užívat těhotné ženy, neboť je zde velmi vysoké riziko vzniku vrozených vad. Dále se diskutuje o jejich možném riziku rozvoje neuropsychiatrických poruch [17].

Kyselina azelaová

Je to organická dikarboxylová kyselina, která je přirozeně produkována některými druhy kvasinek (*Pityrosporum ovale*) žijícími na normální, zdravé kůži. Kyselina azelaová je známá svými protizánětlivými a antibakteriálními účinky vůči bakteriím *Cutibacterium acnes* infikujícím kožní póry. Klinický výzkum ukázal, že je dobře snášena většinou pacientů, nevykazuje toxicitu a není teratogenní ani mutagenní [18].

Benzoylperoxid

Poprvé byl syntetizován v polovině 19. století, ale jako lék proti akné si našel cestu do farmakoterapie až v polovině 20. století. Je k dispozici ve formě gelů, mastí a mycích prostředků. Často se používá v kombinaci s retinoidy nebo antibiotiky. Zejména kombinace s antibiotiky je klíčovým prvkem topické léčby akné, neboť baktericidní účinek benzoylperoxidu může synergicky zabránit bakteriální rezistenci vůči antibiotikům. Jeho terapeutickou hodnotu snižuje možnost výskytu erytému a fototoxické reakce [19].

Esenciální oleje

Většina rostlin produkuje sekundární metabolity, které slouží buď jako ochrana proti býložravcům nebo naopak pro přilákání opylujícího hmyzu. Jedná se o těkavé terpenické sloučeniny, které mohou mít celou řadu terapeutických účinků pro člověka.

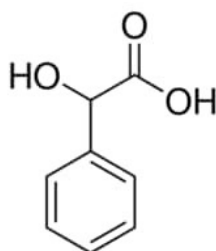
K doplňkové léčbě akné je možné využít esenciální olej získávaný ze stromu *Melaleuca alternifolia*, známý jako tea tree olej. Má širokospektrální antimikrobiální aktivitu prostřednictvím nesespecifického poškození buněčné membrány bakterií. Dle jednorázové

srovnávací studie I. B. Bassett *et al.* (1990) byl 124 účastníkům s mírným až středně závažným akné aplikován buď 5% čajovníkový olej nebo 5% benzoylperoxid. Při obou léčbách došlo k významnému snížení zánětlivých a komedonních lézí. Tea tree olej měl pomalejší nástup účinku, ale lepší snášenlivost než benzoylperoxid. Nicméně je kvůli slabým klinickým výsledkům potřeba provést další studie [20].

Kyselina mandlová

Akné a jeho projevy mohou být korigovány látkami s keratolytickým efektem. Ovocné kyseliny se vyznačují exfoliačním působením v oblasti *epidermis*. Nejčastěji používanými ovocnými kyselinami v dermatologii a kosmetologii je kyselina glykolová, kyselina mléčná a kyselina mandlová. Jedná se o aromatickou α -hydroxykarboxylovou kyselinu (kyselina fenylglykolová). Původně byla získávána kyselou hydrolyzou z amygdalinu, který se nachází v extraktu hořkých mandlí. V současné době je kyselina mandlová syntetizována chemickou cestou z benzaldehydu a kyanovodíku. Je známo, že kyselina mandlová je účinná proti několika druhům bakterií a byla používána k léčbě močového ústrojí a kožních infekcí. Inhibiční účinky při 1% koncentraci byly zjištěny u gramnegativních bakterií *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. V ještě nižší koncentraci (0,25 %) účinkovala proti grampozitivním bakteriím *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* [21].

Jedna molekula kyseliny mandlové (Obrázek 2) obsahuje osm atomů uhlíku ($C_8H_8O_3$) na rozdíl od kyseliny glykolové, která má jen dva atomy uhlíku. To dává kyselině mandlové specifické terapeutické vlastnosti. Díky velké molekule se kyselina mandlová vstřebává do pokožky velmi pomalu a tím je méně dráždivá než kyselina glykolová. Existuje ve dvou optických enantiomerech, které určují její farmakologické vlastnosti. Její vlastnosti ji předurčují k použití jako součásti chemických peelingů. Je schopna regulovat tvorbu kožního mazu, a proto bývá doplňkovou léčbou akné. Také se využívá pro své velmi dobré výsledky při léčbě nadměrné keratózy, hyperpigmentace a k potlačení drobných vrásek, způsobených stárnutím pokožky slunečním zářením [22].



Obrázek 2 Kyselina mandlová [23].

2 LÁTKY S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM POUŽITELNÉ V KOSMETICE

Základní vlastností antimikrobiálních látek je selektivní toxicita. Selektivně toxická látka je taková látka, která zabíjí nebo inhibuje mikroorganismus v dávkách, které ještě nepoškozují makroorganismus. Rozlišují se dva druhy účinku:

- baktericidní – ireverzibilní proces, který vede k usmrcení mikroorganismu,
- bakteriostatický – reverzibilní proces, který zastavuje růst a množení mikrobů.

Antimikrobiální látky, jako jsou antibiotika, cílí na několik zásadních procesů a struktur v buňce mikroorganismu. Jedná se zejména o inhibitory syntézy buněčné stěny, inhibitory syntézy nukleových kyselin, inhibitory funkcí buněčné membrány, inhibitory proteosyntézy a inhibitory syntézy kyseliny listové. Účinnost antimikrobiálních látek se určuje v *in vitro* podmínkách laboratorními testy. Je určena dvěma hodnotami:

- minimální inhibiční koncentrací (MIC), tj. určením nejnižší koncentrace antimikrobiální látky tlumící viditelný růst bakterií,
- minimální baktericidní koncentrací (MBC), což znamená určení nejnižší koncentrace, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace bakterií [10, s. 426-428].

2.1 Mechanismus působení antimikrobiálních látek

Antimikrobiální účinnost a fyzikálně-chemickou stabilitu antimikrobiálních látek ovlivňuje řada faktorů, jako je rozpustnost, typ emulze olej ve vodě (O/V) nebo voda v oleji (V/O), pH formulace, teplota během použití a těkavost konzervantu. Ideální konzervační prostředek by měl být stabilní, kompatibilní s ostatními složkami, účinný při nízkých koncentracích, netoxický a cenově přijatelný.

Na rozdíl od antibiotik, která působí na specifická místa biosyntetických procesů mikroorganismů, působí konzervanty na více cílů.

Syntetické antimikrobiální látky

Organické kyseliny snižují pH kosmetického přípravku, které je pak nepříznivé pro růst mikroorganismů. Mechanismus účinku alkoholů a fenolů souvisí s denaturací proteinů a má tak baktericidní účinek. Je ale nutné použít vysokou koncentraci. V nízkých koncentracích

mohou benzylalkohol a fenoxylethanol vyvolávat lýzu cytoplazmatické membrány u bakterií. Parabeny inhibují syntézu proteinů, syntézu DNA a RNA a narušením membrány zapříčiňují únik cytoplazmatického obsahu buňky do okolního prostředí. Látky uvolňující formaldehyd mají biocidní účinek díky síťování a agregaci proteinů, které vede k inhibici metabolismu a buněčného dělení. Isothiazolinony jsou oxidační činidla a mají za následek inhibici metabolismu enzymů a také dysfunkci strukturálních proteinů v buněčné stěně a membráně. Kwartérní amoniové sloučeniny uplatňují svou antimikrobiální aktivitu destabilizací lipidové dvojvrstvy plazmatických membrán bakterií nebo kvasinek a vnější membrány gramnegativních bakterií prostřednictvím asociace pozitivního náboje kvartérního dusíku s hlavními polárními skupinami záporně nabitých fosfolipidů [24].

Přírodní antimikrobiální látky

Kosmetický a farmaceutický průmysl mají rostoucí zájem o nahrazení syntetických antimikrobiálních látek v topických produktech. Kromě rostoucího zájmu spotřebitelů o přírodní látky roste mikrobiální rezistence vůči konvenčním konzervantům. Jako obranný mechanismus před býložravými predátory syntetizují rostliny fenolové sloučeniny. Tyto sloučeniny mohou interagovat s buněčnou stěnou nebo membránou mikroorganismů, což vede ke změně permeability a následné destrukci buněk. Fenolické látky také mohou pronikat do bakteriálních buněk a podporovat koagulaci jejich obsahu [25].

Ve studii (Anna Hermanova *et al.* 2012) bylo zjištěno, že všechny testované esenciální oleje (*Lavandula officinalis*, *Melaleuca alternifolia* a *Cinnamomum zeylanicum*) o koncentraci 2,5 % vykazovaly silnější antimikrobiální aktivitu než methylparaben v 0,4% koncentraci. Testovanými mikroorganismy byly *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Skořicový olej se ukázal jako nejúčinnější inhibitor růstu mikroorganismů. U všech testovaných emulzí s esenciálními oleji i s methylparabenem byla prokázána nejslabší antimikrobiální aktivita proti *Pseudomonas aeruginosa*. Antimikrobiální působení esenciálních olejů v kosmetických formulacích bylo nižší než v podmínkách *in vitro*. Je známo, že antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je mnohem slabší než syntetických konzervačních látek, a proto je nutné je do kosmetiky přidávat ve větším množství. Použití vysokých koncentrací esenciálních olejů může způsobit podráždění pokožky a alergie uživatelů. Navíc je takové složení vyloučeno z důvodu příliš intenzivní vůně produktu. Avšak doplnění směsí esenciálních olejů v nízkých koncentracích syntetickým konzervantem zamezuje růstu i těch nejodolnějších mikroorganismů a zároveň snižuje dávku syntetického konzervantu 8,5 x než je doporučena výrobcem [26].

3 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje jsou komplexní směsi těkavých sloučenin produkované rostlinami. Existuje nespočetné množství jednotlivých látek a rozsáhlé variace ve složení esenciálních olejů. Mnohé z těchto těkavých látek zastávají různorodé funkce. Mohou působit jako obranné látky proti býložravcům, ale také k přilákání opylujícího hmyzu.

Všechny rostliny mají v zásadě schopnost produkovat těkavé sloučeniny, poměrně často však pouze ve stopovém množství. Esenciální oleje jsou tvořeny především v sekrečních idioblastech, dutinách nebo žláznatých trichomech. Silice mohou mít v různých částech rostliny odlišné složení. Tento fytochemický polymorfismus je možné také nalézt při srovnávání složení silic jednotlivých chemotypů rostlinných druhů na základě genetického pozadí [27, s. 43, 44].

Esenciální oleje se staly nedílnou součástí každodenního života. Používají se v kosmetickém průmyslu, jsou nedílnou složkou parfémů, ale také třeba jako dochucovadla potravin. Uplatnění nacházejí v aromaterapii, farmacii, při masážích. V nedávných letech probíhaly výzkumy uplatnění esenciálních olejů jako biocidů a repelentů s důrazem na jejich antimikrobiální potenciál [27, s. 127].

3.1 Získávání esenciálních olejů

Prof. Gerhard Buchbauer z Institutu farmaceutické chemie vídeňské univerzity stanovil definici esenciálních olejů jako více či méně těkavé látky s více či méně vonným účinkem, vyráběné buď parní nebo suchou destilací nebo mechanicky lisováním. Produkty získané jinými extrakčními metodami, jako je extrakce pomocí rozpouštědel nebo superkritického oxidu uhličitého, absolue, stejně jako pryskyřice nebo oleorosiny nemohou být považovány za esenciální oleje, neboť nesplňují výše uvedenou definici [27, s. 130].

3.1.1 Lisování

Lisování za studena bylo praktikováno dlouho předtím, než lidé objevili proces destilace. Tato metoda se používá výhradně pro výrobu olejů z citrusové kůry. Mezi oleje s největší produkcí patří pomeranč, citron, grapefruit a mandarinka.

Důvodem pro extrakci citrusových olejů mechanickými metodami ze slupek je relativní tepelná nestabilita aldehydů v nich obsažených. Alifatické aldehydy jako například heptanal, oktanal, nonanal jsou snadno oxidovány vzdušným kyslíkem, což vede ke vzniku sensoricky nepříjemných karboxylových kyselin. Existuje pouze jedna výjimka. Limetkový olej může

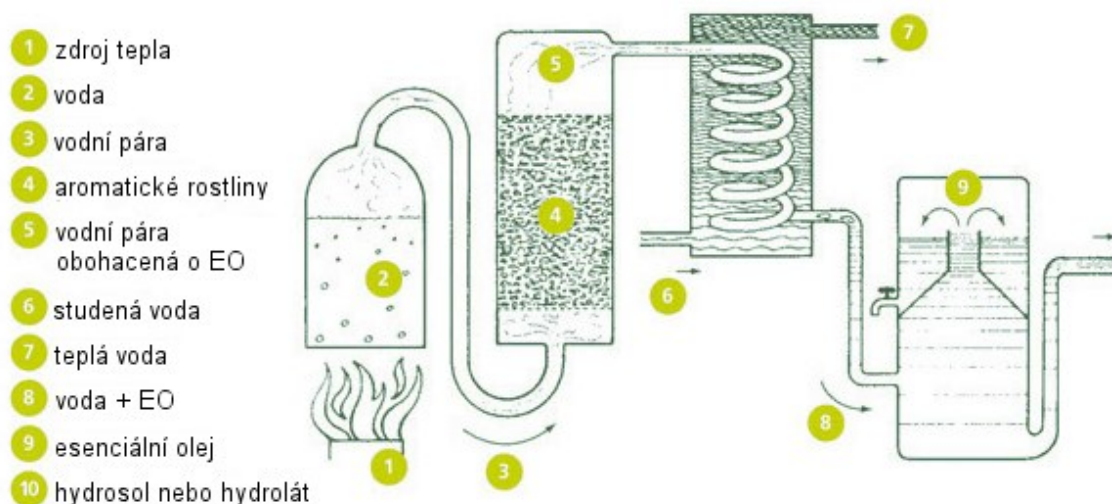
být lisovaný za studena nebo získáván parní destilací. Chemické složení těchto dvou druhů olejů, ale i jejich vůně, se výrazně liší od sebe navzájem.

Olejové buňky citrusových plodů se nacházejí těsně pod povrchem v oplodí. Při lisování jsou buňky narušeny a strojně vymačkaný olej se odsaje proudem vody. Olej se při stání snadno odděluje od kapaliny a sbírá se dekantací. Oplodí může obsahovat organické kyseliny, především kyselinu citrónovou, jablečnou a šřavelovou. K jejich neutralizaci se kůra máčí ve vápenném roztoku. V některých případech je prováděna také winterizace k odstranění vosků [27, s. 139-141].

3.1.2 Parní destilace

Nejčastěji používanou metodou pro extrakci esenciálních olejů z rostlin je parní destilace (Obrázek 3). Doložené historické záznamy hovoří o primitivních nádobách sloužících k destilaci. To také svědčí o dávném zájmu lidstva získávat vonné a biologicky hodnotné těkavé látky z rostlin.

Destilace je definována jako odpařování a následná kondenzace kapaliny. Odpařování je způsobeno tepelně indukovanými molekulárními pohyby v kapalině, což má za následek uvolnění některých molekul do okolního prostředí. Dodání tepla způsobí vyšší tlak na stěny buněk obsahujících silice, tím dojde k jejich prasknutí a následně jsou tyto těkavé látky strhávány párou. Nejjednodušší způsob extrakce silice je pomocí hydrodestilace, například pomocí ponoření biomateriálu do vroucí vody. Rostlinný materiál během varu nasákne vodou a olej obsažený v olejových buňkách difunduje přes buněčné stěny pomocí osmózy. Následně se odpaří a jsou odneseny vodními parami. Vodní páry jsou vedeny spirálou, která je ochlazována studenou vodou a tím dochází ke zkondenzování páry na kapalinu, která má dvě složky – hydrolát a esenciální olej. K oddělení vodní a olejové složky dochází v tzv. florentské baňce. Většina esenciálních olejů je lehčích než voda, a proto plavou na povrchu. Některé silice jsou těžší než voda a shromažďují se na dně sběrné nádoby. Některé esenciální oleje vyžadují speciální upravené postupy destilace, například z okvětních plátků růží či květů ylang-ylang [27, s. 143, 144, 147, 149].



Obrázek 3 Destilační přístroj [28].

3.1.3 Frakcionace

Frakcionace esenciálních olejů v komerčním měřítku se provádí za účelem snížení obsahu nebo odstranění určité frakce esenciálního oleje, případně izolace jednotlivé složky v čistém stavu. K dosažení požadované separace se provádí frakcionace za sníženého tlaku za použití účinných frakcionačních kolon tak, aby se zabránilo tepelnému rozkladu olejových složek. Izolace některých složek esenciálního oleje se také provádí vymrazováním s následnou centrifugací při teplotě pod bodem mrazu požadovaného produktu [27, s. 157].

Většina esenciálních olejů jsou komplexní směsi terpenických a seskviterpenických uhlovodíků a jejich derivátů (alkoholy, aldehydy, ketony, estery, karboxylové kyseliny) a dále aromatických sloučenin, jako jsou fenoly, ethery a aromatické estery. Mnoho terpenů má hořkou chuť a vzhledem k tomu, že mnohdy nepřispívají něčím důležitým, provádí se jejich odstraňování. Jednou z metod je tzv. mycí proces, který se používá především k ošetření citrusových olejů. Do esenciálního oleje se přidá vybrané rozpouštědlo (nejčastěji voda-ethanol), mícháním se oddělí polárnější složky s afinitou k rozpouštědлу, a to se následně odstraní. Proces se několikrát opakuje. Další, složitější způsob úplného odstranění uhlovodíků, je chromatografická separace za použití kolon plněných oxidem křemičitým nebo hlinitým [27, s. 157-158].

3.2 Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů

Některé esenciální oleje se vyznačují antimikrobiální aktivitou vyvolanou přítomností aktivních monoterpenových složek. Mnoho esenciálních olejů již bylo otestováno. Například *Cymbopogon citratus* (lemongrass, citrónová tráva) má znatelnou aktivitu proti

některým grampozitivním bakteriím (G^+) a *Cymbopogon nardus* (citronela) má širokospektrální fungicidní aktivitu. Ve studii (Mangalagiri *et al.*, 2021) bylo při testování zjištěno, že esenciální oleje z *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon martinii*, *Eucalyptus citridora*, *Cymbopogon winterianus* a *Pelargonium* sp. vykazovaly vysokou antibakteriální aktivitu. Zajímavostí bylo zjištění, že při testování proti mikroorganismům *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Xanthomonas oryzae* žádná z bakteriálních kultur nevyvíjela rezistenci ani po dlouhodobé expozici vůči testovaným esenciálním olejům [29].

3.3 Charakteristika vybraných esenciálních olejů

Esenciální oleje se skládají nejčastěji z přibližně 100 složek, ale mohou obsahovat až 500 složek. Ty dohromady vytváří jedinečnou synergii. Dnes jsou obvykle vědecky zkoumány jednotlivé složky, jejich chemické složení, jsou ověřovány jejich účinky na lidské zdraví a samozřejmě jejich toxicita.

V této kapitole jsou stručně popsány jednotlivé esenciální oleje, které byly použity v experimentální části diplomové práce.

Tymiánový olej je získáván z rostlin druhu *Thymus vulgaris*. Existuje mnoho druhů a chemotypů, nejčastěji se používají tymián thymol a linalol. Má antibakteriální, protiplísňové a mukolytické účinky. Posiluje funkce celého organismu a působí zejména proti infekcím v dýchacím, močopohlavním a zažívacím systému. Chemické složení nejčastěji obsahuje thymol, para-cymen, γ -terpinen, myrcen, linalool či karvakrol [30].

Oregánový olej existuje v několika druzích, jejichž složení je dosti podobné. Všechny jsou výrazně protiinfekční, ale také dráždivé na sliznice a pokožku díky obsahu karvakrolu a thymolu [30].

Majoránkový olej je získáván z různých chemotypů, které jsou bohaté na linalool nebo na karvakrol. Méně dráždivý je typ linalool. Je vhodný při dýchacích obtížích, má antiseptické účinky, snižuje krevní tlak. Pomáhá uvolnit napětí a křeče, tlumí bolest hlavy a čistí vzduch a vhodná je kombinace s levandulovým olejem.

Nejčastějšími chemickými složkami jsou terpinen-4-ol, sabinenhydrát, γ -terpinen, α -terpineol, linalool [30].

Saturejkový olej výrazně posiluje dýchací, močový, zažívací, oběhový a nervový systém. Obsahuje γ -terpinen, karvakrol, para-cymen [30].

Koriandrový olej se získává destilací semen. Ulevuje při bolestech zejména revmatického původu. Je také vhodný při žaludečních potížích, střevních a močových zánětech. Uvolňuje ztuhlé svaly, klouby, křeče. Má antibakteriální, protizánětlivé a analgetické účinky. Nejčastějšími složkami jsou linalool, γ -terpinen, α -pinen [30].

Kmín je jeden z nejlepších esenciálních olejů na zažívací obtíže, podporuje chuť k jídlu, pomáhá při nevolnosti a nadýmání, posiluje činnost jater. K destilaci se používají semena. Obsahuje především karvon a limonen [30].

Olej z černého pepře má zklidňující a protizánětlivé účinky, působí při potížích v zažívacím a dýchacím ústrojí, pomáhá při nachlazení, únavě, otocích a revmatismu.

Obsahuje řadu složek, z nichž nejvíce zastoupeny jsou β -karyofylen, sabinen, limonen, β -pinen a α -pinen [30].

Rozmarýnový olej je získáván z rostlin druhu *Rosmarinus officinalis* a existuje několik chemotypů, nejčastěji se lze setkat s chemotypem cineol, verbenon a borneon. Pokud není uveden žádný chemotyp, znamená to, že tento druh rozmarýnu nemá výraznou převahu žádné ze zmiňovaných chemických složek. Obecně se rozmarýn používá na úpravu nízkého krevního tlaku, podporuje zažívání, mozkovou činnost a paměť.

Jeho chemické složení se skládá ze složek jako je 1,8-cineol, kafr, α -pinen, β -karyofylen, α -terpineol, para-cymen [30].

Máta je bylina, která je široce využívána. Hodí se jak na přípravu čaje, tak jako osvěžující přísada do sladkostí, k ochucení žvýkaček, zubních past a ústních vod. Má příznivé účinky na zažívací trakt, podporuje trávení, žlučník, slinivku a na potíže horních cest dýchacích. Nejčastěji je využívána máta peprná (*Mentha piperita*) a máta kadeřavá (*Mentha spicata*). Nejvýraznější složkou je menthol [30].

Olej z citronové trávy bývá často prodáván pod anglickým názvem lemongrass. Vyznačuje se silnými antibakteriálními a protiplísňovými účinky, dokáže čistit žaludek a střeva. Osvěžuje, pročišťuje a dokáže eliminovat cigaretový zápach. Ve složení převládá geranial a neral [30].

Čajovníkový olej (tea tree) je silné přírodní antibiotikum, má široké použití při bakteriálních, plísňových a virových infekcích. Jako jeden z mála esenciálních olejů se může používat neředěný lokálně na drobná poranění. Má pověst všestranně použitelného oleje na různé typy infekcí, avšak z důvodu jeho rozšířeného používání v nejrůznějších kosmetických

přípravcích vedlo k tomu, že mnohé bakterie a viry si vůči němu vytvořily rezistenci. Nejvýraznějšími složkami jsou terpinen-4-ol, γ -terpinen a α -terpinen [30].

Éterický olej z citronely snižuje horečku a má protikřečové účinky zejména v žaludku a ve střevech. Také se dá úspěšně používat na odpuzování komárů a klíšťat. Nejvíce zastoupenými chemickými složkami je citronellal a geraniol [30].

Citronový olej je získáván lisováním citrusové kůry. Pro své osvěžující účinky je velmi vhodný při duševní námaze. Je také účinný při bolestech hlavy a infekci dýchacích cest. Dále snižuje krevní tlak, povzbuzuje trávení, stimuluje tok lymfy a celkově čistí organismus. Je vhodným doplňkem při léčbě akné, neboť snižuje tvorbu mazu. Nejčastěji zastoupenými složkami jsou limonen, β -pinen a γ -terpinen [30].

Mateřídouškový olej patří do rodiny tymiánů a má tudíž podobné účinky. Působí na nachlazení, kašel, podporuje trávení a zahřívá svaly a klouby. Pomáhá snižovat svědění a napomáhá tak při léčbě ekzému. Vzhledem k obsahu karvakrolu a thymolu se nedoporučuje používat u malých dětí [30].

Olej *Litsea cubeba* (česky vavřín kubébový) je vyhledáván pro svou svěží vůni. Používá se ke koupelím unavených a oteklých nohou. Příjemně osvěžuje, působí proti únavě, sklíčenosti a je vhodný k udržení pozornosti při řízení motorových vozidel a při studiu. Nejvíce zastoupenou složkou je geraniol, následovaný neralem, limonenem a α -pinenem [30].

Esenciální olej palmarosa (*Cymbopogon martini*) je destilován z trávy, která má český název vousatka Martinova. Pro svou vůni podobnou růži se často přidává do kosmetických přípravků, ale občas se jím růžový olej přímo pančuje. Má antibakteriální, antivirové a protiplísňové účinky. Využívá se při léčbě močových infekcí, zánětu dutin i na kožní potíže. Obsahuje geraniol, geranylacetát, linalol a farnesol [30].

Helichrysový olej je získáván destilací květů rostliny smil italský. Patří do stejné čeledi jako heřmánek a řebříček. Jedná se o méně známý olej, který má ale zajímavé využití. Regeneruje pokožku, pomáhá při léčbě ran, popálenin, akné. Snižuje napětí a bolesti hlavy, je antidepressivní. Nejvíce zastoupenou chemickou složkou je nerylacetát a γ -kurkumen [30].

4 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 v článku 2 definuje kosmetický přípravek jako jakoukoli látku nebo směs určenou pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů.

V přílohách II – VI tohoto Nařízení jsou uvedeny zakázané látky, látky povolené s omezením, seznam povolených barviv, konzervačních přísad a UV filtrů [31].

Kosmetické přípravky nemají jednotné dělení, ale dle organizace COLIPA je doporučeno rozdělení do sedmi kategorií – dekorativní kosmetika, parfémy, péče o tělo, péče o vlasy, péče o pleť, opalovací přípravky a péče o ústní dutinu [32].

4.1 Formy kosmetických přípravků

Kosmetické přípravky mohou být aplikovány v tekuté, polotuhé nebo tuhé formě. Záleží na účelu použití. Dělení není jednoznačně klasifikováno.

4.1.1 Roztoky

Jedná se o homogenní kapalně systémy s nízkou viskozitou. Nejvyšší procentuální zastoupení mají rozpouštědla ve formě vody nebo alkoholu, případně jejich směsi. Dále jsou jejich součástí různé aktivní složky, například rostlinné extrakty nebo látky lipidové povahy. Pleťová nebo vlasová tonika obsahují adstringentní či prokrvující ingredience. V dnešní době velmi populární micelární vody jsou určeny k čištění pleti a k odstraňování zbytků dekorativní kosmetiky. Micely tenzidů na sebe vážou nečistoty a další zklidňující a hydratační látky pomáhají vyrovnávat tonus pokožky [33].

4.1.2 Lotiony

Liší se od roztoků vyšší viskozitou s vyšším zastoupením látek nepochopitelné povahy. V podstatě se jedná o velmi zředěné emulze typu olej ve vodě (O/V). Někdy bývají označovány jako tělová nebo pleťová mléka [33].

4.1.3 Emulze

Jedná se o nejrozšířenější formu kosmetických přípravků, které bývají v komerční kosmetice často označovány jako krémy. Emulze jsou klasifikovány jako disperzní systém dvou nemísitelných kapalin – polární vodné fáze a nepolární olejové fáze. Dle jejich poměrového zastoupení jsou děleny na systém olej ve vodě (O/V) nebo voda v oleji (V/O). Jelikož se jedná o systémy termodynamicky nestabilní, je nutné fáze spojit vhodným emulgátorem. Zvláštním typem jsou mikroemulze, které bývají vzhledem ke svým vlastnostem řazeny často mezi lotiony. Na rozdíl od emulzí jsou transparentní a termodynamicky stabilní a velikost částic se pohybuje v rozmezí 10-100 nm. Vyznačují se vysokou koncentrací surfaktantu [33].

4.1.4 Gely

Jedná se o koloidní systém, ve kterém je nosná látka makromolekulárního charakteru zesíťována a tím je schopna pohltit několikanásobné množství kapaliny. Dispergované částice jsou koloidních rozměrů a vytváří s vnější fází kontinuální systém. V praxi se uplatňují jak hydrogely s vodnou vnější fází a vodorozpustnými polymery, které jsou schopny již v nízkých koncentracích vytvářet spojité gelové struktury. Jedná se především o karboxyvinylové sloučeniny (karbomery) a polymery na bázi celulózy (např. methylcelulóza). Později se na trhu objevily i olejové gely s olejovou vnější fází, jež jsou používány pro své vlastnosti především jako emoliantní prostředky, případně jako přípravky k odstraňování voděodolného make-upu. Jako gelační činidlo je využíván vhodný polymer rozpustný v olejích nebo mírné, především neionické tenzidy [33].

4.1.5 Pěny

Kosmetické pěny jsou vytvářeny vytlačení obsahu z uzavřené nádoby aerosolovou technikou za pomoci hnacího plynu. Pěna je koloidní disperzní systém, kde disperzním prostředkem je plyn a disperzní fází kapalina. Plyn je v pění ohraničen tenkým kapalným filmem, voda tvoří často až 90 % obsahu. Důležitý je pečlivý výběr emulgátoru, který zajistí stabilitu pěny. Zvýšení koncentrace tenzidu zajistí vytváření stabilnější a jemnější pěny [33].

5 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo vytvořit kosmetický přípravek s přídavkem kyseliny mandlové a esenciálních olejů s mikrobiálním účinkem. Výsledný produkt byl testován kožními testy na dobrovolnících a byla provedena senzorická a mikrobiologická analýza.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ, VZORKY

6.1 Použité materiály

Pro stanovení antimikrobiální aktivity bylo použito 18 esenciálních olejů:

- tymián (*Thymus vulgaris*) – Nobilis Tilia, země původu Španělsko
- oregano (*Origanum vulgare*) – Nobilis Tilia, země původu Rumunsko
- majoránka (*Origanum majorana*) – Nobilis Tilia, země původu Egypt
- saturejka (*Satureja Montana*) – Nobilis Tilia, původ Balkán
- koriandr (*Coriandrum sativum*) – Nobilis Tilia, země původu Rusko
- kmín (*Carum carvi*) – Nobilis Tilia, země původu Česká republika
- pepř (*Piper nigrum*) – Nobilis Tilia, země původu Srí Lanka
- rozmarýn (*Rosmarinus officinalis*) – Nobilis Tilia, země původu Tunis
- máta peprná (*Mentha piperita*) – Nobilis Tilia, země původu USA
- lemongrass (*Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus*), Nobilis Tilia, země původu Indie
- tea tree extra (*Melaleuca alternifolia*) – Nobilis Tilia, země původu Austrálie
- tea tree (*Melaleuca alternifolia*) – Salus, země původu Austrálie
- citronela (*Cymbopogon winterianus*) – Nobilis Tilia, země původu Indonésie
- citron (*Citrus limonum*) – Aroma-Zone, Francie, země původu Itálie
- mateřídouška (*Thymus Serpyllum*) – ATOK, země původu Francie
- *Litsea cubeba* (*Litsea cubeba*) – Salus, země původu Čína
- palmarosa (*Cymbopogon martinii*) – Aroma-Zone, Francie, země původu Indie
- helichrysum (*Helichrysum italicum*) – Aroma-Zone, Francie, země původu Korsika

Na výrobu základní emulze byly použity následující ingredience:

- destilovaná voda – Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky UTB Zlín, vlastní výroba

- extrakt z aloe vera 10:1 – dodavatel Kosmetické suroviny s.r.o., Praha
- glycerol – dodavatel Kosmetické suroviny s.r.o., Praha
- bio slunečnicový panenský olej – výrobce Libor Baránek, Bojkovice
- bambucké máslo – dodavatel Kosmetické suroviny s.r.o., Praha
- včelí vosk – dodavatel Kosmetické suroviny s.r.o., Praha
- kakaové máslo – výrobce Kerfoot Group, UK
- ricinový olej – výrobce Míča a Harašta s.r.o., Blansko
- emulgátor olivoil – dodavatel Kosmetické suroviny s.r.o., Praha

Do jedné experimentální řady byla přidána kyselina mandlová, výrobce Sigma-Aldrich. Z důvodu zvýšení pH byl roztok upraven pomocí NaOH o koncentraci 30 %.

6.2 Přístroje a pomůcky

- laminární box – Clean Air, Nizozemsko
- laboratorní inkubátor – Memmert, Německo
- parní sterilizátor Varioklav 75S – Labortechnik AG, Německo
- dezilometr Densi – La – Meter – Erba Lachema, Česká republika
- laboratorní třepačka Vortex – Heidolph, Německo
- spirál plater Eddy Jet 2W – IUL, Španělsko
- automatické počítadlo kolonií Sphere Flash – IUL, Španělsko
- MPA stanice se sondami (korneometr CM825, pH metr PH905, tewametr TM300) – Courage & Khazaka, Německo
- anaerostat Anaerocult® A – Merck Milipore, Německo
- automatické pipety – Eppendorf, Německo
- laboratorní předvážky, analytické váhy Sartorius Basic – Sartorius AG, Německo
- Petriho misky plastové sterilní a skleněné
- plastové laboratorní pomůcky (očkovací kličky, zkumavky, špičky pro automatické pipety, mikrotitrační destička, Pasteurovy plastové pipety, plastová stěrka)

- další běžné laboratorní pomůcky – papírové disky, kovové misky na přípravu emulzí, šlehač mléka, kovová metlička, digitální teploměr

6.3 Kultivační média a roztoky

V této diplomové práci byla použita kultivační média, za účelem vyočkování, uchování a testování antimikrobiálních vlastností mikroorganismů.

6.3.1 Fyziologický roztok

Pro přípravu kalibrovaných suspenzí mikroorganismů odebraných z kultivačního média byl využit fyziologický roztok. Skládá se z destilované vody a 0,9% chloridu sodného, který byl pro rozpuštění sterilizován autoklávováním.

6.3.2 Nutrient agar

Tato a ostatní půdy byly dodány od firmy Himedia, Indie. Kultivační médium bylo použito pro analýzu přežití mikroorganismů v emulzích. Obsahuje agar, pepton, ekvivalent hovězího výtažku HM pepton B, chlorid sodný a kvasničný extrakt. Polotovar v množství 28 g se rozpustí v jednom litru destilované vody, nechá se přejít varem a poté je sterilizován v autoklávu na 121 °C po dobu 15 minut. Nechá se vychladit na přibližně 50 °C a nalije se do připravených Petriho misek k úplnému zatuhnutí.

6.3.3 Mueller Hinton agar

Tato diagnostická půda (Himedia, Indie) je speciálně navržena pro testování citlivosti antibiotik vůči mikroorganismům pomocí diskové difúzní metody. Skládá se z agaru, hovězí infúze v sušeném stavu, hydrolyzátu kaseinu a škrobu. Příprava spočívá v rozpuštění 38 g sušiny v jednom litru destilované vody, dále se tento roztok přivede k varu a následně se sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po částečném ochlazení je rozlit do Petriho misek.

6.3.4 RCA agar

Jedná se o neselektivní médium (Himedia, Indie) obohacené o kvasnicový extrakt, který je zdrojem uhlíku, dusíku, vitamínů a minerálů pro výživu mikroorganismů. Dextróza se přidává jako zdroj sacharidů. Dále obsahuje hovězí extrakt, kasein, škrob a L-cystein. Podporuje růst především klostridií a dalších anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Z tohoto polotovaru se agarová půda připravuje rozpuštěním 51 g v 1 litru

destilované vody, nechá se přejít varem a poté se sterilizuje v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 15 minut. Následně se také rozlije do připravených Petriho misek a nechá se vychladnout.

6.3.5 Sabouraud agar

Tento agar (Himedia, Indie) se primárně používá k izolaci, kultivaci a skladování nepatogenních i patogenních hub a kvasinek. Základními ingrediencemi jsou agar, pepton a dextróza. Mohou být přidány širokospektrá antimikrobiální činidla k inhibici růstu široké škály grampozitivních a gramnegativních bakterií. Příprava spočívá v rozmíchání všech složek v přibližně 900 ml deionizované vody, upraví se pH kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 5,6 a doplní se na konečný objem jednoho litru. Zahřívá se k varu, aby se směs zcela rozpustila. Poté se sterilizuje autoklávováním po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po částečném ochlazení se nalije do Petriho misek.

6.4 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů byly využity grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie a kvasinka z České sbírky mikroorganismů v Brně. V laboratoři byly z mrazáku vyočkovány a uchovávány na RCA agaru (*Cutibacterium acnes*), Nutrient agaru (ostatní bakterie) a Sabouraud agaru (kvasinka).

6.4.1 Grampozitivní bakterie

Staphylococcus aureus (CCM 3953)

Cutibacterium acnes (CCM 7417)

6.4.2 Gramnegativní bakterie

Escherichia coli (CCM 3954)

Pseudomonas aeruginosa (CCM 3955)

Klebsiella oxytoca (CCM 2934)

Klebsiella aerogenes (CCM 2531)

6.4.3 Kvasinky

Candida albicans (CCM 8276)

7 METODY

Praktická část diplomové práce se skládá z několika dílčích experimentů. V první fázi byla testována antimikrobiální aktivita osmnácti esenciálních olejů na růst mikroorganismů pomocí diskové difúzní metody. Do dalšího experimentu byly vybrány 3 esenciální oleje, které byly zakomponovány do vyrobené emulze. Zároveň byla do jedné řady přidána kyselina mandlová. U všech vzorků bylo provedeno měření v čase na změnu pH, hydratace a TEWL u pokožky na kůži probandů. Dále proběhlo dotazníkové šetření na sensorické hodnocení vzorků. Na závěr byly emulze testovány na přežití mikroorganismů po dobu 28 dní.

7.1 Příprava suspenzí mikroorganismů

Z mrazáku, nastaveném na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly mikroorganismy vyočkovány na pevnou agarovou půdu v Petriho miskách dle typu mikroorganismu. Bakterie byly poté kultivovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. V případě *Cutibacterium acnes* byla kultivace provedena anaerobně po dobu pěti dní. Kvasinka *Candida albicans* byla po zaočkování kultivována za laboratorní teploty $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu pěti dní.

Z narostených kultur bylo odebráno přiměřené množství jednorázovou sterilní plastovou kličkou do fyziologického roztoku ve zkumavce. Po pečlivém rozmíchání inokula byl změřen zákal na dezilometru a případně byla koncentrace upravena tak, aby odpovídala hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice.

7.2 Disková difúzní metoda

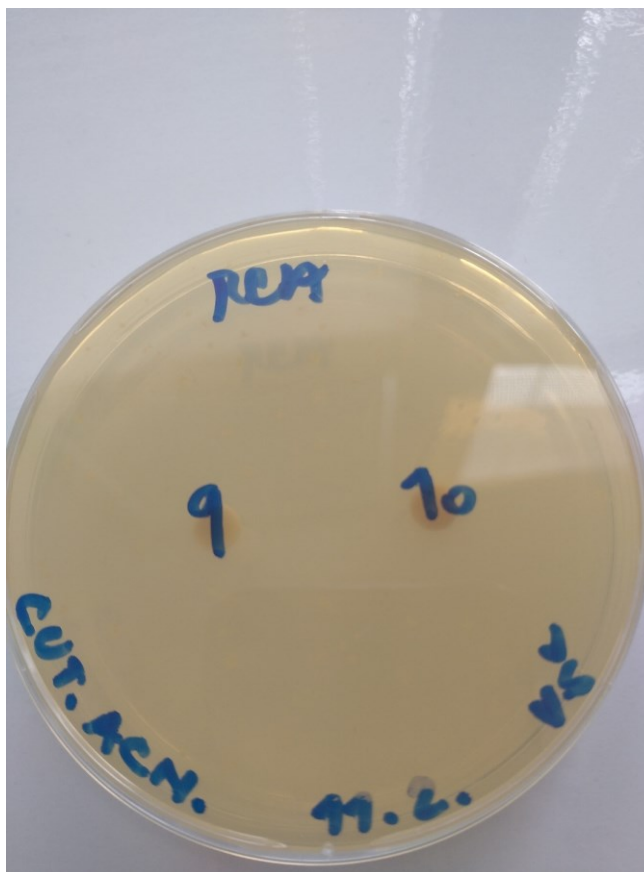
Ke zjištění citlivosti mikroorganismu k aplikované látce slouží speciální mikrobiologické metody. Nejčastěji se provádí test citlivosti nebo rezistence mikroorganismu na antibiotika. Stejnými způsoby lze testovat antibakteriální účinnost esenciálních olejů.

Pro testování citlivosti k vybranému inhibitoru růstu mikroorganismu je využíván Mueller-Hinton agar, který je bohatý na živiny, má nižší obsah ztužovačů a standardní difúzní schopnost. Tloušťka agaru ovlivňuje difúzi a tím i výsledek testu a je tedy standardně stanovena na 4 mm [10, s. 379].

Z připravené bakteriální suspenze byl na agarovou půdu na Petriho miskách inokulován přibližně 1 ml pomocí automatické pipety. Pro inokulaci *Cutibacterium acnes* byla použita půda RCA. Inokulum bylo rovnoměrně rozlito na celé ploše Petriho misky a po zaschnutí

na jeho povrch byly aplikovány sterilní jehlou papírové disky napuštěné jednotlivými esenciálními oleji. Na každou agarovou plotnu byly umístěny dva disky s rozdílnými oleji (Obrázek 4). Pouze v případě tymiánového a oreganového oleje byl aplikován jen jeden disk na misku z důvodu jejich vysoké antimikrobiální aktivity.

Během kultivace difunduje látka z disku horizontálně do okolního agaru v koncentračním gradientu. Misky jsou ihned umístěny do inkubátoru, kde jsou podmínky pro optimální růst daného mikroorganismu. Nejčastější teplota je 36-37 °C a doba kultivace 18-24 hodin. Účinná látka se projeví vytvořením kruhové inhibiční zóny kolem disku. O citlivosti mikroorganismu rozhoduje hodnocení průměru zóny, které je přímo úměrné antimikrobiální aktivitě testované látky. Výsledky se vyhodnocují jen kvalitativně, tj. zda je mikroorganismus na antibiotikum nebo esenciální látky citlivý nebo zda je rezistentní [10, s. 379; 34].



Obrázek 4 RCA agar s disky napuštěnými esenciálními oleji [vlastní zdroj].

7.3 Příprava emulzí

Pro další experimentální část diplomové práce byla vyrobena emulze, jejíž složení je uvedeno v Tabulce č. 1. Tato základní emulze byla rozdělena na 8 stejných částí. Byly vytvořeny dvě řady po čtyřech vzorcích, přičemž do jedné řady byla navíc přidána kyselina mandlová. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 1 Složení základní emulze – rozpis na 100 g.

Vodná fáze	g	Olejová fáze	g
destilovaná voda	60	bio slunečnicový olej	10
extrakt z aloe vera	2	bambucké máslo	4
glycerol	4	včelí vosk	4
		kakaové máslo	2
		ricinový olej	2
		emulgátor	12

Každá fáze byla zvlášť odvážena do kovové misky a obě byly zahřívány ve vodní lázni na teplotu přibližně 65 °C. Po vyjmutí z lázně byla okamžitě vodná fáze vlita do olejové fáze a následně míchána ručním bateriovým šlehačem na mléko. Pro urychlení emulgace byla miska vložena do nádoby se studenou vodou. Po vytvoření emulze byla směs domíchána manuálně kovovou metličkou do dosažení laboratorní teploty.

Do druhé řady byl zakomponován roztok kyseliny mandlové, který tvořil 5 % celkové hmotnosti. Vzhledem k tomu, že tento roztok měl velmi nízké pH (pK_a 3,37), bylo nutné ho zvýšit přidáním cca 100 kapek 30% roztoku NaOH. Pokud by pH nebylo upraveno, emulze by se rozpadla.

Pro tuto experimentální část byly vybrány následující 3 esenciální oleje, které tvořily 0,2 % celkového objemu:

- saturejkový olej
- lemongrass
- *Litsea cubeba*

Tabulka 2 Složení vzorků emulzí.

Vzorek	Složení
1	základ
2	základ + saturejkový olej
3	základ + lemongrassový olej
4	základ + olej <i>Litsea cubeba</i>
5	základ + kyselina mandlová
6	základ + saturejkový olej + kyselina mandlová
7	základ + lemongrassový olej + kyselina mandlová
8	základ + olej <i>Litsea cubeba</i> + kyselina mandlová

7.4 Test přežívání bakterií v emulzi

Pro zjištění antimikrobiálních účinků vzorků emulzí byl proveden test přežívání bakterií.

Pro tento test bylo použito inokulum *Staphylococcus aureus* v koncentraci $3,47 \times 10^7$ CFU/ml a *Pseudomonas aeruginosa* v množství $1,63 \times 10^6$ CFU/ml. Z inokula bylo odebráno 10 μ l a sterilně rozmícháno v 1 ml vzorku emulze. Takto byly zaočkovány všechny připravené vzorky emulzí každým inokulem zvlášť a byly uchovávány v laboratorní teplotě ve skleněných vialkách. Mikrobiologická analýza pro stanovení počtu bakterií byla prováděna po 7, 14 a 28 dnech skladování.

Pro stanovení počtu bakterií byl každý vzorek zředěn ve fyziologickém roztoku a byla připravena řada desítkového ředění. K inokulaci na Nutrient agar byl použit automatický dávkovač (Obrázek 5), který zaočkuje rotující agarovou plotnu kapalným vzorkem. Takto inokulované misky byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

Kolonie byly spočítány pomocí automatického počítadla Sphere Flash (Obrázek 6). Kamera s vysokým rozlišením dokáže detekovat a spočítat kolonie. Osvětlovací zařízení umožňuje zpracování jakéhokoli typu média, včetně průhledného i neprůhledného agaru. Detekční limit počtu bakterií je 2×10^2 CFU/g.



Obrázek 5 Spiral plater Eddy Jet 2W [vlastní zdroj].



Obrázek 6 Automatické počítadlo Sphere Flash [vlastní zdroj].

7.5 Kožní testy

Emulze ovlivňují v čase stav pokožky, její hydrataci, změnu pH a transepidermální ztrátu vody (TEWL). Tato měření byla provedena na skupině osmi probandek.

Nejdříve bylo provedeno odmaštění pokožky volárního předloktí 0,5% roztokem tenzidu SDS (dodecylsírán sodný). Po čtyřech hodinách působení SDS byly na přesně vymezená místa nanášeny vzorky emulzí (Obrázek 7). První místo bylo ponecháno bez jakéhokoliv ošetření jako kontrolní místo. Další místo bylo pouze odmaštěno, ale nebyla nanášena emulze. Na kontrolním místě a místě pouze ošetřeném roztokem SDS proběhlo měření již v nulté hodině. Všechna místa byla poté proměřována po 1, 2, 3, 4 a 24 hodinách.



Obrázek 7 Nanesené vzorky na volárním předloktí [vlastní zdroj].

7.5.1 Corneometrické měření

Obsah vlhkosti ve *Stratum corneum* ovlivňuje řadu charakteristik kůže. Hydratace byla měřena korneometrem CM825 (Obrázek 8). K měření dielektrické konstanty pokožky jsou využívány kapacitní senzory. Dielektrická konstanta se mění s obsahem vody. Na hlavě sondy je měřicí plocha, kterou se vyvíjí na pokožku mírný tlak. Hloubka měření je 10-20 μm , což zajišťuje, že hlubší vrstvy kůže neovlivňují měření [35]. Sonda je propojena s MPA stanicí a data se ukládají do softwaru v počítači.

Volární předloktí probandek bylo nejdříve zbaveno mastnoty tak, že na přesně vyznačená místa byly aplikovány proužky filtračního papíru o rozměrech 4 x 2 cm napuštěné roztokem SDS o koncentraci 0,5 %. Tyto pásy byly přelepeny náplastí a ponechány na kůži po dobu 4 hodin. Jedno místo bylo ponecháno bez ošetření pro kontrolu případné iritace pokožky v důsledku použitých vzorků emulze. Po uplynutí čtyř hodin na tato místa byly nanесeny jednotlivé vzorky krémů s tím, že první místo bylo bez jakéhokoliv ošetření a druhé místo bylo pouze odmaštěno. Na další místa bylo postupně nanесeno osm vzorků.

Hydratace byla měřena korneometrem na pěti místech každého vyznačeného místa z důvodu stanovení průměrné hodnoty.



Obrázek 8 Korneometr CM825 [vlastní zdroj].

7.5.2 Měření TEWL

Transepidermální ztráta vody je množství vody, které se přirozeně odpařuje z pokožky. Uvádí se v $\text{g/m}^2/\text{h}$ a slouží zejména ke zhodnocení bariérové funkce kůže. Jedná se o měřicí přístroj TM300 s otevřenou komorou (Obrázek 9). Sonda se skládá z dutého válce se dvěma páry senzorů měřících teplotu a vlhkost [36]. Aktivuje se stisknutím tlačítka. K ustálení hodnoty TEWL je nutné po přiložení sondy nechat přístroj několik sekund vyrovnat teplotu na pokožce.



Obrázek 9 Tewametr TM300 [vlastní zdroj].

7.5.3 Měření pH

Měření hladiny pH povrchu kůže je důležité pro hodnocení kvality hydrolipidického filmu na pokožce. Měření je založeno na vysoce kvalitní kombinované elektrodě, kde jak skleněná elektroda citlivá na H^+ ionty, tak přídatná referenční elektroda jsou umístěny v jednom pouzdře [37]. Sonda (Obrázek 10) je mezi měřeními ponořena do kádinky s destilovanou vodou a před měřením každého probanda je opláchnuta a otřena buničinou.



Obrázek 10 pH metr PH905 [vlastní zdroj].

7.6 Senzorické testy

Senzorického hodnocení vzorků se v měsíci březnu zúčastnilo 13 probandů, z toho 12 žen. Vzorky byly zašifrovány a klíč je uveden v Tabulce 3. Senzorické hodnocení obsahovalo dvě pořadové zkoušky a jednu párovou zkoušku.

7.6.1 Pořadové zkoušky

Pořadová zkouška je určena k rozřídění skupiny výrobků a k jejich seřazení podle intenzity sledovaného sensorického znaku, a to dle preferencí spotřebitelů. Užívá se především tam, kde rozdíly mezi jednotlivými výrobky jsou malé. Zkouška spočívá v tom, že posuzovatel obdrží náhodně seřazenou skupinu vzorků a jeho úkolem je seřadit vzorky podle vlastní preference nebo intenzity nějakého sensorického znaku. Zpravidla jde o tzv. nucenou volbu, což znamená, že každému vzorku je přiřazeno jiné číslo pořadí [38, s. 34].

První pořadová zkouška spočívala v seřazení vzorků emulzí dle roztíratelnosti, s tím, že nejlépe roztíratelnému vzorku bylo přiřazeno číslo 1 a nejhůře roztíratelnému číslo 8.

Druhá pořadová zkouška se týkala zhodnocení celkového vjemu emulze z pohledu vlastní preference.

Pořadovou zkoušku lze vyhodnocovat různými statistickými metodami. Mezi nejpoužívanější patří Friedmanův test. Posuzovatel podle rozpoznané intenzity nebo preference vzorky seřadí a každému vzorku přiřadí jedno z čísel od 1 do R. Výsledky se seřadí do tabulky. Je stanovena nulová hypotéza (mezi výrobky nejsou statisticky významné rozdíly) a porovnává se s alternativní hypotézou (mezi výrobky existuje alespoň jeden, který se liší od jiných) [38, s. 34, 35].

Testové kritérium:

$$FR = \frac{12}{n \cdot R \cdot (R+1)} * \sum_{i=1}^R T_i^2 - 3 * n * (R + 1) \quad (1)$$

kde:

n – počet posuzovatelů

R – počet vzorků

T_i – součet pořadí

7.6.2 Párová zkouška

Párová porovnávací zkouška slouží ke srovnání sensorických vlastností dvou výrobků a stanovení rozdílu mezi nimi v intenzitě sledovaného znaku nebo v preferenci jednoho výrobku před druhým. Tato statistická metoda existuje ve dvou typech. Oboustranného testu se využívá k ověření, zda existuje rozdíl mezi dvěma výrobky v intenzitě sledovaného znaku. Jednostranné testy se využívají k ověření, zda jeden z výrobků je preferovanější nebo vykazuje větší intenzitu sledovaného znaku oproti druhému výrobku. Pokud posuzovatelé neshledají mezi výrobky rozdíl, zvolí s ohledem na nucenou volbu jeden z obou výrobků náhodně. V diplomové práci byl použit jednostranný test párové porovnávací zkoušky. Stav, kdy mezi vzorky v intenzitě znaku nebo v preferencích neexistuje rozdíl, je formulován jako nulová hypotéza. Proti nulové hypotéze je postavena alternativní hypotéza, kdy jeden vzorek je preferovanější nebo v posuzovaném znaku intenzivnější [38, s. 20, 21].

Testové kritérium:

$$F = \frac{n_A}{n - n_A + 1} \quad (2)$$

kde:

n – počet posuzovatelů

Tabulka 3 Emulze a jejich kódy v senzorickém dotazníku.

Kód vzorku	Složení emulze
A	základ
B	základ + saturejkový olej
C	základ + lemongrassový olej
D	základ + olej <i>Litsea cubeba</i>
E	základ + kyselina mandlová
F	základ + saturejkový olej + kyselina mandlová
G	základ + lemongrassový olej + kyselina mandlová
H	základ + olej <i>Litsea cubeba</i> + kyselina mandlová

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo zhodnotit antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů vůči mikroorganismům, Do vyrobených emulzí byly zakomponovány vybrané esenciální oleje a kyselina mandlová. Jejich působení na pokožku bylo ověřeno kožními a senzorickými testy.

8.1 Antimikrobiální účinky esenciálních olejů

Antimikrobiální aktivita osmnácti esenciálních olejů byla testována vůči grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*), gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*) a kvasince *Candida albicans*. K prokázání inhibičních účinků neředěných esenciálních olejů byla použita disková difúzní metoda. Každý mikroorganismus byl otestován třikrát. Většina esenciálních olejů prokázala nějaké antimikrobiální vlastnosti. Výsledky s průměrnými hodnotami velikostí inhibičních zón jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4 Inhibiční účinky esenciálních olejů na G⁺ bakterie a kvasinku.

Druh MO	G ⁺ bakterie		kvasinka
	<i>S. aureus</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>
EO	Velikost inhibičních zón (mm) vč. směrodatné odchylky		
Tymián	35,3±5,0	71,3±11,0	30,7±1,2
Oregano	31,7±4,0	64,0±15,9	35,0±3,0
Majoránka	14,3±2,5	6,7±1,2	10,7±1,2
Saturejka	27,7±4,0	15,7±16,7	20,0±2,0
Koriandr	16,7±3,1	14,7±1,2	13,0±1,0
Kmín	14,0±2,0	10,7±3,1	14,0±1,0
Pepř	8,7±3,1	8,0±3,5	6,0±0,0
Rozmarýn	12,7±8,1	7,3±2,3	7,0±1,0
Máta	19,3±6,1	8,3±4,0	12,7±1,2
Lemongrass	42,0±12,2	15,0±15,6	22,0±4,0
Tea tree Nob.	17,0±7,0	15,0±5,6	9,7±3,2
Tea tree Salus	14,7±1,2	19,0±6,6	9,7±3,2
Citronela	23,7±12,4	17,3±16,3	10,0±3,6
Citron	6,7±1,2	7,3±1,2	10,3±0,6
Mateřídouška	24,7±1,2	20,7±16,2	6,0±0,0
<i>Litsea cubeba</i>	33,7±8,6	14,0±10,6	6,0±0,0
Palmarosa	16,0±3,5	9,0±5,2	14,7±4,2
Helichrysum	10,0±5,3	6,0±0,0	6,0±0,0

Tabulka 5 Inhibiční účinky esenciálních olejů na G⁻ bakterie.

Druh MO	G ⁻ bakterie			
	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
EO	Velikost inhibičních zón (mm) vč. směrodatné odchylky			
Tymián	27,7±2,5	10,7±6,4	38,0±6,9	26,0±2,0
Oregano	28,7±1,2	14,7±11,5	33,3±6,1	27,3±2,1
Majoránka	19,7±3,5	8,7±4,6	15,7±1,5	8,7±4,6
Saturejka	25,3±4,2	10,0±6,9	24,7±2,5	25,0±6,1
Koriandr	15,3±2,3	6,0±0,0	16,7±1,2	11,3±7,6
Kmín	13,7±2,3	6,0±0,0	16,7±4,2	8,7±4,6
Pepř	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0
Rozmarýn	10,0±2,0	7,3±2,3	10,0±0,0	8,0±2,0
Máta	10,0±0,0	6,0±0,0	13,3±3,1	8,3±2,5
Lemongrass	17,3±3,1	6,0±0,0	29,0±8,5	16,7±3,1
Tea tree Nob.	27,0±16,5	6,0±0,0	15,0±1,0	12,7±4,6
Tea tree Salus	19,0±6,1	6,0±0,0	16,3±0,6	9,7±4,7
Citronela	10,0±2,0	6,0±0,0	15,0±4,4	12,3±4,9
Citron	6,0±0,0	6,0±0,0	7,3±1,2	9,7±3,2
Mateřídouška	24,7±4,6	6,0±0,0	23,7±3,1	21,0±3,6
<i>Litsea cubeba</i>	18,0±0,0	6,0±0,0	34,7±4,2	18,0±3,5
Palmarosa	13,7±2,1	6,0±0,0	13,7±2,1	11,3±5,1
Helichrysum	6,7±1,2	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval tymiánový a oreganový olej. Obě rostliny patří do čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité) a jejich chemické složení je velmi podobné. Nejvíce zastoupenou složkou je thymol. Wang *et al.* (2017) zjistili, že thymol narušuje integritu membrány *S. aureus* a tím dochází k úniku cytoplazmy. Dále je schopen se inkorporovat do intracelulárního prostoru, navázat se na bakteriální DNA a destabilizovat ji. Inhibiční účinky thymolu byly také zkoumány u *Pseudomonas aeruginosa*. Rovněž se zde projevil zpomalovací účinek růstu biofilmu. Ve studii Liu Ting *et al.* (2021) byl naměřen průměr inhibiční zóny tymiánového esenciálního oleje proti *Pseudomonas aeruginosa* 21,67±1,53 mm [39].

V této diplomové práci tymiánový olej neměl tak výrazné inhibiční účinky na *Pseudomonas aeruginosa* jako ve výše zmíněné studii. Inhibiční zóna činila pouze 10,7±6,4 mm. Vysoká hodnota směrodatné odchylky značí velké rozdíly v jednotlivých měřeních inhibičních zón. Avšak proti dalším mikroorganismům se antimikrobiální aktivita projevila jako velmi výrazná, zejména na gram pozitivní bakterie.

Do další experimentální části byl vybrán saturejkový esenciální olej, olej lemongrass a *Litsea cubeba*.

Satureja montana patří do čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité) a roste na suchých, kamenitých, nejčastěji vápencových svazích v evropské a asijské části Středomoří, od Pyrenejského poloostrova až po Sýrii. Stejně jako jednoletá pěstovaná saturejka zahradní je používána hlavně jako koření. Využití nachází také v lidovém léčení žaludečních a střevních potíží [40].

Hlavní složkou je karvakrol, p-cymen a γ -terpinen. Karvakrol má dobrou antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Wang *et al.* (2016) zjistili, že nízká koncentrace karvakrolu by mohla významně zvýšit hladinu mastných kyselin v membráně *S. aureus* a posléze tak narušit integritu a morfologii buněčné membrány [41]. Karvakrol narušuje integritu membrány, zvyšuje její propustnost a způsobuje únik draslíku a protonů, což nakonec vede ke ztrátě membránového potenciálu. Pozorování ve studii Vitanza Luca *et al.* (2019) jsou ve shodě s dalšími výzkumy, které uvádějí, že možné mechanismy působení esenciálních olejů a jejich derivátů zahrnují nejen poškození vnější membrány, ale také degradaci buněčné stěny, poškození cytoplazmatické membrány, poškození membránových proteinů, únik intracelulárního obsahu a koagulaci cytoplazmy [42].

Cymbopogon citratus, *C. flexuosus*, českým názvem voňatka citronová, též nazývaná citronová tráva, je z čeledi *Poaceae* (lipnicovité) a je tudíž trávou. Původní domovinou je Srí Lanka a Indie, ale postupem času se rozšířila i do dalších tropických oblastí na celém světě. Její esenciální olej má intenzivní a příjemnou vůni a působí různými bioaktivitami, jako jsou fungicidní, antihelminthické, insekticidní a antimikrobiální. Použitý esenciální olej obsahoval geraniol, neral a geraniol. Ve studii Bonferoni *et al.* (2017) se ukázalo, že esenciální olej z lemongrassu je účinný proti většině gram pozitivních i gram negativních bakterií a hub. Negativní výsledky byly získány pouze u jednoho kmene *Aspergillus* a tří kmenů *Pseudomonas aeruginosa* [43]. To odpovídá měření pomocí diskové difúzní metody v této práci, neboť antimikrobiální aktivita vůči *P. aeruginosa* nebyla zaznamenána. Naproti tomu vůči *S. aureus* činila inhibiční zóna $42,0 \pm 12,2$ mm, což bylo více než u nejsilnějšího působícího esenciálního oleje z tymiánu, kde inhibiční zóna byla v šíři $35,3 \pm 5,0$ mm.

Rod *Litsea* zahrnuje v současném taxonomickém pojetí asi 400 druhů, jedná se o keře nebo stromy. Nejvíce druhů roste v tropické Asii. *Litsea cubeba* je z čeledi *Lauraceae* (vavřínovité) s českým názvem vavřín kubébový. Je důležitým přírodním zdrojem dřeva,

široce distribuovaným v jižní Číně. Esenciální olej je vysoce ceněný sekundární produkt, který se získává hlavně z čerstvých plodů. Je používán v potravinářském a kosmetickém průmyslu díky své přirozené citronové chuti a vůni. Esenciální olej vykazuje jedinečné antibakteriální, antioxidační, antiseptické a antifungicidní účinky [44].

Ve studii Hu Wei *et al.* (2019) byl prokázán destruktivní účinek esenciálního oleje *Litsea cubeba* na cytoplazmatickou membránu *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) a dále byl kvalitativní i kvantitativní analýzou ověřen únik makromolekul a intracelulárních enzymů z bakteriální buňky [45]. Studie Dai *et al.* (2021) se zaměřila na komplexní pochopení antibakteriální aktivity proti gramnegativním bakteriím. Jako modelový kmen byla vybrána *E. Coli*. Pomocí metody SEM a TEM byla pozorována destrukce buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. To by mohlo být přičítáno hlavně různým terpenům, jako je limonen, α -pinen a dalším. Po použití esenciálního oleje byla také inhibována syntéza bakteriální DNA [46].

8.2 Kožní testy

Z ingrediencí uvedených v Tabulce 2 byla vyrobena emulze spojením vodní a olejové fáze zahřáté přibližně na teplotu 65 °C za stálého míchání. Byly vytvořeny dvě řady, přičemž jedna z nich obsahovala přídavek kyseliny mandlové. Každá řada byla rozdělena na čtyři části o stejné hmotnosti. Jednu část tvořila základní emulze a do dalších třech částí byl začleněn po jednom druhu vybraný esenciální olej o objemu 0,2 % celkové hmotnosti vzorku.

Na volárním předloktí osmi probandů – žen byla testována účinnost vyrobených vzorků emulzí pomocí přístrojů tewametr, pH metr a korneometr. Všechna měření byla prováděna v laboratoři za teploty cca 24 °C a relativní vlhkosti 20 %.

8.2.1 Hydratace pokožky

Stav hydratace pokožky je charakterizován v Tabulce 6. Hydratační působení jednotlivých vzorků emulzí v čase je vyhodnoceno v Tabulce 7. Na volárním předloktí probandů bylo ponecháno jedno místo bez ošetření pro kontrolu případné iritace jak emulzí, tak odmašťovacího roztoku SDS. Další místo bylo ošetřeno pouze roztokem SDS. Na zbylých osm míst byly nanášeny jednotlivé vzorky.

Kontrolní místo v čase příliš neměnilo hodnoty hydratace a pohybovalo se v průměru těsně pod hranicí hodnoty pro suchou pokožku. Na místě odmaštění, neošetřené žádným krémem,

hydratace nejprve klesala, na nejnižší hodnotu se dostala po jedné hodině od odstranění filtračních pásků napuštěných roztokem SDS, které byly předtím na pokožce po dobu čtyř hodin. V následujících hodinách se hydratace pomalu zvyšovala, ale i po 24 hodinách zůstala na úrovni velmi suché pokožky.

Místa ošetřená vzorky emulzí obsahující kyselinu mandlovou měla významně nižší úroveň hydratace než bez kyseliny mandlové. Dále u všech vzorků, bez ohledu na složení, docházelo v čase ke zvyšování hodnot hydratace a pokles nastal až při měření po 24 hodinách od nanesení emulzí.

Nejvyšší hodnoty téměř ve všech časech vykazovala základní emulze. Také emulze s esenciálním olejem z rostliny *Litsea cubeba* vykazovala vyšší úroveň hydratace, v 1. a 3. hodině měření předčila i základní emulzi. Mezi vzorky s přidavkem kyseliny mandlové nebyl v jednotlivých časech významný rozdíl.

Po 24 hodinách od nanesení emulzí se hydratace u všech vzorků téměř srovnala na stejné úrovni. Hodnoty hydratace kolísaly mezi 36,25 c.j. a 40,18 c.j. Nicméně stav pokožky již vykazoval známky velmi suché kůže, s výjimkou základní emulze, která se dostala lehce nad hranici této kategorie.

Nejvyšších hodnot hydratace dosáhly všechny vzorky po čtyřech hodinách po nanesení. Také lze konstatovat, že měření po 3. a 4. hodině ukázalo ve všech případech vzorků hodnotu hydratace pokožky nad 40 c.j., ale i to bylo na úrovni stavu suché kůže. Žádný ze vzorků neměl hodnotu vyšší než 70 c.j. a tudíž stav pokožky nebylo možné hodnotit jako normální. Zároveň je nutné konstatovat, že měření u jednotlivých probandek vykazovalo velké rozdíly, u některé osoby byly hodnoty hydratace poměrně vysoké, např. 67 c.j. a u jiné jen 42 c.j. ve stejném čase a u stejného vzorku. Obecně lze konstatovat, že některé probandky mají dobrou úroveň hydratace pokožky a jiné velmi nízkou.

Rozdíly mezi vzorky s různými esenciálními oleji nebyly významné a největší roli v úrovni hydratace hrála přítomnost nebo nepřítomnost kyseliny mandlové.

Zvyšování hydratace v čase lze tak přičíst pravděpodobně humektantům mezi základními složkami emulze, jako je glycerol a extrakt z aloe vera. Hydratační účinky glycerolu na pokožku zkoumala a potvrdila např. studie Levi *et al.* (2011), kdy pomocí infračervené spektroskopie byl prokázán vztah mezi zvyšující se koncentrací glycerolu a snížením napětí kůže v důsledku hydratace [47].

Aloe vera se využívá pro různé léčebné a terapeutické účely a v kosmetickém průmyslu je vyhledávanou složkou. Většina terapeutických účinků listů aloe je připisována

polysacharidovým složkám. Předpokládá se, že biologická aktivita gelu aloe vera je způsobena synergickým účinkem chemických složek, které jsou v něm přítomny. Anthrachinony jsou nejdůležitější sekundární metabolity, které jsou zodpovědné za antibakteriální, protizánětlivé, antioxidační, protirakovinné a jiné vlastnosti. Gel z aloe vera je úspěšně používán při léčbě popálenin a hojení pokožky. Studie Dal' Belo *et al.* (2006) prokázala zlepšení zadržování vody ve *stratum corneum* v důsledku přítomnosti aminokyselin histidinu, argininu, threoninu, serinu, glycinu a alaninu [48].

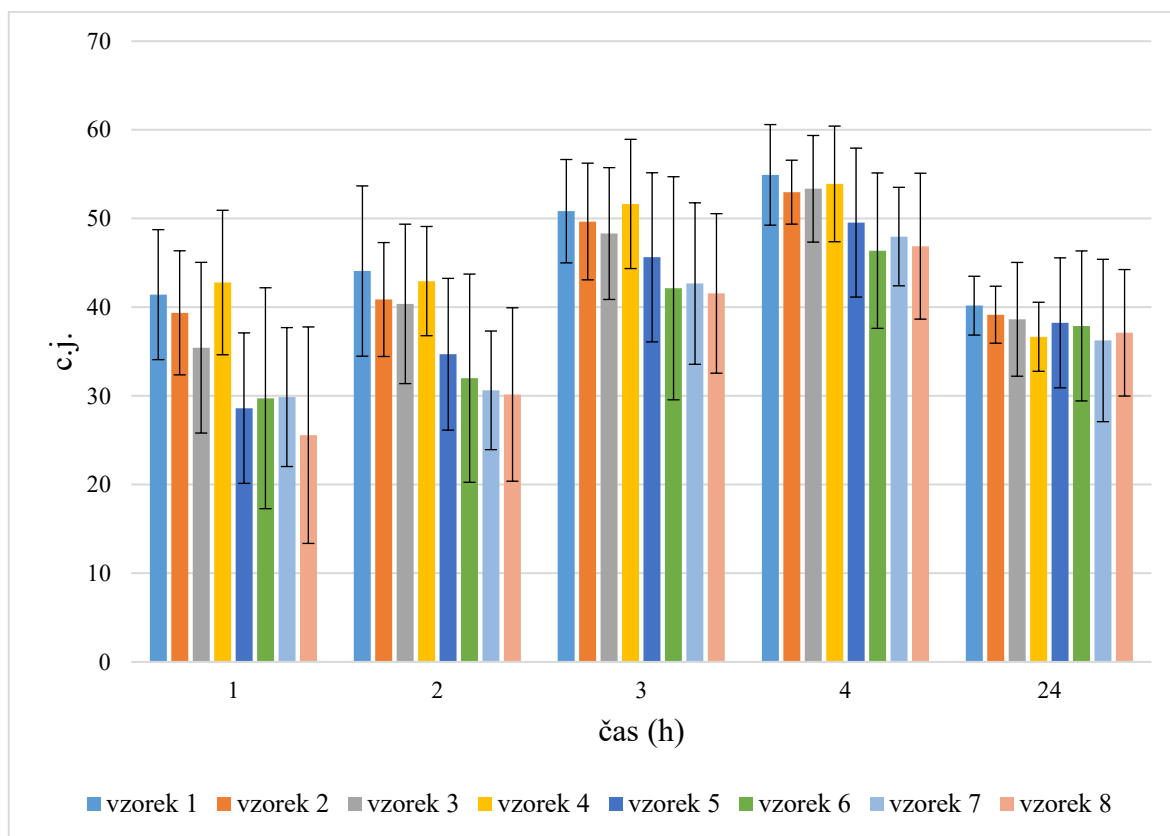
Tabulka 6 Hydratace pokožky.

Podmínky pokožky	Korneometrické jednotky (c.j.)
velmi suchá	0 – 40
suchá	40 – 70
normální	70 - 99

Tabulka 7 Průměrné hodnoty hydratace pokožky po nanesení jednotlivých vzorků v čase.

Čas (h)	Hydratace (c.j.)										
	kontrola	odmaštění	vzorky								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
0	38,32 ±9,26	29,41 ±4,31	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno
1	36,55 ±7,36	27,48 ±6,95	41,42 ±7,33	39,37 ±7,00	35,44 ±9,62	42,79 ±8,15	28,62 ±8,48	29,74 ±12,4 6	29,87 ±7,84	25,57 ±12,2 1	
2	37,73 ±8,82	30,81 ±9,83	44,08 ±9,60	40,87 ±6,43	40,38 ±8,99	42,95 ±6,16	34,70 ±8,56	32,00 ±11,7 4	30,63 ±6,69	30,16 ±9,78	
3	40,51 ±8,13	33,76 ±6,50	50,83 ±5,83	49,67 ±6,58	48,31 ±7,43	51,65 ±7,29	45,63 ±9,54	42,14 ±12,5 8	42,67 ±9,11	41,56 ±8,99	
4	43,12 ±6,93	33,99 ±7,59	54,93 ±5,67	52,98 ±3,60	53,36 ±6,01	53,91 ±6,52	49,55 ±8,40	46,38 ±8,76	47,97 ±5,55	46,89 ±8,23	
24	35,92 ±6,55	32,23 ±3,73	40,18 ±3,31	39,16 ±3,21	38,64 ±6,41	36,67 ±3,90	38,24 ±7,33	37,89 ±8,46	36,25 ±9,15	37,12 ±7,13	

Vzorky: 1(základ), 2(základ + EO saturejka), 3(základ + EO lemongrass), 4(základ + litsea cubeba), 5(základ + kyselina mandlová), 6(základ + kys. mandlová + EO saturejka), 7(základ + kys. mandlová + EO lemongrass), 8(základ + kys. mandlová + EO *Litsea cubeba*)



Obrázek 11 Vyhodnocení hydratace pokožky v čase.

8.2.2 Transepidermální ztráta vody (TEWL)

Ve stejných časech a na stejných místech pokožky byla přístrojem tewametr měřena transepidermální ztráta vody u jednotlivých probandek. Stav pokožky z hlediska transepidermální ztráty vody je charakterizován v Tabulce 8 a vyhodnocení měření TEWL jednotlivých vzorků emulzí v čase je uvedeno v Tabulce 9.

Průměrné hodnoty TEWL u všech vzorků až na výjimky vykazovaly stav pokožky hodnocený jako dobrý. Nedošlo k významné ztrátě vody z pokožky u většiny probandek. Výjimku tvořila osoba s atopickým ekzémem, pro jejíž pokožku je typická vyšší ztráta vody ze *Stratum corneum* v důsledku poškození kůže. Proto byla některá měření na základě výpočtu dle Dean-Dixonova testu vyloučena jako odlehlé hodnoty, aby nezneškodily výpočet průměru.

Při porovnání místa kontroly bez ošetření s místy ošetřenými emulzemi lze konstatovat, že emulze přispěly ke snížení ztráty vody. U kontrolního místa TEWL kolísal v čase od hodnoty $12,76 \pm 5,60$ do hodnoty $16,14 \pm 9,16$, zatímco místa ošetřená emulzemi měla hodnoty kolem 10-11 g/m²h evaporované vlhkosti. Výjimku tvořila emulze s esenciálním olejem *Litsea*

cubeba, kdy po dvou hodinách od nanesení se TEWL zvýšil na hodnotu $17,27 \pm 9,80$. Dále jeho hodnota kolísala, ale obecně byl TEWL u této formulace vyšší než u ostatních.

Nebyly prokázány ani významné rozdíly mezi vzorky obsahující kyselinu mandlovou a vzorky bez kyseliny.

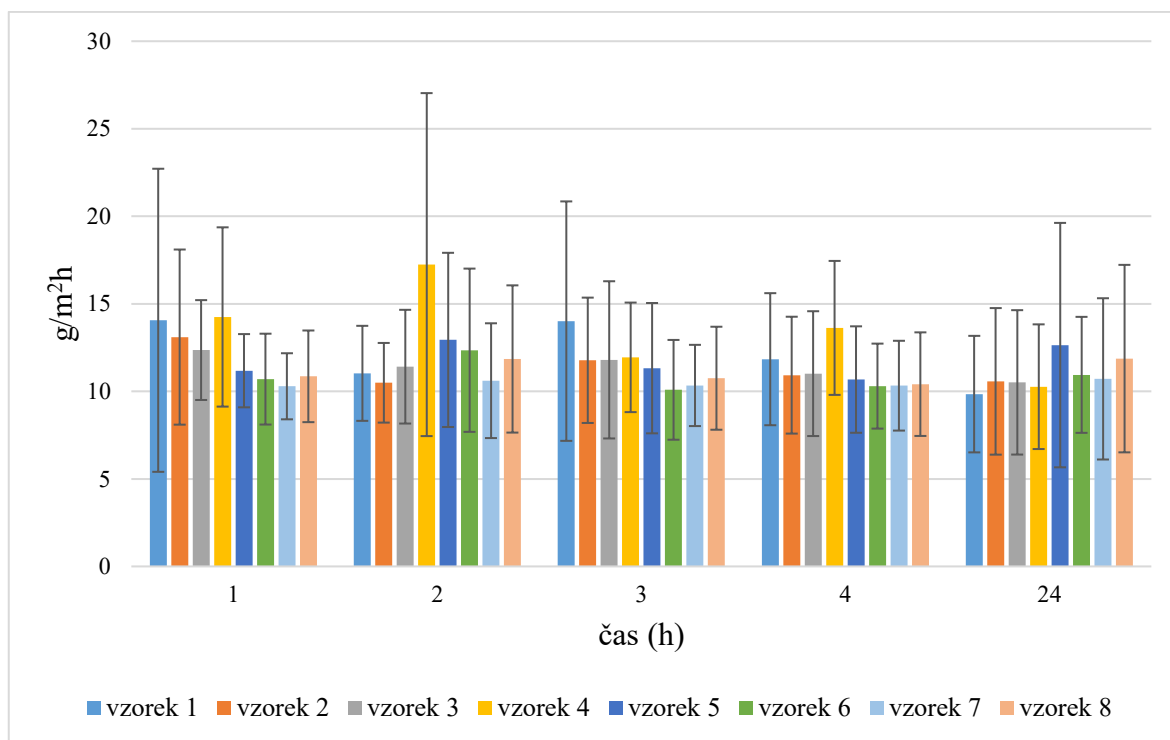
Je možné konstatovat, že pravděpodobně mají vliv na snížení hodnot transepidermální ztráty vody z pokožky hydratační složky emulzí.

Tabulka 8 Transepidermální ztráta vody z pokožky.

Stav pokožky	TEWL ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$)
velmi dobrý	0 – 9
dobrý	10 – 14
normální	15 – 25
napjatý	26 – 29
kritický	> 30

Tabulka 9 Průměrné hodnoty TEWL pokožky po nanesení vzorků v čase.

Čas (h)	TEWL (g/m ² h)									
	kontrola	odmaštění	vzorky							
			1	2	3	4	5	6	7	8
0	13,03 ±5,28	13,39 ±6,34	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno
1	15,03 ±9,03	11,11 ±2,08	14,06 ±8,66	13,10 ±5,00	12,36 ±2,85	14,25 ±5,12	11,18 ±2,09	10,70 ±2,60	10,29 ±1,89	10,86 ±2,62
2	12,98 ±2,94	11,73 ±3,97	11,03 ±2,71	10,49 ±2,27	11,41 ±3,25	17,24 ±9,80	12,94 ±4,98	12,35 ±4,66	10,61 ±3,28	11,85 ±4,21
3	16,14 ±9,16	14,29 ±7,47	14,01 ±6,84	11,78 ±3,58	11,80 ±4,49	11,94 ±3,13	11,33 ±3,72	10,09 ±2,85	10,34 ±2,32	10,75 ±2,94
4	14,46 ±5,07	12,91 ±4,50	11,84 ±3,77	10,93 ±3,34	11,01 ±3,57	13,63 ±3,83	10,68 ±3,04	10,30 ±2,43	10,33 ±2,56	10,41 ±2,96
24	12,76 ±5,60	10,86 ±4,40	9,84± 3,33	10,57 ±4,19	10,51 ±4,12	10,27 ±3,56	12,64 ±6,98	10,94 ±3,31	10,71 ±4,61	11,87 ±5,35



Obrázek 12 Vyhodnocení TEWL pokožky v čase.

8.2.3 pH pokožky

Posledním kožním testem bylo měření pH pokožky v čase na označených místech. Hodnoty pH pokožky se liší podle pohlaví. Pro ženy jsou specifikovány v Tabulce 10, neboť testů se účastnily pouze probandky. Vyhodnocení měření pH jednotlivých vzorků emulzí v čase je uvedeno v Tabulce 11.

První měření po čtyřech hodinách působení roztoku SDS bylo provedeno pouze na místě kontroly, které nebylo nijak ošetřeno a na místě odmaštění. Obě hodnoty byly téměř shodné a pH těchto míst bylo kyselé, neboť nedosahovalo ani pH 4. Za hodinu se na těchto dvou místech pH zvýšilo na hodnotu 5. V následujících hodinách oscilovalo kolem čísla 4,5, což je spodní hranice intervalu pro normální stav pokožky.

Všechna místa ošetřená emulzemi po jedné hodině od nanesení vykazala pH přesahující hodnotu pět. Vzorky neobsahující kyselinu mandlovou, kromě emulze s esenciálním olejem *Litsea cubeba*, měly v čase klesající pH, ale udržely se v intervalu nad pH 4,5. Hodnota pH u vzorků s kyselinou mandlovou nejprve klesla, ale po třech hodinách se opět zvýšila, a to v průměru o 2 desetiny. Po dvaceti čtyřech hodinách od nanesení vzorků se u základní emulze obsahující kyselinu mandlovou a u vzorku, který ještě navíc obsahoval saturejkový esenciální olej, prakticky nezměnila. Pouze u posledních dvou vzorků, které měly ve složení

kyselinu mandlovou a EO lemongrass či *Litsea cubeba*, hodnota pH ještě dále klesala až na úroveň charakterizující pokožku jako kyselou.

Tenzid SDS je iontově povrchově aktivní látka zásaditého charakteru s pH 9,1. Tento čistící prostředek může negativně ovlivnit strukturální a funkční integritu pokožky. Škodlivé účinky na pokožku jsou důsledkem alkalizace povrchu, nadměrného odstraňování lipidů a proteinů a výsledkem je poškození funkcí *Stratum corneum*. Ošetření pokožky roztokem tenzidu má tendenci zvýšit pH z normálního rozmezí 5-5,5 na 7,5. Během několika hodin po umytí se pH povrchu kůže díky pufrční kapacitě pokožky postupně snižuje k normálnímu rozmezí. Trvání krátkodobého zvýšení pH závisí na stavu pokožky, frekvenci mytí a složení čistícího produktu [49].

Ačkoli výše uvedené studie hovoří o krátkodobém zvýšení pH pokožky po použití tenzidů, v tomto experimentu byly v místě odmaštění roztokem SDS bezprostředně po odstranění filtračních pásků napuštěných tímto roztokem naměřeny nízké hodnoty pH odpovídající kyselému povrchu kůže. Svou roli může hrát věk probandek (31-53 let), používání osobních kosmetických prostředků, užívaných léků, mikrobiom pokožky a kožní onemocnění. V úvahu při interakci povrchově aktivní látky s pokožkou je nutné také brát strukturu a adsorpci použitého tenzidu.

Po aplikaci emulzí se pH pohybovalo v průměru kolem hodnoty 5, v čase se postupně mírně snižovalo a v některých případech se poté opět lehce zvýšilo. Po celou dobu měření se neodchýlilo od intervalu klasifikovaném jako neutrální pH pokožky.

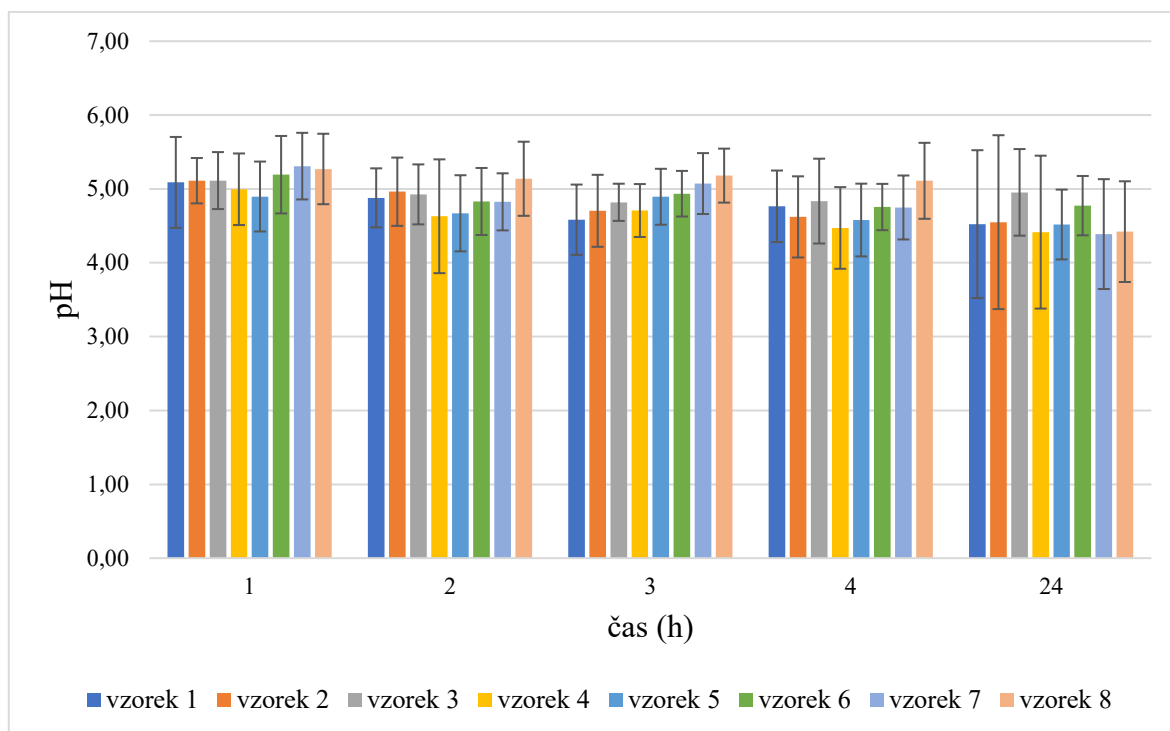
Buraczewska a Loden (2005) provedli studii na lidských dobrovolnicích na kůži poškozené povrchově aktivními látkami, aby prozkoumali předchozí poznatky o obnově kožní bariéry po aplikaci neutrálního a kyselého roztoku. Na základě měření jejich studie neprokázala rozdíly týkající se obnovy kožní bariéry mezi krémy s pH 4 a 7,5. Existuje mnohem více studií, které srovnávají účinnost různých vehikul a účinných látek spíše než přípravky s různým pH. Například ve studii Pavlačková *et al.* (2019) hodnotící různé krémy s obsahem panthenolu bylo potvrzeno, že aplikace krému zvýšila hydrataci pokožky, snížila TEWL a posunula pH pokožky směrem k neutrálním hodnotám. Byl učiněn závěr, že výsledky byly ovlivněny typem vehikula a koncentrací panthenolu, ale nebyly odhaleny žádné informace týkající se pH formulace [49].

Tabulka 10 Hodnoty pH pokožky.

pH ženy	Stav pokožky
3,5 – 4,5	kyselý
4,5 – 5,5	normální
nad 5,5	zásaditý

Tabulka 11 Průměrné hodnoty pH pokožky po nanesení vzorků v čase.

Čas (h)	pH										
	kontrola	odmaštění	vzorky								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
0	3,94± 0,52	3,97± 0,43	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno
1	4,98± 1,10	4,91± 0,57	5,09± 0,62	5,11± 0,31	5,11± 0,39	5,00± 0,48	4,90± 0,47	5,19± 0,52	5,31± 0,45	5,27± 0,48	
2	4,56± 0,38	4,83± 0,46	4,88± 0,40	4,96± 0,46	4,93± 0,41	4,63± 0,77	4,67± 0,52	4,83± 0,45	4,83± 0,39	5,14± 0,50	
3	4,72± 0,48	4,77± 0,55	4,58± 0,48	4,70± 0,49	4,82± 0,25	4,71± 0,36	4,89± 0,38	4,94± 0,31	5,07± 0,41	5,18± 0,37	
4	4,37± 0,54	4,50± 0,66	4,77± 0,48	4,62± 0,55	4,84± 0,57	4,47± 0,55	4,58± 0,49	4,76± 0,31	4,75± 0,43	5,11± 0,51	
24	4,68± 1,11	4,63± 0,77	4,52± 1,00	4,55± 1,18	4,95± 0,59	4,42± 1,04	4,52± 0,47	4,77± 0,40	4,39± 0,74	4,42± 0,68	



Obrázek 13 Vyhodnocení pH pokožky v čase.

8.3 Test přežívání bakterií v emulzi

Jednotlivé vzorky emulzí byly inokulovány bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* a skladovány v laboratorní teplotě. Vyhodnocení životaschopných kolonií bakterií proběhlo po 7, 14 a 28 dnech.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla odolnější vůči esenciálním olejům a dalším složkám obsaženým v emulzích než *Staphylococcus aureus*.

Po sedmi dnech skladování pouze základní emulze bez esenciálních olejů vykázala měřitelné množství kolonií *S. aureus* v objemu $6,6 \times 10^3$ CFU/g. Na hranici meze detekce byly počty kolonií *S. aureus* ještě změřeny u emulze s esenciálním olejem lemongrass a u emulze s kyselinou mandlovou a esenciálním olejem *Litsea cubeba*. Ostatní emulze víceméně inhibovaly růst bakterie *S. aureus* (Obrázek 13).

U *Pseudomonas aeruginosa* naopak došlo v základní emulzi k několikanásobnému nárůstu počtu kolonií až k množství 10^7 CFU/g a v emulzi s kyselinou mandlovou a saturejkovým EO $> 10^6$ CFU/g. Ve vzorku s esenciálním olejem *Litsea cubeba* (Obrázek 12) a ve vzorku obsahujícím kyselinu mandlovou a EO lemongrass byly kolonie detekovány v řádu 10^3 CFU/g.

Tabulka 12 Vyhodnocení životaschopných kolonií bakterií v emulzích v čase.

dny měření	7.		14.		28.	
	SA (CFU/g)	PA (CFU/g)	SA (CFU/g)	PA (CFU/g)	SA (CFU/g)	PA (CFU/g)
1	$6,6 \times 10^3$	$\sim 10^7$	$< 2 \times 10^2$	$2,52 \times 10^7$	$< 2 \times 10^2$	$5,41 \times 10^6$
2	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	4×10^2	$< 2 \times 10^2$
3	2×10^2	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 3 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$
4	$< 2 \times 10^2$	$9,4 \times 10^3$	$< 2 \times 10^2$	$> 10^6$	2×10^2	$3,08 \times 10^5$
5	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$
6	$< 2 \times 10^2$	$> 10^6$	$< 2 \times 10^2$	$1,07 \times 10^6$	$< 2 \times 10^2$	$4,84 \times 10^5$
7	$< 2 \times 10^2$	2×10^3	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$
8	2×10^2	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$	$< 2 \times 10^2$

Pozn. SA (*Staphylococcus aureus*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), CFU = colony forming units (počet kolonií), označení vzorků viz Tabulka 2

Po čtrnácti dnech skladování byl *S. aureus* zcela inhibován a odečet kolonií byl pod detekčním limitem 2×10^2 CFU/g.

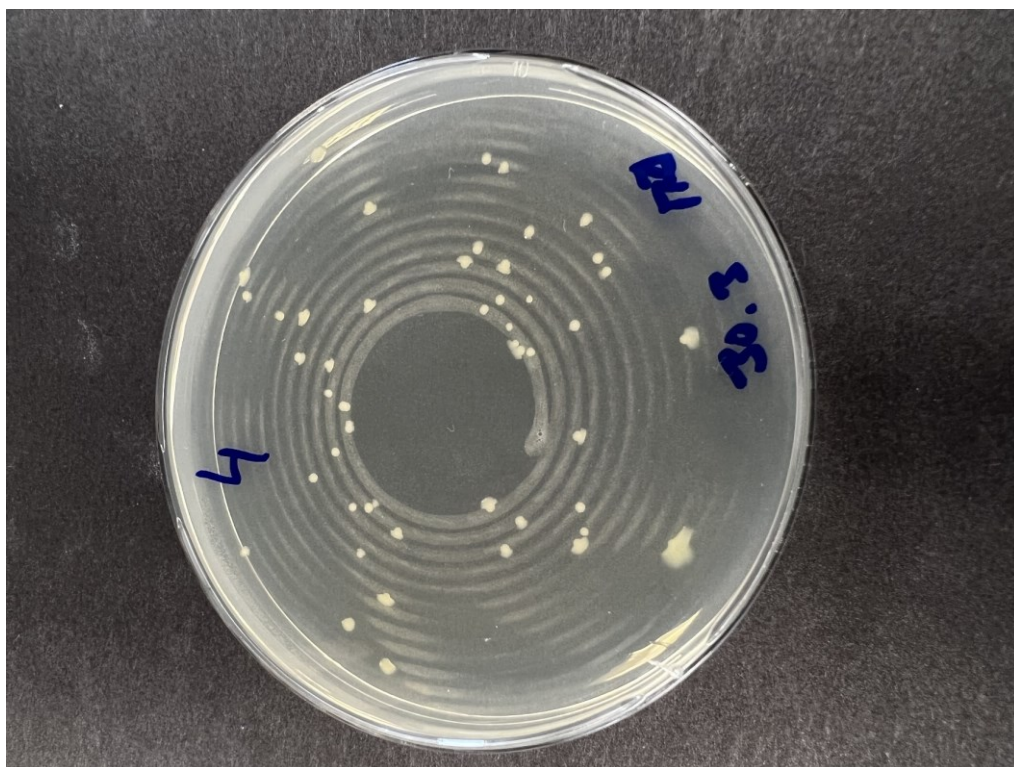
Naopak *P. aeruginosa* prokázala velkou životaschopnost a v základní emulzi narostl počet kolonií na hodnotu $2,52 \times 10^7$ CFU/g. A také opět emulze s EO *Litsea cubeba* a s kyselinou mandlovou a saturejkou měly počet životaschopných kolonií v řádu 10^6 CFU/g. V ostatních vzorcích byly kolonie pod měřitelným limitem.

Po 28 dnech na agarové plotně *S. aureus* narostly kolonie v počtu 4×10^2 ve vzorku se saturejkovým esenciálním olejem a v objemu 2×10^2 v emulzi s EO *Litsea cubeba*. Ostatní vzorky zůstaly bez měřitelné detekce.

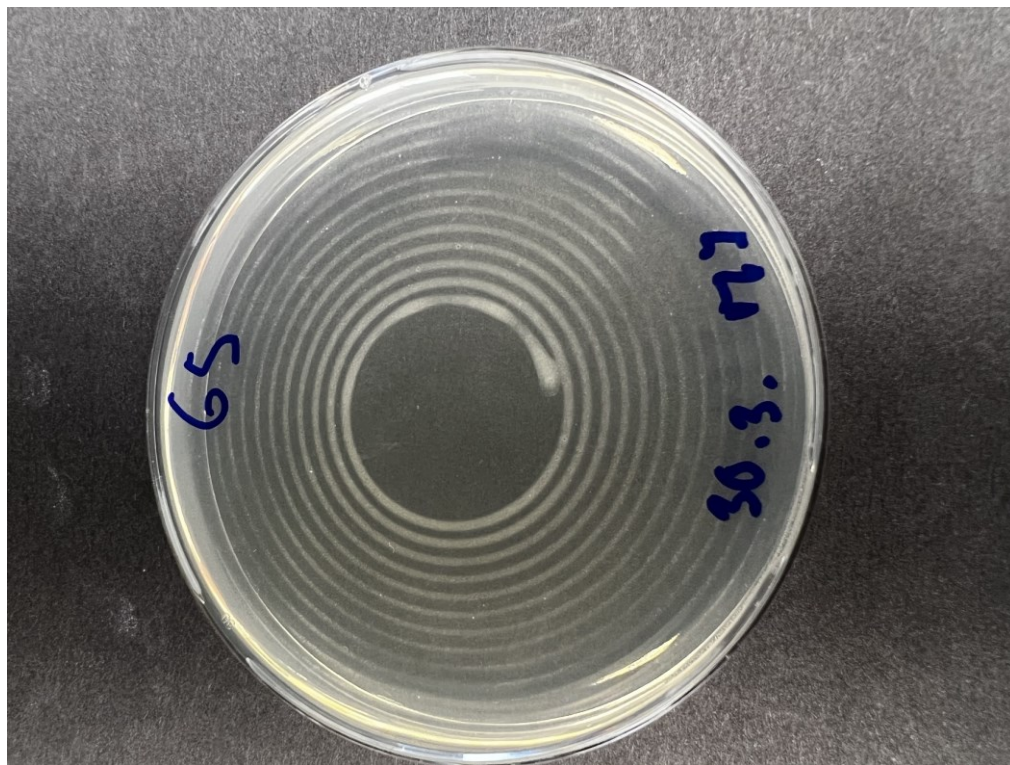
V suspenzích obsahujících *P. aeruginosa* zůstávají vysoké počty životaschopných buněk pouze v základní emulzi a také ve vzorku s EO *Litsea cubeba* a ve vzorku s kyselinou mandlovou a saturejkou. Ostatní emulze byly pod detekčním limitem.

Nejnižší inhibiční účinky vůči gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* měl saturejkový esenciální olej a *Litsea cubeba*, ale pouze ve spojení s kyselinou mandlovou.

Obecně se uvádí, že grampozitivní bakterie jsou citlivější na vliv esenciálních olejů než gramnegativní bakterie z důvodu jednoduššího uspořádání buněčné stěny. To potvrzují i mnohé studie, např. Bajpai & Baek (2016), Helander *et al.* (1998), Nazzaro *et al.* (2013), když hovoří o vyšší citlivosti k esenciálním olejům kvůli rozdílům ve složení buněčné stěny. Podle studie Nazzaro *et al.* (2013) je antibakteriální účinek esenciálních olejů a jejich složek spojen s jejich lipofilní povahou, která jim umožňuje hromadit se v membránách a působit tak na jejich destrukci. Některé studie (Alderees *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2012) naznačují, že antimikrobiální účinnost některých esenciálních olejů nahrazuje konvenční antimikrobiální látky [50].



Obrázek 14 Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* v emulzi s EO *Litsea cubeba* po 7 dnech kultivace [vlastní zdroj].



Obrázek 15 Kolonie *S. aureus* v emulzi s kyselinou mandlovou a EO saturejka po 7 dnech kultivace [vlastní zdroj].

8.4 Vyhodnocení sensorického měření

Hodnocení sensorických znaků proběhlo dotazníkovou metodou (Příloha P I). Experimentu se zúčastnilo 13 osob, z toho 12 žen a 1 muž.

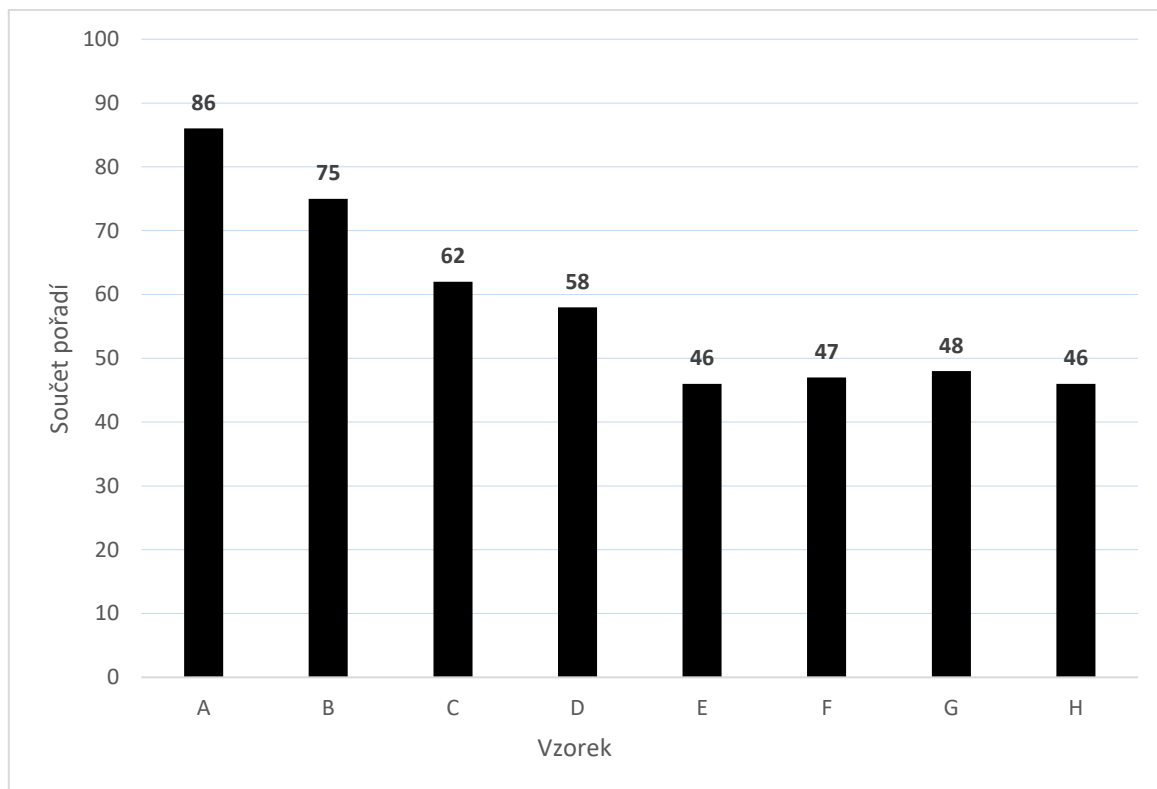
8.4.1 Pořadová zkouška na roztíratelnost

Hodnotitelé měli seřadit anonymizované vzorky od nejlépe roztíratelného po nejhůře roztíratelný dle osobního posouzení.

Nulová (testovaná) hypotéza je postavena na skutečnosti, že mezi jednotlivými vzorky nejsou statisticky významné rozdíly.

Alternativní hypotéza naproti tomu předpokládá, že existuje alespoň jeden vzorek, který se liší od druhých vzorků. Výpočet testového kritéria byl proveden dle rovnice 1 a kritický obor dle rovnice 2.

Hodnota testového kritéria padla do kritického oboru. Nulovou hypotézu je nutno zamítnout a přijmout alternativní hypotézu. Na hladině významnosti 0,05 se podařilo prokázat s 95% spolehlivostí, že mezi vzorky existuje alespoň jeden, který se liší od ostatních.



Obrázek 16 Výsledky pořadové zkoušky na roztíratelnost.

Kódování vzorků je uvedeno v Tabulce 3.

Na základě součtu pořadí (Příloha P II) bylo určeno, vzorek byl posuzovateli hodnocen jako nejlépe roztíratelný a který nejhůře roztíratelný. Nejlepší roztíratelnost byla přiřazena vzorku E (základní emulze s přidavkem kyseliny mandlové) a vzorek H (základní emulze s kyselinou mandlovou a esenciální olejem *Litsea cubeba*). Nejhorší roztíratelnost byla stanovena u vzorku A (základní emulze), zřejmě z důvodu vysoké viskozity. Obecně emulze s přidavkem kyseliny mandlové byly hodnoceny jako sensoricky příjemnější s lepší roztíratelností. Tyto vzorky měly díky přidávky kyseliny mandlové nižší viskozitu než vzorky bez kyseliny mandlové.

8.4.2 Pořadová zkouška preference konkrétního vzorku

Hodnotitelé měli nucenou volbou zvolit vzorek, který nejvíce preferují s posouzením všech sensorických hledisek, jako je barva, vůně, konzistence, roztíratelnost. Opět byla stanovena nulová a alternativní hypotéza a proveden výpočet testového kritéria a kritického oboru.

Hodnota testového kritéria nepadla do kritického oboru. Nulová hypotéza tedy není zamítnuta. S 95% spolehlivostí se nepodařil prokázat rozdíl mezi preferencemi vzorků jednotlivých hodnotitelů.

Výpočty a pořadí preferencí jsou uvedeny v Příloze P III.

8.4.3 Párová zkouška vstřebatelnosti

Byly vytvořeny zakódované dvojice vzorků. Hodnotitelé měli dle své preference zakroužkovat lépe vstřebatelný vzorek z dané dvojice. Jednalo se o jednostranný párový test s nucenou volbou.

Pro každou dvojici vzorků byla stanovena nulová hypotéza, která spočívá v tom, že mezi vzorky nejsou statisticky významné rozdíly a alternativní hypotéza, která hovoří o tom, že vzorek A je vstřebatelnější než vzorek B. Na základě výpočtu testového kritéria a kritického oboru byl stanoven výsledek. Výpočet je uveden v Příloze P IV.

Hodnota testového kritéria nepadla do kritického oboru, a tudíž nulová hypotéza nebyla zamítnuta. S 95% spolehlivostí se nepodařil prokázat rozdíl vstřebatelnosti ani u jedné dvojice vzorků.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo posoudit možnosti využití přírodních látek coby inhibitorů růstu mikroorganismů. Posuzovanými látkami byly vybrané esenciální oleje a kyselina mandlová.

Esenciální oleje díky svým chemickým složkám, zejména monoterpenické povahy, se vyznačují antimikrobiální aktivitou. Kyselina mandlová se řadí mezi hydroxykyseliny, která má díky své molekulové struktuře nižší iritační vliv na pokožku, na rozdíl od častěji používané kyseliny glykolové.

Pomocí diskové difúzní metody byla měřena inhibiční aktivita osmnácti esenciálních olejů na růst mikroorganismů. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u tymiánového a oregánového oleje z důvodu vysokého obsahu thymolu a karvakrolu, který účinně inhibuje růst mikroorganismů. Do dalších částí experimentu byly vybrány oleje, které vykazovaly zvýšený antimikrobiální účinek a zároveň nejsou příliš prostudovanými oleji. Jednalo se o saturejkový esenciální olej, lemongrassový olej a olej *Litsea cubeba*.

Na základě vlastní receptury byla vyrobena emulze z přírodních ingrediencí. Celkový objem emulze byl rozdělen na osm částí a byly vytvořeny dvě řady po čtyřech vzorcích. Do první řady byly zakomponovány esenciální oleje a jeden vzorek byl ponechán pouze v základním složení. Druhá řada byla kromě esenciálních olejů ještě obohacena roztokem kyseliny mandlové.

Vzorky emulzí byly testovány přístroji pomocí otevřených kožních testů na volárním předloktí probandů. Hodnoty hydratace měřené v korneometrických jednotkách se účinkem krémů zvyšovaly v čase bez ohledu na složení, ale zároveň bylo možné vysledovat, že přídavek kyseliny mandlové způsobil nižší hodnoty hydratace. Také se projevil vliv různého zdravotního stavu pokožky jednotlivých probandek, neboť u některých byly hodnoty hydratace vyšší nebo naopak významně nižší oproti ostatním. Dalším měřením bylo hodnoceno množství transepidermální ztráty vody a změny v pH pokožky. Zde se výrazný rozdíl mezi jednotlivými vzorky příliš neprojevil. Pouze bylo opět možné vysledovat rozdíly mezi jednotlivými účastnicemi, zvláště vysoké hodnoty TEWLu vykazovala osoba s atopickým ekzémem.

Dotazníkového šetření na preferenci konkrétního vzorku a na posouzení roztíratelnosti se zúčastnilo třináct posuzovatelů. Výsledky hodnocení byly značně rozdílné. Pořadovou zkouškou na vstřebatelnost bylo zjištěno, že mezi vzorky jsou rozdíly, ale zároveň v preferenci vzorků nebylo možné určit, který vzorek je nejvíce preferovaný, protože se

odpovědi hodnotitelů výrazně lišily. Ani u párové zkoušky, která posuzovala rozdíl mezi dvojicemi vzorků obsahujícími stejný esenciální olej s tím, že jeden ze dvojice měl ve složení navíc kyselinu mandlovou, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Nejzajímavější výsledky přinesl test přežívání bakterií v emulzi. Posuzován byl *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zatímco *S. aureus* byl v růstu inhibován ve všech vzorcích obsahujících esenciální oleje již po sedmi dnech skladování, tak gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* prokázala zvýšenou odolnost. V základní emulzi a ve vzorku obsahující esenciální olej *Litsea cubeba* došlo k vysokému nárůstu bakterií až k řádu 10^7 . Další emulzí, která neměla antimikrobiální vliv na *P. aeruginosa* byla kombinace saturejkového esenciálního oleje a kyseliny mandlové.

Poznatky zjištěné v diplomové práci mohou být východiskem k dalšímu zkoumání netradičních esenciálních olejů a jiných přírodních látek ovlivňující mikrobiální růst a jejich využití jako náhrady nebo snížení množství syntetických konzervantů v kosmetických přípravcích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BERGEROVÁ, Yvonne, BRYCHTA, Pavel a Jan J. STANEK, ed. *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0795-2.
2. FIALA, Pavel, Jiří VALENTA a Lada EBERLOVÁ. *Stručná anatomie člověka*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2693-2.
3. Don Bliss (Illustrator). Skin Anatomy: Image Details - NCI Visuals Online. [Online]. 2010-05-26 [cit. 2021-11-20]. Dostupné z: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=4604> (upraveno)
4. ZÁHEJSKÝ, Jiří. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.
5. RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter H. C. BURGDORF. *Kapesní atlas dermatologie*. Přeložil Marta CETKOVSKÁ, přeložil Pavel CHALOUPKA. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.
6. NEVORALOVÁ, Zuzana, Jarmila RULCOVÁ a Nina BENÁKOVÁ. *Obličejové dermatózy*. Praha: Mladá fronta, 2016. Aeskulap. ISBN 978-80-204-4107-2.
7. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-3210-0.
8. KHAYYIRA, Amalia Sitti, Aulia Elfa ROSDINA, Marina Ika IRIANTI a Amarila MALIK. Simultaneous profiling and cultivation of the skin microbiome of healthy young adult skin for the development of therapeutic agents. *Heliyon* [online]. 2020, 6(4) [cit. 2021-11-28]. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03700>
9. BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.
10. HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
11. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-7080-521-8.

12. GALLO, Richard L. a Teruaki NAKATSUJI. Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2011, 131(10), 1974-1980 [cit. 2021-12-04]. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2011.182>
13. KOH, Li Fang, Ruo Yan ONG a John E. COMMON. Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergology International* [online]. 2022, 71(1), 31-39 [cit. 2021-12-04]. ISSN 13238930. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.11.001>
14. HEBERT, Adelaide A., Theodore ROSEN, Núria ALBAREDA LÓPEZ, Ilonka ZSOLT a Xavier MASRAMON. Safety and efficacy profile of ozenoxacin 1% cream in pediatric patients with impetigo. *International Journal of Women's Dermatology* [online]. 2020, 6(2), 109-115 [cit. 2021-12-04]. ISSN 23526475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.10.008>
15. OLIVEIRA, Ana S., Joana ROLO, Carlos GASPAS, et al. Chemical characterization and bioactive potential of *Thymus × citriodorus* (Pers.) Schreb. preparations for anti-acne applications: Antimicrobial, anti-biofilm, anti-inflammatory and safety profiles. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2022, 287 [cit. 2021-12-05]. ISSN 03788741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114935>
16. RIGOPOULOS, Dimitris, Dimitris IOANNIDES, Dimitris KALOGEROMITROS a Andreas D. KATSAMBAS. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. *Clinics in Dermatology* [online]. 2004, 22(5), 408-411 [cit. 2021-12-05]. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.03.013>
17. SÚKL. Retinoidy – program prevence početí. Oddělení farmakovigilance [online]. ©2018 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: [Retinoidy – Program prevence početí, Státní ústav pro kontrolu léčiv \(sukl.cz\)](https://www.sukl.cz/retinoidy-program-prevence-poceti)
18. BURCHACKA, E., P. POTACZEK, P. PADUSZYŃSKI, K. KARŁOWICZ-BODALSKA, T. HAN a S. HAN. New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2016, 83, 771-775 [cit. 2021-12-10]. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.014>
19. BRAMMANN, Christoph a Christel C. MÜLLER-GOYMANN. An update on formulation strategies of benzoyl peroxide in efficient acne therapy with special

- focus on minimizing undesired effects. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 578 [cit. 2021-12-10]. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119074>
20. WINKELMAN, Warren J. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clinics in Dermatology* [online]. 2018, 36(3), 299-305 [cit. 2021-12-12]. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2018.03.004>
21. PRYDDERCH, Hannah, Annette HAIB, Marcel SPULAK, Brid QUILTY, Klaus KÜMMERER, Andreas HEISE a Nicholas GATHERGOOD. Mandelic acid derived ionic liquids: synthesis, toxicity and biodegradability. *RSC Advances* [online]. 2017, 7(4), 2115-2126 [cit. 2022-05-04]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.10.1039/C6RA25562K>
22. DĘBOWSKA, Renata M., Aleksandra KASZUBA, Iwona MICHALAK, Agata DZWIGAŁOWSKA, Czanita CIEŚCIŃSKA, Elżbieta JAKIMIUK, Joanna ZIELIŃSKA a Andrzej KASZUBA. Evaluation of the efficacy and tolerability of mandelic acid-containing cosmetic formulations for acne skin care. *Dermatology Review* [online]. 2015, 4, 316-321 [cit. 2022-05-04]. ISSN 0033-2526. Dostupné z: <https://doi.10.5114/dr.2015.53419>
23. Kyselina mandlová. *Wikipedia* [online]. 2021 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://no-regime.com/ru-decs/wiki/Mandels%C3%A4ure>
24. HALLA, Noureddine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO, et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules* [online]. 2018, 23(7) [cit. 2022-05-05]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.10.3390/molecules23071571>
25. RIBEIRO, Ana, Marilene ESTANQUEIRO, M. OLIVEIRA a José SOUSA LOBO. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics* [online]. 2015, 2(2), 48-65 [cit. 2022-05-05]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.10.3390/cosmetics2020048>
26. HERMAN, Anna, Andrzej Przemysław HERMAN, Beata Wanda DOMAGALSKA a Andrzej MŁYNARCZYK. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2013, 53(2), 232-237 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <https://doi.10.1007/s12088-012-0329-0>

27. BAŞER, K. Hüsnü Can a Gerhard BUCHBAUER, ed. *Handbook of Essential Oils* [online]. Third edition. | Boca Raton: CRC Press, [2020]: CRC Press, 2020 [cit. 2022-01-10]. ISBN 9781351246460. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9781351246460>
28. JINDROVÁ, Alena. Kouzlo esence. Esenciální oleje: *Destilace esenciálního oleje* [online]. 2020 [cit. 2022-01-10]. Dostupné z: <https://kouzloesence.cz/esencialni-oleje/>
29. MANGALAGIRI, Naga Parameswari, Shravan Kumar PANDITI a Naveena Lavanya Latha JEEVIGUNTA. Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon* [online]. 2021, 7(4) [cit. 2022-01-15]. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.heliyon.2021.e06835>
30. Složení a specifikace produktů. *Nobilis Tilia* [online]. 2003-2022 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: <https://eshop.nobilis.cz/>
31. Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. In: *Úřední věstník Evropské unie* [online]. 2009 [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=ET>
32. Directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. In: *Official Journal of the European Union* [online]. 2003 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ%3AL%3A2003%3A066%3A0026%3A0035%3AEN%3APDF>
33. KREJČÍ, Jiří. *Kosmetické přípravky a prostředky*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
34. KOPECKÁ, J., ROTKOVÁ, G. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, ©2017 [cit. 2022-01-22]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/stanoveni_citlivosti_atb.html

35. Products information. *EnviroDerm services* [online]. [cit. 2021-12-11]. Dostupné z: <https://www.enviroderm.co.uk/products/corneometer-cm-825>
36. Products information. *EnviroDerm services* [online]. [cit. 2021-12-11]. Dostupné z: <https://www.enviroderm.co.uk/products/tewameter-tm-300>
37. Products information. *MEDELINK Skin research solution* [online]. 2022 [cit. 2021-12-11]. Dostupné z: <https://medelink.ca/research-devices/probes/sub-page-skin-ph-meter-ph905/>
38. KŘÍŽ, Oldřich, František BUŇKA a Jan HRABĚ. *Senzorická analýza potravin II.: statistické metody*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2007. ISBN 978-80-7318-494-0.
39. LIU, Ting, Jiamu KANG a Liu LIU. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. *LWT* [online]. 2021, **136** [cit. 2022-05-05]. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.lwt.2020.110354>
40. Charakteristika rostliny. *Botany* [online]. 2007-2019 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/satureja-montana/>
41. CUI, Haiying, Yiwei WANG, Changzhu LI, Xiaochen CHEN a Lin. Antibacterial efficacy of *Satureja montana* L. essential oil encapsulated in methyl- β -cyclodextrin/soy soluble polysaccharide hydrogel and its assessment as meat preservative. *LWT* [online]. 2021, **152** [cit. 2022-05-05]. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.lwt.2021.112427>
42. VITANZA, Luca, Alessandro MACCELLI, Massimiliano MARAZZATO, et al. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2019, **126**, 323-331 [cit. 2022-05-05]. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.micpath.2018.11.025>
43. BONFERONI, Maria Cristina, Giuseppina SANDRI, Silvia ROSSI, et al. A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017, **152**, 385-392 [cit. 2022-05-06]. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.colsurfb.2017.01.043>

44. Informace o produktu. *Nature store* [online]. 2022 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <http://www.nature-store.cz/eo-esencialni-oleje/eo-litsea-cubeba-bio-10ml/>
45. HU, Wei, Changzhu LI, Jinming DAI, Haiying CUI a Lin. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, **130**, 34-41 [cit. 2022-05-06]. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.indcrop.2018.12.078>
46. DAI, Jinming, Changzhu LI, Haiying CUI a Lin. Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against *E. coli* O157: H7 and its application in vegetable juices. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2021, **338** [cit. 2022-05-06]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108989>
47. LEVI, Kemal, Alice KWAN, Allison S. RHINES, Mihaela GORCEA, David J. MOORE a Reinhold H. DAUSKARDT. Effect of glycerin on drying stresses in human stratum corneum. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2011, **61**(2), 129-131 [cit. 2022-05-07]. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.jdermsci.2010.11.011>
48. KUMAR, Ramesh, Amit Kumar SINGH, Ashutosh GUPTA, Anupam BISHAYEE a Abhay K. PANDEY. Therapeutic potential of Aloe vera—A miracle gift of nature. *Phytomedicine* [online]. 2019, **60** [cit. 2022-05-07]. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.phymed.2019.152996>
49. LUKIĆ, Milica, Ivana PANTELIĆ a Snežana D. SAVIĆ. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics* [online]. 2021, **8**(3) [cit. 2022-05-10]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.10.3390/cosmetics8030069>
50. MUKURUMBIRA, A.R., R.A. SHELLIE, R. KEAST, E.A. PALOMBO a S.R. JADHAV. Encapsulation of essential oils and their application in antimicrobial active packaging. *Food Control* [online]. 2022, **136** [cit. 2022-05-08]. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.10.1016/j.foodcont.2022.108883>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CFU	colony forming units (počet kolonií)
c.j.	korneometrická jednotka
EO	esenciální olej
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> (Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>)
O/V	typ emulze olej ve vodě
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
RCA	Reinforced Clostridial Agar (klostridiální zesílený agar)
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	skenovací (řádovací) elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TEWL	Transepidermal Water Lose (transepidermální ztráta vody)
V/O	typ emulze voda v oleji

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura kůže [3, upraveno].	12
Obrázek 2 Kyselina mandlová [23].	18
Obrázek 3 Destilační přístroj [28].	23
Obrázek 4 RCA agar s disky napuštěnými esenciálními oleji [vlastní zdroj].	36
Obrázek 5 Spirál plater Eddy Jet 2W [vlastní zdroj].	39
Obrázek 6 Automatické počítadlo Sphere Flash [vlastní zdroj].	39
Obrázek 7 Nanesené vzorky na volárním předloktí [vlastní zdroj].	40
Obrázek 8 Korneometr CM825 [vlastní zdroj].	41
Obrázek 9 Tewametr TM300 [vlastní zdroj].	42
Obrázek 10 pH metr PH905 [vlastní zdroj].	43
Obrázek 11 Vyhodnocení hydratace pokožky v čase.	53
Obrázek 12 Vyhodnocení TEWL pokožky v čase.	56
Obrázek 13 Vyhodnocení pH pokožky v čase.	60
Obrázek 14 Kolonie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v emulzi s EO <i>Litsea cubeba</i>	62
Obrázek 15 Kolonie <i>S. aureus</i> v emulzi s kyselinou mandlovou a EO saturejka.	63
Obrázek 16 Výsledky pořadové zkoušky na roztíratelnost.	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení základní emulze – rozpis na 100 g.....	37
Tabulka 2 Složení vzorků emulzí.	38
Tabulka 3 Emulze a jejich kódy v senzorickém dotazníku.	45
Tabulka 4 Inhibiční účinky esenciálních olejů na G ⁺ bakterie a kvasinku.	46
Tabulka 5 Inhibiční účinky esenciálních olejů na G ⁻ bakterie.....	47
Tabulka 6 Hydratace pokožky.	51
Tabulka 7 Průměrné hodnoty hydratace pokožky po nanesení jednotlivých vzorků v čase.	52
Tabulka 8 Transepidermální ztráta vody z pokožky.....	54
Tabulka 9 Průměrné hodnoty TEWL pokožky po nanesení vzorků v čase.....	55
Tabulka 10 Hodnoty pH pokožky.....	58
Tabulka 11 Průměrné hodnoty pH pokožky po nanesení vzorků v čase.....	59
Tabulka 12 Vyhodnocení životaschopných kolonií bakterií v emulzích v čase.....	61

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Senzorický dotazník

PŘÍLOHA P II: Hodnocení emulzí na roztíratelnost pomocí Friedmanova testu

PŘÍLOHA P III: Hodnocení preference emulzí pomocí Friedmanova testu

PŘÍLOHA P IV: Párová zkouška na vstřebatelnost

PŘÍLOHA P I: SENZORICKÝ DOTAZNÍK

DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ EMULZÍ

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická

Jméno:

Datum:

Hodnocení č. 1 – pořadová zkouška na roztíratelnost

Seřadte předložené vzorky emulzí podle roztíratelnosti (1 – nejlépe roztíratelný vzorek, 8 – nejhůře roztíratelný vzorek):

Jedná se o nucenou volbu, každý vzorek musí mít přidělené odlišné pořadí.

vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H
roztíratelnost								

Hodnocení č. 2

Seřadte předložené vzorky emulzí dle vlastní preference (1 – nejvíce preferovaný, 8 – nejméně preferovaný).

Jedná se o nucenou volbu, každý vzorek musí mít přidělené odlišné pořadí.

vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H
preference								

Hodnocení č. 3 – párová zkouška na vstřebatelnost

Porovnejte dvojice vzorků s ohledem na vstřebatelnost. Lépe vstřebatelný vzorek zakroužkujte.

vzorek	A	E
	B	F
	C	G
	D	H

Kódování vzorků

- A základ
- B základ + saturejka
- C základ + lemongras
- D základ + litsea cubeba
- E emulze s kyselinou mandlovou
- F emulze s kyselinou mandlovou + saturejka
- G emulze s kyselinou mandlovou + lemongras
- H emulze s kyselinou mandlovou + litsea cubeba

**PŘÍLOHA P II: HODNOCENÍ EMULZÍ NA ROZTÍRATELNOST
POMOCÍ FRIEDMANOVA TESTU**

Hodnotitel	vzorek							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	8	7	1	2	6	5	3	4
2	2	5	8	7	1	3	4	6
3	6	3	1	2	8	7	5	4
4	6	7	5	8	1	2	4	3
5	8	7	6	5	2	3	4	1
6	8	6	7	5	2	1	3	4
7	8	6	7	5	4	3	1	2
8	8	7	3	4	5	6	2	1
9	8	7	5	6	3	2	4	1
10	8	7	6	5	4	3	2	1
11	6	5	3	1	2	4	8	7
12	8	7	6	5	1	2	3	4
13	2	1	4	3	7	6	5	8
T_i	86	75	62	58	46	47	48	46
T_i^2	7396	5625	3844	3364	2116	2209	2304	2116

$$\sum T_i^2 = 28\,974$$

testové kritérium:

$$FR = \frac{12}{n * R * (R + 1)} * \sum_{i=1}^R T_i^2 - 3 * n * (R + 1)$$

$$FR = \frac{12}{13 * 8 * (8 + 1)} * 28\,974 - 3 * 13 * (8 + 1) = 20,45$$

kritický obor:

$$FR \geq Q_{1-\alpha}(R; n)$$

$$FR \geq Q_{0,95}(8; 13)$$

$$20,45 \geq 13,76$$

**PŘÍLOHA P III: HODNOCENÍ PREFERENCE EMULZÍ POMOCÍ
FRIEDMANOVA TESTU**

Hodnotitel	vzorek							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	4	7	6	2	3	8	5	1
2	1	8	6	4	2	7	5	3
3	3	5	1	2	8	7	4	6
4	8	3	2	1	7	5	4	6
5	8	7	3	2	4	5	6	1
6	8	6	7	5	3	2	1	4
7	8	3	2	4	6	5	7	1
8	4	3	1	2	8	5	6	7
9	5	8	3	2	6	7	1	4
10	3	1	7	8	5	6	2	4
11	5	4	2	1	3	6	8	7
12	8	6	4	3	7	5	2	1
13	1	2	4	3	8	6	5	7
T_i	66	63	48	39	70	74	56	52
T_i^2	4356	3969	2304	1521	4900	5476	3136	2704

$$\sum T_i^2 = 28\,366$$

testové kritérium:

$$FR = \frac{12}{n * R * (R + 1)} * \sum_{i=1}^R T_i^2 - 3 * n * (R + 1)$$

$$FR = \frac{12}{13 * 8 * (8 + 1)} * 28\,366 - 3 * 13 * (8 + 1) = 12,65$$

kritický obor:

$$FR \geq Q_{1-\alpha}(R; n)$$

$$FR \geq Q_{0,95}(8; 13)$$

$$12,65 \leq 13,76$$

PŘÍLOHA P IV: PÁROVÁ ZKOUŠKA NA VSTŘEBATELNOST

	Dvojice porovnávaných vzorků							
	A	E	B	F	C	G	D	H
Počet preferencí	6	7	9	4	9	4	6	7

Vzorový výpočet pro dvojici vzorků A E

testové kritérium:

$$F = \frac{n_A}{n - n_A + 1}$$
$$F = \frac{7}{13 - 7 + 1} = 1$$

kritický obor:

$$F \geq F_{1-\alpha}(v_1; v_2)$$

$$1 \geq F_{0,95}(14; 14)$$

$$1 \leq 2,48$$

stupně volnosti:

$$v_1 = 2(n - n_A + 1)$$

$$v_2 = 2 * n_A$$