

# Mikroemulze s obsahem esenciálních olejů

Ivana Slováková

---

Bakalářská práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana SLOVÁKOVÁ**  
Osobní číslo: **T090061**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**

Téma práce: **Mikroemulze s obsahem esenciálních olejů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na mikroemulze, jejich rozdělení, vlastnosti, stabilitu a metody přípravy. Věnujte se rovněž esenciálním olejům a jejich antimikrobním vlastnostem.

### II. Praktická část

1. V experimentální části práce připravte mikroemulze s olejovou fází tvořenou vybranými esenciálními oleji a vhodnými metodami je charakterizujte. Získané výsledky přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BAREL, A.O., PAYE, M., MAIBACH, H. I.: Eds.: Handbook of Cosmetic Science and Technology. Marcel Dekker Inc.: New York, 2001, 886 p., ISBN 0-8247-0292-1.

[2] FANUN M.: Ed.: Microemulsions, Properties and Applications. (Surfactant Science Series 144). CRC: Press Boca Raton, 2009, 533 p., ISBN 978-1-4200-8959-2.

[3] VONÁŠEK, F., E. TREPKOVÁ a L. NOVOTNÝ: Látky vonné a chuťové.

SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p.: Praha, 1987.

[4] BERGER, Ralf G. Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. New York: Springer, 2007, 648 p. ISBN 978-3-540-49338-9.

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**24. února 2012**


Termín odevzdání bakalářské práce:

**21. května 2012**

Ve Zlíně dne 24. února 2012

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



  
doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ..... SLOVÁKOVÁ NANA .....

Obor: ..... CHTP-KS .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ..... 14.5.2012 .....

.....  
.....

<sup>2)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů. V teoretické části je zaměřena na popis emulzních systémů, jejich rozdělení, složení, metody přípravy, stabilitu a využití. Dále teoretická část obsahuje charakteristiku esenciálních olejů, jejich příklady a možnosti využití. Praktická část se věnuje přípravě mikroemulzí s obsahem citronového, skořicového, hřebíčkového nebo tymiánového oleje v přítomnosti etanolu jako ko-surfaktantu, surfaktantu Tween 60 a vody, respektive vody v kombinaci s propylenglykolem. K nalezení vhodného složení zajišťujícího vznik stabilních mikroemulzí byly použity fázové diagramy třísložkového systému. Možné inhibiční účinky připravených mikroemulzí byly testovány na vybraných grampozitivních a gramnegativních bakteriích.

Klíčová slova: mikroemulze, surfaktant, ko-surfaktant, esenciální olej, antibakteriální aktivita

## ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the preparation and characterization of microemulsions containing essential oils. The theoretical part focuses on the description of emulsion systems, their classification, composition, methods of preparation, stability and utilization. Essential oils are also characterized including their examples and applications. The experimental part deals with the preparation of microemulsions containing lemon, cinnamon, clove and thyme oils in the presence of ethanol as co-surfactant, surfactant Tween 60, water and water in combination with propylene glycol, respectively. To find a suitable composition ensuring the formation of stable microemulsions, the phase diagrams of three-component system were used. Possible inhibitory effects of the prepared microemulsion on selected gram-positive and gram-negative bacteria were tested.

Keywords: microemulsion, surfactant, cosurfactant, essential oil, antibacterial effect

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří svými radami a návrhy přispěli ke zpracování této bakalářské práce. Můj upřímný dík patří především doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za podnět ke zpracování tématu i za inspirativní a obětavé vedení práce, také RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D., za pomoc při provedení a vyhodnocení mikrobiologické části, laborantkám za praktické rady, rodině a blízkým.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 EMULZE</b> .....	<b>12</b>
1.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	12
1.1.1 Podle charakteru disperzního prostředí.....	12
1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu.....	12
1.1.3 Podle velikosti částic.....	12
1.2 STABILITA EMULZÍ A MIKROEMULZÍ.....	13
1.3 MIKROEMULZE.....	15
1.3.1 Typy mikroemulzí.....	15
1.3.2 Složení mikroemulzí.....	16
A. Olejová fáze.....	16
B. Surfaktant.....	16
C. Ko-surfaktant.....	20
1.4 METODY PŘÍPRAVY EMULZNÍCH SYSTÉMŮ.....	21
1.4.1 Příprava makroemulzí.....	21
1.4.2 Příprava mikroemulzí.....	21
1.4.3 Příprava nanoemulzí.....	22
1.5 POUŽITÍ MIKROEMULZÍ.....	23
<b>2 ESENCIÁLNÍ OLEJE</b> .....	<b>26</b>
2.1 SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	26
2.1.1 Neterpenoidní uhlovodíky.....	26
2.1.2 Terpenoidní uhlovodíky.....	26
2.1.2.1 Fenylypropanoidy.....	27
2.1.2.2 Laktony.....	28
2.2 POPIS ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	28
2.2.1 Citronový olej.....	28
2.2.2 Hřebíčkový olej.....	29
2.2.3 Skořicový olej.....	29
2.2.4 Tymiánový olej.....	29
2.3 BIOAKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ A JEJICH SLOŽEK.....	30
2.3.1 Antimikrobní aktivita.....	30
2.3.2 Antivirová aktivita.....	31
2.3.3 Antioxidační aktivita.....	31
2.3.4 Analgetická aktivita.....	31
2.4 METODY HODNOCENÍ A ZKOUMÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	32
2.5 METODY ANTIMIKROBNÍHO ZKOUMÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	33
2.5.1 Diluční metody.....	33
2.5.1.1 Agarová diluční metoda.....	33
2.5.1.2 Mikrodiluční metoda testování MIC.....	34
2.5.2 Difúzní metody.....	34
2.5.2.1 Kvalitativní – disková difúzní metoda.....	34
2.5.2.2 Epsilon test citlivosti k antimikrobním látkám (E-test).....	34



<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIÁLY A PŘÍSTOJE.....</b>	<b>37</b>
3.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	37
3.2 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	37
3.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....	38
3.4 DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU .....	38
3.5 METODIKA .....	38
3.5.1 Příprava mikroemulzí.....	38
3.5.2 Grafické znázornění soustav o třech složkách .....	40
3.5.2.1 Výpočet složení mikroemulzí/emulzí pro sestavení fázových diagramů	41
3.5.3 Charakterizace mikroemulzí .....	42
3.5.3.1 Měření velikosti částic na přístroji Zeta Nano SZ .....	42
3.5.4 Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí esenciálních olejů .....	43
3.5.4.1 Složení a příprava mikroemulzí pro testování antimikrobních vlastností	43
3.5.5 Kultivační médium – masopeptonový bujón (MPB) .....	43
3.5.6 Příprava bakteriální suspenze.....	44
3.6 SLEDOVÁNÍ ÚČINKU ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ V MIKROEMULZÍCH NA VYBRANÉ BAKTERIE .....	44
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>46</b>
4.1 FÁZOVÉ DIAGRAMY – GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ SOUSTAV O TŘECH SLOŽKÁCH.....	46
4.2 CHARAKTERIZACE MIKROEMULZÍ .....	48
4.3 VLIV MIKROEMULZÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST BAKTERIÍ .....	50
4.3.1 Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií .....	50
4.3.2 Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií .....	51
4.3.3 Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.....	52
4.3.4 Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.....	53
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>55</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>57</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>59</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>60</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>61</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>62</b>

## ÚVOD

Rostoucí zájem o mikroemulze jako vehikula pro kosmeticky aktivní substance vyplývá především z výhod, které přinášejí jejich příznivé fyzikálně-chemické vlastnosti. Na rozdíl od emulzí, což jsou disperzní systémy skládající se ze dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalin a surfaktantu, je pro mikroemulze typická přítomnost ko-surfaktantu, který napomáhá snižovat povrchové napětí. Zatímco emulze vznikají intenzivní homogenizací a jsou mléčné a neprůhledné, mikroemulze vznikají spontánně po promíchání všech složek a díky malé velikosti částic (10 – 100 nm) jsou transparentní. Jejich dalšími výhodami jsou nízká viskozita, termodynamická stabilita a schopnost solubilizovat jak lipofilní tak hydrofilní látky používané v kosmetických formulacích.

Esenciální oleje jsou směsi těkavých bioaktivních látek produkované především rostlinami. Získávají se z jejich různých částí, například destilací nebo lisováním. Mají řadu účinků, které jsou stále předmětem zkoumání. Patří mezi ně např. antibakteriální, antimykotické, antivirové, antiparazitní, protizánětlivé nebo analgetické účinky. Z literatury je známo, že enkapsulace aktivních látek do emulzních a mikroemulzních systémů může jejich účinnost ještě zvýšit.

Cílem této práce bylo provést studie směřující k přípravě mikroemulzních systémů s obsahem esenciálních olejů a najít jejich vhodné složení, které by mohlo být následně využito v praxi. K tomuto účelu bylo studováno fázové chování emulzních a mikroemulzních systémů prostřednictvím pseudo-ternárních fázových diagramů. Dalším cílem práce bylo připravené mikroemulze charakterizovat pomocí měření velikosti jejich částic a provést alespoň předběžné testování jejich inhibičního účinku na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 EMULZE

Emulze jsou disperzní systémy nejméně dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Commission Internationale de Terminologie definovala v roce 1960 emulze jako heterogenní disperze jemných kapek jedné kapaliny v druhé, z nichž jedna tvoří kontinuální, kapalně prostředí [1].

Předpokladem vzniku prakticky použitelných emulzí je přítomnost surfaktantů, kterých je dnes k dispozici velké množství a které umožňují snadno přípravu emulzí jak I. typu (olej ve vodě o/v), tak II. typu (voda v oleji v/o) [1].

### 1.1 Klasifikace emulzí

Emulze lze klasifikovat prostřednictvím různých hledisek, např. podle charakteru disperzního prostředí, podle koncentrace disperzního podílu nebo podle velikosti částic. Nejběžněji se používá následující rozdělení [2]:

#### 1.1.1 Podle charakteru disperzního prostředí

- *emulze přímé* (I. typu), označované jako o/v (olej ve vodě), ve kterých je vnější fází polárnější kapalina [2];
- *emulze obrácené* (II. typu), jejichž vnější fází je nepolární kapalina; ty jsou označovány jako emulze v/o (voda v oleji) [2].

#### 1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu

- *zředěné emulze* – disperzní podíl zaujímá max. 2 % celkového objemu [2];
- *koncentrované emulze* – s nedeformovanými sférickými kapkami, které v monodisperzních systémech mohou dosáhnout koncentrace disperzního podílu až 74 obj.%, což odpovídá nejtěsnějšímu geometrickému uspořádání kulovitých částic [2];
- *vysoce koncentrované (gelovité) emulze* – s kapkami disperzního podílu uloženými tak těsně, že se vzájemně deformují; nabývají tvaru mnohostěnů, oddělených od sebe tenkými filmy koloidních rozměrů, vrstvičkami vnitřní fáze a surfaktantu [2].

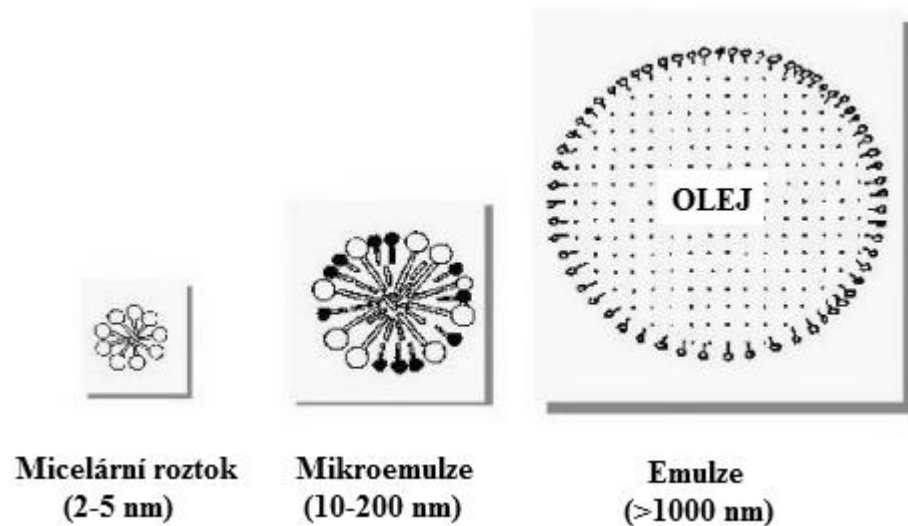
#### 1.1.3 Podle velikosti částic

- *Makroemulze* – jsou systémy s velikostí kapiček disperzního podílu většinou v rozmezí 100 – 1000 nm. Jsou mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní. Ne-

stále jsou proto, že disperzní fáze má tendenci ke koalescenci, tedy shlukování dispergovaných částic ve větší, případně až ve spojitou fázi. Tento typ emulzí se využívá především v potravinářství [3];

- *nanoemulze* – velikost částic disperzního podílu těchto systémů bývá v rozmezí 50 – 200 nm. Jsou průsvitné a kineticky stabilní. Některé literární zdroje uvádí další typ emulzí – tzv. miniemulze, u kterých se velikost částic pohybuje v rozmezí 80-150 nm [3];
- *mikroemulze* – velikost částic je v rozmezí 10 – 100 nm. Jsou čiré a termodynamicky stabilní [3].

Příklady emulzí jsou zobrazeno na obr. 1.

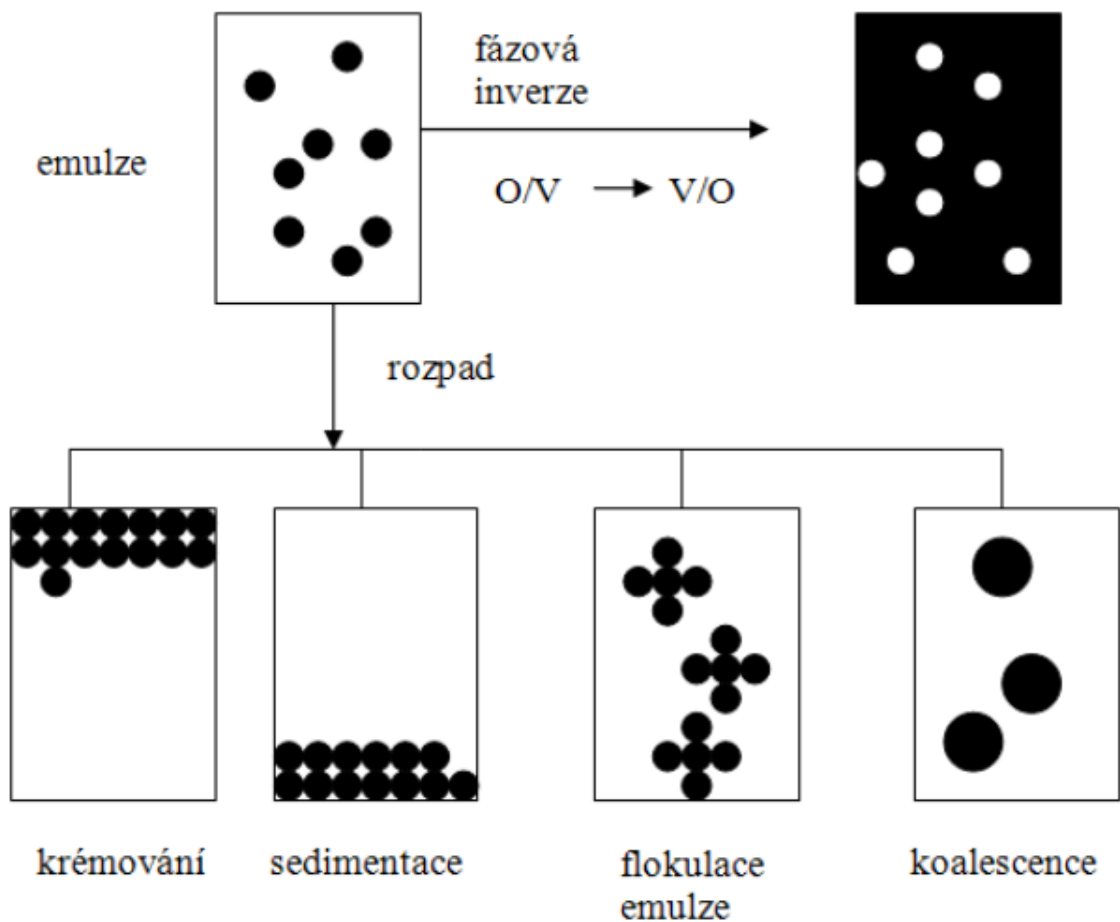


Obr. 1. Příklady emulzí [8].

## 1.2 Stabilita emulzí a mikroemulzí

Stabilita emulzních systémů je z hlediska jejich praktického využití jednou z nejdůležitějších vlastností. Stabilitu emulzí lze posuzovat jak z termodynamického, tak kinetického hlediska. Termodynamická stabilita emulze je v přímé souvislosti s pravděpodobností, že daný proces, tj. rozpad emulze, proběhne. Oproti tomu kinetická stabilita je vyjadřována rychlostí rozpadu daného emulzního systému [4].

K rozpadu emulzí dochází různými mechanismy, které jsou popsány v následující části práce.



Obr. 2. Mechanismy rozpadu emulzních systémů [4].

- *Krémování a sedimentace* jsou založeny na separaci jednotlivých složek pomocí gravitačních sil. Krémování lze charakterizovat jako shromažďování disperzního podílu v horní části systému z důvodu jeho nižší hustoty, zatímco sedimentace je opačný děj zapříčiněný vyšší hustotou částic, než je hustota vnější fáze [4].
- *Flokulace a koalescence* jsou dány agregací částic vnitřní fáze. Při flokulaci dochází k agregaci částic do větších celků při zachování jejich individuálního charakteru. Při koalescenci jedna nebo více kapek tvoří jednu novou o větším průměru [4].
- *Fázová inverze* je proces, při kterém dochází k výměně fází, tzn. že emulze typu o/v přecházejí na emulze v/o a naopak. Více viz kapitola 1.4 Metody přípravy emulzních systémů [4].

Potravinářské a kosmetické emulze jsou velmi složité systémy obsahující řadu látek jak ve vnitřní, tak ve vnější fázi. Mezi těmito látkami dochází k interakcím na molekulární i na koloidní úrovni. Povaha těchto interakčních sil je různá a ovlivňuje stabilitu daného emulzního systému [4].

Výše popsané mechanismy rozpadu emulzních systémů jsou graficky znázorněny na obr. 2.

Problematika stability emulzí je velmi široká a v této práci jí nebude věnována větší pozornost.

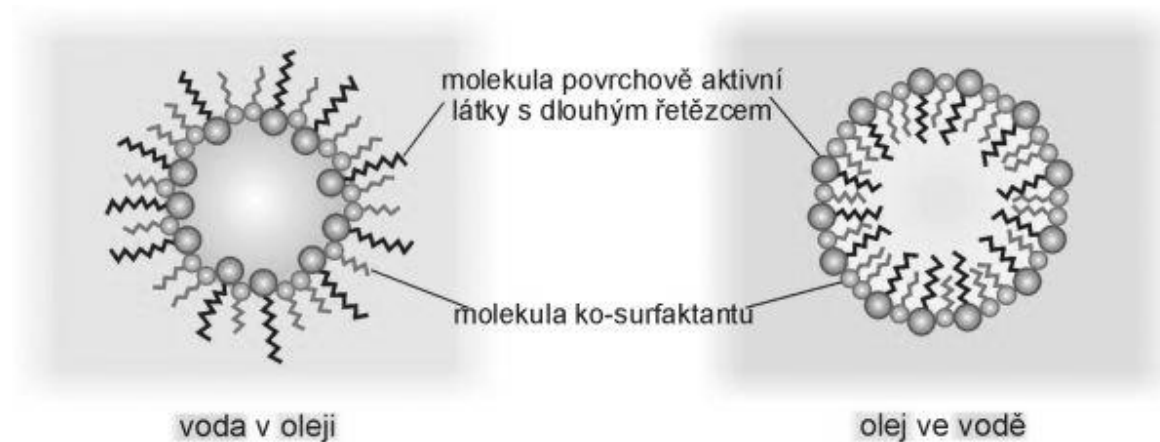
### 1.3 Mikroemulze

Termín mikroemulze je používán pro systémy složené z olejové fáze (např. triacylglyceroly nebo uhlovodíky) a vodné fáze (voda nebo vodné roztoky), které jsou rozptýleny jedna ve druhé za cílem vytvořit systém s částicemi, jejichž velikost je v řádech nanometrů [6].

Dříve byly mikroemulze definovány jako čisté a roztokům podobné systémy agregovaných kapiček rozptýlených jedna ve druhé [6].

Podle novější a více akceptované definice jsou mikroemulze spontánně formované, čiré, termodynamicky stabilní homogenní disperze dvou nemísitelných kapalin, obsahující odpovídající množství surfaktantu a ko-surfaktantu. Mezifázové napětí mikroemulzí je velmi nízké (cca  $10^{-2}$  mN/m) [6].

Základní typy mikroemulzních systémů jsou uvedeny na obr. 3.



Obr. 3. Základní typy mikroemulzních systémů [7].

#### 1.3.1 Typy mikroemulzí

Nejznámější dělení mikroemulzí je dělení podle Winsora. Podle tohoto systému jsou mikroemulze členěny podle povahy fázových rovnováh do čtyř základních typů [6]:

- *typ I (Winsor I)* - surfaktant je v těchto mikroemulzních systémech rozpuštěný přednostně ve vodě a v mikroemulzích o/v. Vodná fáze bohatá na surfaktant koe-

xistuje s olejovou fází, kde je surfaktant zastoupen pouze jako monomer v malé koncentraci [4];

- *typ II (Winsor II)* - surfaktant je rozpuštěn hlavně v olejové fázi a mikroemulzích v/o. Olejová fáze bohatá na surfaktant koexistuje s vodnou fází obsahující pouze malé množství surfaktantu [4];
- *typ III (Winsor III)* – třífázový systém, kde střední fáze bohatá na surfaktant koexistuje s přebytky vodné fáze a olejové fáze s malým množstvím surfaktantu [4];
- *typ IV* - jednofázový systém, kde jsou olej i voda solubilizovány v přítomnosti dostatečného množství surfaktantu a ko-surfaktantu [6].

### 1.3.2 Složení mikroemulzí

Charakter mikroemulzí, resp. skutečnost, zda se tento systém vůbec vytvoří, závisí na typu olejové a vodné fáze, jakož i na struktuře surfaktantu a ko-surfaktantu a na jejich množství v konkrétním systému. Dále budou podrobněji charakterizovány jednotlivé složky mikroemulzí používaných v kosmetice.

#### A. Olejová fáze

Hlavním kritériem pro výběr olejové fáze je její schopnost umožnit vysokou rozpustnost lipofilních ingrediencí v mikroemulzním systému (o/v). Nasycené (např. kyselina laurová, myristová nebo kaprová) a nenasycené (kyselina olejová, linolová nebo linoleová) mastné kyseliny jsou proto jako olejová fáze již dlouho používány. Jako olejová fáze jsou rovněž využívány i např. estery mastných kyselin a běžné oleje [8].

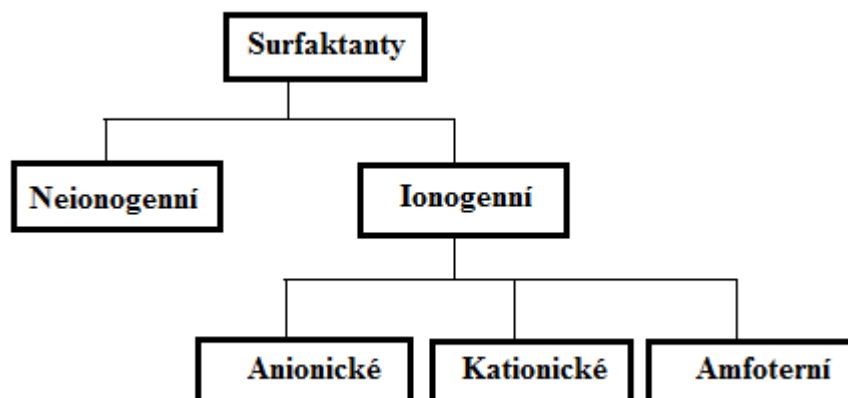
#### B. Surfaktant

Vybraný surfaktant musí být během procesu emulgace schopen snižovat mezifázové napětí na velmi malé hodnoty a musí kolem kapiček dispergované fáze vytvářet flexibilní film. Obecně platí, že surfaktanty s nižší hodnotou hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) jsou používány pro mikroemulze typu v/o. Oproti tomu surfaktanty s vyšší hodnotou HLB jsou využívány pro mikroemulze o/v. Pro mikroemulze je charakteristická přítomnost relativně velkého množství surfaktantu. Obvykle se udává, že pro její vytvoření je potřeba určité množství surfaktantu, avšak velké množství surfaktantu v mikroemulzích je nežádoucí, jelikož může způsobovat nežádoucí účinky jako jsou iritace kůže nebo alergie [8].



Surfaktanty lze dělit podle několika kritérií. Např. podle hodnoty HLB nebo podle typu hydrofilní složky.

- *podle typu hydrofilní složky*



Obr. 4. Dělení surfaktantů [5].

Základním kritériem dělení surfaktantů je schopnost molekuly disociovat na ionty. Polární skupiny ionogenních surfaktantů jsou disociovatelné. Účinnou složkou je buď anion (anionické) nebo kation (kationické). Amfolytické surfaktanty se mohou v závislosti na pH chovat buď jako anionické nebo kationické [5].

Schematické vyobrazení rozdělení surfaktantů je uvedeno na obr. 4 a přehled nejběžnějších anionických a kationických surfaktantů je seřazen v tab. 1 a tab. 2.

Tab. 1. Přehled nejběžnějších anionických surfaktantů [5].

Tenzid	Vzorec	Ionizace
mýdla	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \text{Na}^+ \end{array}$	slabá
alkylfosfát	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \text{Na}^+ \\   \\ \text{O}^- \text{Na}^+ \end{array}$	slabá
alkylsulfát	$\text{R}-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$	silná
alkylsulfonát	$\text{R}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	silná
dialkyljantarát	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OCOR} \\   \\ \text{Na}^+ \text{O}_3\text{S}-\text{CH}-\text{OCOR} \end{array}$	silná

Hlavními výchozími surovinami pro výrobu syntetických anionických tenzidů jsou jednosytné alkoholy s delším uhlíkatým řetězcem, mastné kyseliny a nenasycené uhlovodíky s délkou řetězce C8 až C18, dále benzen, naftalen nebo fenol [9].

Tab. 2. Přehled nejběžnějších kationických surfaktantů [5].

Tenzid	Vzorec	Ionizace
primární aminy	$\text{RNH}_2 \cdot \text{HCl}$	slabá
sekundární aminy	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \\ \text{R}_1\text{—NH} \cdot \text{HCl} \end{array}$	slabá
terciární aminy	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \\ \text{R}_1\text{—N} \cdot \text{HCl} \\   \\ \text{R}_3 \end{array}$	slabá
kvartérní aminy	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \\ \text{R}_1\text{—N}^+ \\   \quad \diagdown \\ \text{R}_3 \quad \text{R}_4 \end{array} \quad \text{Cl}^- (\text{X}^-)$	silná

Kationické surfaktanty se vyrábí v menším rozsahu a jejich význam spočívá především v desinfekčních a antiseptických účincích [9].

Neionické surfaktanty obsahují jako polární skupiny aminoskupiny, etherové a hydroxylové skupiny, které tvoří s molekulami vody vodíkové můstky, což umožňuje rozpustnost těchto látek ve vodě. Základními surovinami pro jejich výrobu jsou vyšší mastné kyseliny, vyšší alkoholy a alkyfenoly [9].

- *podle hodnoty HLB*

HLB neboli hydrofilně-lipofilní rovnováha je poměr mezi hydrofilními a lipofilními částmi molekuly surfaktantu. Tato hodnota HLB rozhoduje, jak lze jednotlivé surfaktanty v praxi využít – viz tab. 3 [5].

Tab. 3. Praktické použití surfaktantů v závislosti na hodnotě HLB [5].

Vzhled disperze	HLB	Použití
netvoří disperzi ve vodě	0	emulgátory V/O
	2	
	4	
mlékovitá nestabilní disperze	6	smáčedla
	8	
mlékovitá stabilní disperze	10	detergenty
	12	
čiré disperze	14	solubilizátory
	16	
	18	

### C. Ko-surfaktant

Ve většině případů nejsou alifatické surfaktanty schopny samy o sobě snížit mezifázové napětí emulzního systému o/v tak, aby mohly vzniknout mikroemulze. Pokud je žádoucí film vytvořený jedním surfaktantem, musí být jeho lipofilní řetězec dostatečně krátký nebo musí obsahovat funkční skupiny schopné zvyšovat fluiditu (např. nenasycené vazby) [4].

Ko-surfaktanty jsou látky, jejichž uhlovodíkový řetězec není dost dlouhý na to, aby mohly samostatně asociovat v micely, ale mohou vstupovat do struktury micel asociativních koloidů a snižovat tak povrchové napětí. Příkladem mohou být alkoholy o střední délce řetězce (např. hexanol) [10].

Příklady konkrétních látek, které lze použít pro přípravu kosmetických mikroemulzí jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 4. Příklady surovin pro přípravu kosmetických mikroemulzí [8].

Složka	Zdroj	Příklady
Olejová fáze	Přírodní	Oleje: olivový, sójový, kukuřičný nebo kokosový. Vosky: jojobový vosk.
	Syntetický	Isopropylmyristát, isopropylpalmitát, ethyllaurát, kyselina olejová
Surfaktant	Přírodní	Lecitin, alkylglykosidy, alkylestery
	Syntetický	Anionické: laurylsulfát sodný Amfoterní: dodecyl betain, cocamidopropyl betain Neionické: Tween, Span, Poloxamer, Brij, cetylalkohol, cocamide MEA Kationické: kvartérní alkylamoniové soli, např. cetyltrimethyl amonium bromid
Ko-surfaktant	Přírodní	Fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylglycerol a jejich deriváty
	Syntetický	Etanol, isopropanol, propanol (nižší alkoholy), polyethylenglykol, propylenglykol

Většina mikroemulzí, zvláště ty, které využívají ionogenní surfaktanty, vyžaduje přidavek ko-surfaktantu. Tím dosáhnou žádaných mezifázových vlastností, které zajistí spontánní dispergaci jedné fáze ve druhé. Oproti tomu mikroemulze obsahující neionické surfaktanty lze připravit i bez přídavku ko-surfaktantu, avšak i v tomto případě je často přítomnost ko-surfaktantu nezbytná [11].

## 1.4 Metody přípravy emulzních systémů

### 1.4.1 Příprava makroemulzí

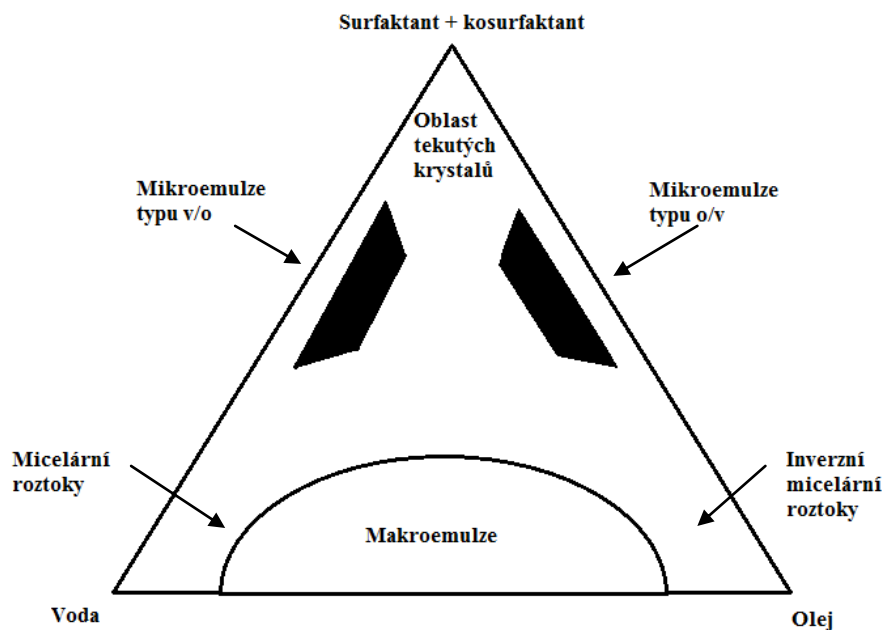
Příprava makroemulzí probíhá většinou dvoufázově. V první fázi emulzifikace dochází k tvorbě hrubé emulze, obvykle za vyšších teplot, s relativně velkými částicemi dispergované fáze. V druhé fázi, tzv. homogenizaci, se upravuje velikost částic [12].

### 1.4.2 Příprava mikroemulzí

Typickou metodou přípravy mikroemulzí je metoda fázové titrace. Mikroemulze jsou běžně připravovány spontánní emulzifikační metodou a mohou být popsány pomocí fázového diagramu. Čtyřfázový diagram (systém o čtyřech složkách – voda, olej, surfaktant, ko-

surfaktant) je náročný jak na čas potřebný k jeho sestavení, tak i na interpretaci. Z tohoto důvodu se častěji využívá nepravý tzv. pseudo - třífázový diagram, nejčastěji se složkami 1) surfaktant, 2) voda a 3) olej/ko-surfaktant. Je sestavován po nalezení oblastí výskytu různých typů zón, např. mikroemulzní zóny nebo oblasti výskytu tekutých krystalů [6], [8].

Obecné schéma fázového diagramu je znázorněno na obr. 5 [6].



Obr. 5. Fázový diagram o třech složkách [4].

### 1.4.3 Příprava nanoemulzí

K přípravě nanoemulzí se využívá metody přímé homogenizace nebo metody fázové inverze. Fázová inverze nastává v okamžiku přidání nadměrného množství dispergované fáze k fázi kontinuální nebo na základě změny teploty. Během fázové inverze dochází i ke změnám velikosti částic. Tyto metody využívají změny spontánního zakřivení surfaktantu. U neionických surfaktantů toho lze dosáhnout změnou teploty systému, kdy nanoemulze o/v, které vznikají při nižších teplotách, přechází do opačného typu v/o při vyšších teplotách. Během ochlazování systém překračuje nulový bod spontánního zakřivení a dochází ke snížení povrchového napětí na minimum, což zároveň podporuje vznik malých dispergovaných kapiček olejové fáze [8].

## 1.5 Použití mikroemulzí

V posledních dvou desetiletích probíhá prudký rozvoj využití mikroemulzních systémů v mnoha odvětvích. V následující části práce jsou uvedeny některé zajímavé aplikační oblasti [13].

- *Mikroemulze jako pohonné hmoty* – jednou z výhod paliv založených na mikroemulzních systémech je přítomnost vody, která úspěšně napomáhá snižovat obsah sazí. Když se během spalování paliva odpařuje voda, snižuje se tím uvolňované teplo a celková teplota při spalování. Přítomnost vody také zlepšuje rozprášení paliva a minimalizuje uvolňování emisí [13].
- *Mikroemulze jako maziva, řezné oleje a inhibitory koroze* – mikroemulze nebo reverzní micelární roztoky jsou pro tento účel používány již několik desítek let. Přítomnost surfaktantu v mikroemulzích působí jako inhibitor koroze. Voda v mikroemulzích s vyšší teplotní vodivostí dodává do systému vyšší tepelnou kapacitu. Tato složení mohou být použita pro řezné oleje [13].
- *Mikroemulze jako nátěrové hmoty* – aplikace nátěrů je velmi perspektivní a rychle se rozvíjející oblast mikroemulzní technologie. Nátěrové hmoty na bázi mikroemulzí vykazují vyšší odolnost proti odlupování z povrchu, lepší barevnou intenzitu a jsou odolnější proti vzniku skvrn [13].
- *Mikroemulze jako detergenty* – mikroemulze jsou pro čisticí účely vhodnější než tradičně používaná organická rozpouštědla, protože mohou solubilizovat polární (např. soli, barviva, bílkoviny) i nepolární (např. tuky nebo oleje) látky [13].
- *Mikroemulze v kosmetice* – v mnoha kosmetických aplikacích, jako např. produkty péče o pleť, jsou široce používány emulze s vodnou kontinuální fází. Předpokládá se, že mikroemulzní složení umožní rychlejší vstřebání aktivních složek do pokožky. Po nanesení na pokožku se většina emulzí rozráží a uvolněná vodná fáze se poměrně rychle odpaří. Na povrchu pokožky pak zůstává jen jemný, homogenně rozložený film lipofilních látek, který pokožku ošetřuje a chrání [1], [13].

Mikroemulze lze najít v následujících přípravcích:

- Prostředky péče o kůži - toto odvětví kosmetického průmyslu je největší kategorií na trhu s kosmetikou. Patří zde především:
  - hydratační přípravky;
  - přípravky na opalování;

- antiperspiranty a deodoranty [8].
- Prostředky péče o vlasy – vlasová kosmetika založená na mikroemulzním složení přináší dobrou stabilitu. Po uschnutí jsou vlasy elastické, drží svůj tvar a objem. Přípravky pro úpravu a posilování vlasů mohou být použity v několika formách – lotion, pěna, sprej, gel nebo krém. Do této skupiny lze zařadit [8]:
  - vlasové kondicionéry a pečující přípravky;
  - šampony;
  - přípravky pro úpravu vlasů;
  - vlasové odbarvovače a barvy;
  - prostředky určené k depilaci;
  - prostředky pro holení [8].
- Vůně a parfémy – používání parfémů a parfémovaných produktů vzrostlo především v posledních několika desetiletích. V historickém měřítku byly tyto prostředky používány spíše pro speciální příležitosti. Zhruba od roku 1970 se parfémy staly součástí každodenního života [8].
- *Mikroemulze v potravinách* – jsou připravovány, mimo jiné, jako funkční podoby lipidů. Určité formy mikroemulzí zároveň vznikají ve střevech při procesu trávení lipidů. Největší rozdíl mezi mikroemulzemi v potravinách a ostatními mikroemulzemi je ve složení olejové fáze a typech použitých surfaktantů. V potravinách tvoří olejovou fázi lipofilní látky, které jsou bezpečné a potravinářsky vhodné, například triacylglyceroly, zatímco v ostatních odvětvích může být olejová fáze tvořena uhlovodíky nebo minerálními oleji. Důležitou vlastností mikroemulzí použitých v potravinách je jejich antioxidační stabilita vzhledem k možnosti synergického efektu mezi hydrofilními a lipofilními antioxidanty [13].
- *Mikroemulze ve farmacii* – ve farmaceutických přípravcích jsou tekuté krystalické, micelární nebo emulzní formy systémů široce využívány. Dispergovaná fáze může působit jako zásobárna hydrofilních nebo lipofilních léčiv, které mohou být rozděleny mezi dispergovanou a kontinuální fázi. Léčiva, která přicházejí do styku s polopropustnou membránou (např. s kůží nebo sliznicí), mohou být přes tyto bariéry transportována. Lipofilní i hydrofilní léčiva mohou být tedy díky mikroemulzním systémům podávána současně v jedné lékové formě. Díky nízké viskozitě mo-



hou být mikroemulze použity i pro injekční roztoky, které se mísí s krví v jakémkoliv poměru. V porovnání s makroemulzemi způsobují mikroemulze pouze minimální imunitní reakce nebo tukové embolie. Bílkoviny navázané na mikroemulzní systémy nepodléhají denaturaci, i když mohou být vlivem vyšších teplot rozkládány [13].

## 2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje, nazývané také jako esence, těkavé oleje, etherické oleje nebo etherolea, jsou složité směsi těkavých složek a jsou syntetizovány živými organismy. Esenciální oleje jsou nejčastěji rostlinného původu a mohou být získávány různými způsoby, například vodní, parní nebo suchou destilací nebo v případě citrusových plodů lisováním. Jejich výskyt a funkce v přírodě je stále otázkou a předmětem výzkumu. Existují důkazy, že některé organismy produkují esenciální oleje pro svoji obranu nebo jako část jejich produktů sekundárního metabolismu. Příkladem rostlinných čeledí, které produkují esenciální oleje, jsou *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Hypericaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* nebo *Pinaceae* [14].

Esenciální oleje, jejich frakce a izoláty jsou využívány jako chuťové a vonné látky, látky přidávané do potravin, kosmetiky a toaletních potřeb nebo jako látky pro farmaceutický průmysl. Pro všechny tyto účely jsou využívány jak v čisté tak ve zředěné formě [14].

Ne všechny esenciální oleje pochází z aromatických rostlin. Několik málo z nich má také živočišný původ, např. pižmo z kabara pižmového nebo spermacet vorvaňů. Mohou být produkovány i mikroorganismy [14].

### 2.1 Složení esenciálních olejů

Hlavní složky esenciálních olejů jsou nejčastěji děleny na terpenoidní a neterpenoidní uhlovodíky. Obě tyto skupiny jsou složeny z uhlovodíkových řetězců a jejich kyslíkatých derivátů. Esenciální oleje obsahují i jiné než kyslíkaté deriváty, např. sírné nebo dusíkaté, avšak tyto deriváty jsou spíše minoritní [14].

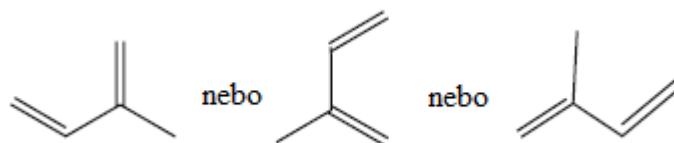
#### 2.1.1 Neterpenoidní uhlovodíky

Neterpenoidní uhlovodíky esenciálních olejů, např. alkoholy s krátkým řetězcem nebo aldehydy, jsou tvořeny metabolickou přeměnou nebo degradací fosfolipidů a mastných kyselin. Tyto uhlovodíky mohou obsahovat zároveň kyslík, dusík nebo síru [14].

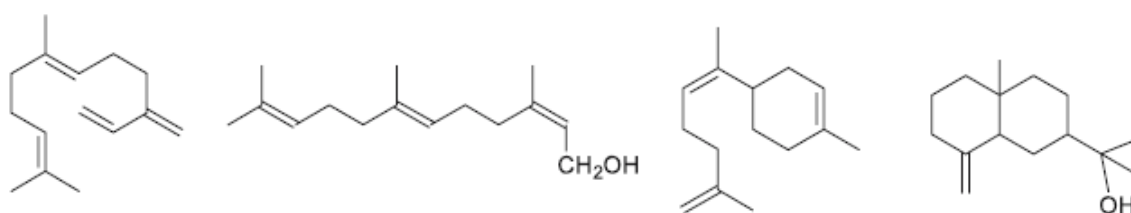
#### 2.1.2 Terpenoidní uhlovodíky

Terpeny neboli izoprenoidy jsou největší skupinou chemických látek vyskytujících se v přírodě ve vonných látkách. Vznikají přesmykem hlava-pata jedné nebo více izoprenových jednotek. Do dnešní doby bylo izolováno z rostlin, mikroorganismů nebo zvířat více než 30 000 terpenoidů [14].

Molekuly, které jsou tvořeny dvěma izoprenovými jednotkami, jsou nazývány monoterpeny ( $C_{10}H_{16}$ ). Seskviterpeny ( $C_{15}H_{24}$ ) obsahují tři izoprenové jednotky. Molekuly  $C_{20}H_{32}$  složené ze čtyř izoprenových jednotek jsou diterpeny. Příklady izoprenových jednotek a seskviterpenů jsou uvedeny na obr. 7 a 8 [14].



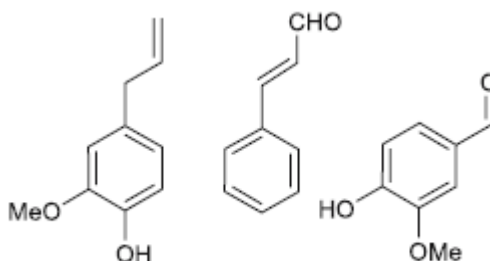
Obr. 6. Izoprenové jednotky [14].



Obr. 7. Příklady seskviterpenů [14].

### 2.1.2.1 Fenylpropanoidy

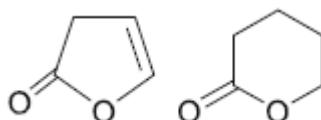
Fenylpropanoidy jsou sloučeniny, které obsahují na aromatickém jádře navázaný řetězec se třemi atomy uhlíku. Základní molekulou této skupiny je tedy fenylpropan. Tyto látky tvoří vedle terpenů jednu z nejdůležitějších součástí esenciálních olejů. Složkami esenciálních olejů bývají většinou jednoduché fenylpropanoidy. Mezi nejdůležitější látky této skupiny lze zařadit např. deriváty kyseliny skořicové, kumariny, fenylkarboxylové kyseliny, lignany a ligniny eugenol nebo vanilin [14]. Příklady těchto látek jsou uvedeny na obr. 9.



Obr. 8. Eugenol, skořicový aldehyd, vanilin [14].

### 2.1.2.2 Laktony

Laktony jsou cyklické estery kyseliny mléčné ( $C_3H_6O_3$ ). Jsou to složky několika esenciálních olejů a přírodních těkavých látek. Obsahují heterocyklicky navázaný kyslík vedle karbonylové funkční skupiny v pěti nebo šestičlenných nasycených nebo nenasycených kruzích. Laktony obsahující ve své molekule pětičlenný kruh se nazývají  $\gamma$ -laktony, laktony obsahující šestičlenný kruh se nazývají  $\delta$ -laktony [14].



Obr. 9.  $\gamma$ -lakton,  $\delta$ -lakton

[16].

## 2.2 Popis esenciálních olejů

Jak již bylo výše zmíněno, jednotlivé druhy esenciálních olejů se od sebe liší jak senzoricou aktivitou, tak chemickým složením a jinými vlastnostmi. Následující část práce obsahuje výčet základních charakteristik několika vybraných esenciálních olejů, které jsou použity v této bakalářské práci, jejich souhrnné složení a zdroje (tab. 5).

### 2.2.1 Citronový olej

- Původ: *Citrus limonum* z čeledi *Rutaceae*, stále zelený strom pocházející z Dálného východu. Kvete bíle od února do října. Plody jsou žluté, oválné.
- Výroba: lisováním slupek plodů (kůry) za studena, popřípadě jejich destilací vodní párou. Získává se jako vedlejší produkt při výrobě citronové šťávy.
- Vlastnosti: většinou světle žlutá, až nazelenalá kapalina (destilovaný silikonový olej je bezbarvý), typicky svěží citronové vůně.
- Složení: citral, *D*-limonen,  $\alpha$ -pinen, myrcen,  $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -terpineol, linalool, geraniol, linalylacetát, geranylacetát, 6-methyl-5-hepten-2-on, nonanal, dekanal, citronellol, citropten. V amerických esenciálních olejích se vyskytují ještě další substituované kumariny [15].

### 2.2.2 Hřebíčkový olej

- Původ: *Eugenia caryophyllata* z čeledi *Myrtaceae*, stále zelený asi 20 m vysoký strom, pocházející z tropické Asie. Pěstuje se hlavně na Moluckých ostrovech, na Zanzibaru a Madagaskaru.
- Výroba: destilace listů nebo suchých pupat vodní parou.
- Vlastnosti: žlutá až nahnědlá kapalina, s časem hnědnoucí, vyznačující se typickou eugenolovou vůní.
- Složení: eugenol, eugenylacetát, amylmethylketon,  $\beta$ -karyofylen. V případě oleje z pupenů obsahuje olej navíc ještě  $\alpha$ -pinen, methylbenzoát, heptanol, nonanol, benzylalkohol, 2-furfurylalkohol a methylsalicylát [15].

### 2.2.3 Skořicový olej

- Původ: *Cinnamomum zeylanicum* z čeledi *Lauraceae*, stále zelený strom, vysoký až deset metrů, s kopinatými listy a drobnými květy seskupenými v hroznech.
- Výroba: destilace kůry nebo listů vodní parou.
- Vlastnosti: olej z kůry je červenohnědá kapalina, charakteristické kořeněné vůně, připomínající cinnamaldehyd, sladká, stabilní, olej z listů je světle žlutá kapalina, spíše hřebíčkové vůně, olej z listů je odlišný od oleje z kůry.
- Složení:
  - o olej z kůry: cinnamaldehyd, eugenol, fellandren,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -karyofylen, *p*-cymen, linalool, 3-fenylpropanal, benzaldehyd, kuminaldehyd, furfural, nonanal, amylmethylketon.
  - o olej z listů:  $\alpha$ -pinen, fellandreen, dipenten, linalool, geraniol, borneol,  $\alpha$ -terpineol a jeho estery, cinnamaldehyd, benzylbenzoát, benzylaldehyd, cinnamylalkohol, menthenon, safrol, eugenol [15].

### 2.2.4 Tymiánový olej

- Původ: *Thymus vulgaris* (tymiánový olej červený), *Thymus zygis* var. *gracilis* (tymiánový olej bílý), *Thymus capitatus* (španělský oregánový olej), všechny tyto druhy jsou z čeledi *Labiatae*, vytrvalý polokeř, původem ze Středozeří. Dorůstá výšky asi padesát centimetrů. Má oválné nebo čárkovité lístky, šedě plstnaté a modrofialové drobné kvítky.

- Výroba: destilací drogy vodní parou.
- Vlastnosti: olej je růžová až červenohnědá kapalina, intenzivní, bylinné, pronikavé vůně s fenolickým nádechem.
- Složení: cymen, limonen,  $\alpha$ -pinen, kamfen, terpinen, tricyklen, karyofylen, geraniol, thymol, karvakrol, linalool, borneol, terpineol, fenchylalkohol. Silice *Thymus zygis* se z se vyznačuje nižším obsahem tymolu než silice z ostatních druhů rodu *Thymus* [15].

Tab. 5. Zdroje a složení vybraných esenciálních olejů [14].

Esenciální olej	Zdroj	Nejdůležitější složka (%)
Citronový olej	<i>Citrus lemon</i> (L.)	Geranial (0,5-2), neral (0,2-1,2), limonen (60-80)
Hřebíčkový olej	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)	Eugenol (75-88)
Skořicový olej	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (L.)	Cinnamaldehyd (55-75)
Tymiánový olej	<i>Thymus vulgaris</i> (L.)	Thymol (36-55)

## 2.3 Bioaktivita esenciálních olejů a jejich složek

### 2.3.1 Antimikrobní aktivita

Mechanismus účinku přírodních látek na mikroorganismy je složitý proces, který nebyl dosud zcela objasněn. Proto bylo v několika minulých letech cílem mnoha prací zkoumat biologicky aktivní složky esenciálních olejů izolovaných z rostlin právě s touto inhibiční schopností. Mimo jiné díky skutečnosti, že mikroorganismy se staly rezistentní k mnohým antibiotikům. Antimikrobní aktivita je známa u celé řady esenciálních olejů a to hlavně díky jejich aktivním složkám. Mezi tyto aktivní složky lze řadit izopreny (monoterpeny, seskviterpeny) nebo uhlovodíky a fenoly. Nejdůležitějším faktorem pro antimikrobní aktivitu jsou lipofilní charakter uhlovodíkových zbytků a hydrofilní charakter funkčních skupin. Antimikrobní aktivita jednotlivých složek esenciálních olejů může být klasifikována v souladu s následujícím schématem [16], [17]:

fenoly > aldehydy > ketony > alkoholy > estery > uhlovodíky [17].

Z výše uvedeného schématu lze říci, že esenciální oleje obsahující fenolické látky jsou neúčinnější a bylo prokázáno, že jsou aktivní proti širokému spektru mikroorganismů. Mezi takové látky patří karvakrol nebo thymol [17].

Zvýšení antibakteriální aktivity lze rovněž podpořit přítomností aldehydické skupiny s konjugovanými dvojnými vazbami a dlouhými uhlovodíkovými řetězci navázanými na aromatickém kruhu [17].

Některé esenciální oleje mají pouze jeden mechanismus účinku, jiné mohou účinky jednotlivých složek kombinovat, čímž zvyšují svoji efektivitu [16].

### **2.3.2 Antivirová aktivita**

Vývoj rezistence virů směrem k antivirotikům zvyšuje potřebu nalézt nové látky proti virovým infekcím. Přírodní zdroje, včetně esenciálních olejů, mohou být i v tomto případě vhodnou volbou [17].

### **2.3.3 Antioxidační aktivita**

Mezi škodlivé účinky kyslíku na živé organizmy lze zařadit taky dezintegraci buněčné membrány na jednotlivé fragmenty, narušení enzymatické aktivity membrány nebo porušení mitochondrií a lyzozomální lýzi. Reaktivní formy kyslíku mohou být spouštěcím faktorem mnoha lidských degenerativních onemocnění a právě antioxidanty mohou do určité míry tento rozvoj onemocnění ovlivnit. Nejběžnější reaktivní formou kyslíku je peroxid vodíku, který způsobuje peroxidaci lipidů a oxidativní změny DNA v buňkách. Mezi nejznámější v přírodě se vyskytující antioxidanty patří hlavně vitaminy, fenolické sloučeniny a právě esenciální oleje. Díky tomu se v posledních letech začala věda více zajímat o přírodní zdroje ze skupiny antioxidantů [17].

V mnoha případech nemůže být antioxidační aktivita přičítána pouze majoritním sloučeninám, např. fenolickým látkám, protože vedle nich mají látky minoritní neméně významnou roli. A to především díky jejich synergickému účinku [17].

### **2.3.4 Analgetická aktivita**

Menthol je přirozeně se vyskytující sloučenina rostlinného původu, která má typickou mátovou chuť i vůni. Je obsažen v esenciálních olejích některých druhů máty, např. v oleji máty peprné, a podle US Food and Drug Administration je klasifikován jako lokální analgetikum. Menthol je cyklický terpenoidní alkohol, který ve své molekule obsahuje tři asy-

metrické uhlíky, proto se vyskytuje ve formě čtyř párů opticky aktivních izomerů. V přírodě se ze všech opticky aktivních izomerů mentolu vyskytuje nejvíce (-)-menthol. Tento izomer má taky nejvyšší analgetický účinek, zatímco izomer (+)-menthol má analgetický účinek prakticky nulový. Menthol podaný zevně způsobuje brnění, prokrvení a chladivý pocit [17].

Vedle mentolu vykazují analgetické účinky i esenciální oleje z *Salvia afcirana-lutea* nebo *Dodonaea angustifolia* [17].

## 2.4 Metody hodnocení a zkoumání esenciálních olejů

K posouzení esenciálních olejů je využíváno řady metod, jejichž použití závisí na tom, jakou informaci je třeba o daném esenciálním oleji získat. Jsou to především:

- senzorické hodnocení;
- fyzikální metody;
- chemické metody;
- instrumentální metody [14].

Senzorické hodnocení je prováděno využitím senzoričky aktivních orgánů, především nosu. To je považováno za zásadní při využití esenciálních olejů např. v parfumerii. Je to jednoduchý, rychlý a účinný způsob identifikace falšování olejů, ale zůstává jen jedním z dalších postupů pro ověření čistoty oleje [14].

Oleje jsou dále hodnoceny pomocí běžných fyzikálních charakteristik, jako jsou hustota, optická otáčivost nebo index lomu. Tyto analýzy se provádějí pro potvrzení pravosti oleje z vyhlášených botanických druhů a země původu.

Mezi moderní metody charakterizace esenciálních olejů patří chromatografické a spektrální techniky, které posuzují kvalitu esenciálních olejů ve smyslu jejich čistoty a složení. Nejdůležitější technikou zkoumání esenciálních olejů je plynová chromatografie GC. Pro kvantitativní analýzu složek esenciálních olejů je možné využít celé řady detektorů, např. plamenově-ionizační nebo hmotnostní spektrometrie (MS). Tímto způsobem mohou být odhaleny příměsi a nečistoty v olejích, i když interpretace výsledků vyžaduje odborné znalosti organické chemie, protože výsledky mohou být ovlivněny klimatickými změnami či typem půdy, ve které byla rostlina pěstována [14].



## 2.5 Metody antimikrobního zkoumání esenciálních olejů

Pro zkoušky antimikrobní účinnosti esenciálních olejů jsou používány běžné metody zkoumání antimikrobních schopností látek. Patří sem dvě základní techniky, které se zabývají jak antibakteriální, tak i antifungální aktivitou – diluční metody nebo difúzní metody [18].

Testování a hodnocení antimikrobní aktivity esenciálních olejů není vždy zcela jednoduché vzhledem k jejich těkavosti, nemísitelnosti s vodou a komplexnímu chemickému složení. Specifické vlastnosti esenciálních olejů vyžadují některé modifikace výše zmíněných metod [18].

Testování růstu mikrobiálních kultur je prováděno v bujónu, za optimálních podmínek s ohledem na jednotlivé kmeny. Mikroorganismy použité k testování jsou obvykle získávány z mezinárodně uznávaných sbírek čistých kultur, ale mohou být také izolovány odběrem z různých prostředí, např. z mléka, sýrů, rostlin, chleba nebo od lidí i zvířat [18].

Pro diluční i difúzní metody je společným znakem, že to jsou metody vhodné ke kvantitativnímu stanovení stupně citlivosti (rezistence) a stanovení hladiny MIC (minimální inhibiční koncentrace) sledovaných kultur. Jsou vhodné i pro pomalu rostoucí bakterie a bakterie se speciálními nároky. Pro tyto druhy bakterií jsou vyvinuty modifikace metod, půd i kultivačních podmínek [19].

### 2.5.1 Diluční metody

Cílem dilučních metod je prokázat stupeň rezistence testovaných bakteriálních kmenů k antibakteriálním látkám [19].

#### 2.5.1.1 Agarová diluční metoda

Principem této metody je hodnocení MIC na agarových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antimikrobních látek. Obvykle se připravuje 12-15 koncentrací jedné látky, které jsou následně ještě ředěny dvojnásobně geometrickou řadou. Na půdy se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií. Na jednu plotnu obsahující jednu koncentraci antimikrobní látky se naočkuje cca dvacet kmenů a inokulátorem třicet dva až čtyřicet pět kmenů [19].

Metoda

- je vysoce standardizovaná, referenční;

- lze jí vyšetřit velké množství kmenů za stejných podmínek;
- je spolehlivá při hodnocení nových antimikrobních látek;
- lze jí odhalit kontaminace kmene i heterorezistentní populaci [19].

### **2.5.1.2 Mikrodiluční metoda testování MIC**

Mikrodiluční metoda je používána ke kvantitativnímu stanovení aktivity antimikrobních látek vůči bakteriálním izolátům. Stanovuje se MIC, tj. nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu [19].

Sterilní plastová mikrodiluční destička obsahující v jednotlivých mikrojamkách v bujónu rozplněné různé koncentrace antimikrobních látek je inokulována standardizovanými suspenzemi testovaných bakterií. Inkubuje se osmnáct až dvacet čtyři hodin při 35 °C [19].

## **2.5.2 Difúzní metody**

### **2.5.2.1 Kvalitativní – disková difúzní metoda**

Cílem diskové difúzní metody je prokázat rezistenci testovaných bakteriálních kmenů k antimikrobním látkám [19].

Metoda je založena na inokulaci mikroorganismů standardizovaným inokulem na povrch média, nejčastěji Mueller – Hinton agaru rozplněného na Petriho miskách. Po inokulaci a odsátí přebytečného množství inokula jsou na povrch média umístěny standardní papírové disky s antimikrobní látkou. Po předepsané inkubaci (osmnáct až dvacet čtyři hodin dle druhu mikroorganismů) je měřen průměr zón inhibice okolo každého disku. Velikost vzniklých inhibičních zón je důležitá např. pro terapeuticky dosažitelné hladiny léčiv v krvi při systémových onemocněních [19].

Metoda je standardní a spolehlivá za předpokladu přísného dodržení pracovního postupu, přesného měření inhibičních zón, přesného systému kontrol a správné interpretace [19].

### **2.5.2.2 Epsilon test citlivosti k antimikrobním látkám (E-test)**

E-test je relativně nová metoda, která se velmi podobá agarové difúzní metodě, ale kombinuje principy difúzní a diluční metody pro *in vitro* stanovení citlivosti k antimikrobním látkám pro široké spektrum mikroorganismů [19].

E-test je jednoduše proveditelný a na rozdíl od diskové difúzní metody ukazuje i MIC. Stejně jako u difúzní diskové metody i tuto lze snadno modifikovat pro různé druhy mik-

roorganizmů. E-test je však prakticky pouze tehdy, je-li nutno otestovat jen malé množství různých antimikrobních substancí, a to z důvodu pracnosti a nákladnosti. Velkou výhodou tohoto testu je, že antimikrobní látka testovaná rutinně na MIC panelu může být testována individuálně [19].

Princip metody je obdobný jako u difúzní diskové metody a vyžaduje standardní inokulum mikroorganismů nanesené na povrch agarové plotny. Na plotnu jsou aplikovány E-testové proužky obsahující na svých okrajích gradient antimikrobní látky, která proniká do média a ovlivňuje nárůst bakterií. Antimikrobní látka difunduje do agaru a vytváří kontinuální koncentrační gradient antimikrobní látky, který je vytvořen podél stran E-proužku. Po inkubaci se vytvoří elipsoidní inhibiční zóna. MIC je odečtena v místě, kde se hranice růstu bakterií protíná s okrajem proužku. Touto metodou může být vyčísleno široké spektrum koncentrace antimikrobní látky, protože umožňuje kontinuální ředění [19].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 MATERIÁLY A PŘÍSTOJE

#### 3.1 Použité materiály a chemikálie

##### Esenciální oleje

Pro přípravu mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů byly vybrány následující oleje:

- citronový olej (Biomedica, Praha);
- skořicový olej (Biomedica, Praha);
- hřebíčkový olej (Slow-Natur, Bratislava);
- tymiánový olej (Biomedica, Praha).

##### Ko-surfaktant

- etanol absolutní (Penta, Chrudim)

##### Surfaktant

- Tween 60 (Polyethylenglykol sorbitan monostearát), neionický surfaktant, HLB 14.9 (Sigma-Aldrich)

##### Solubilizátor

- propylenglykol (Penta, Chrudim)

##### Masopeptonový bujón (MPB)

- NaCl (HiMedia)
- BE – beef extract (HiMedia)
- Pepton (Lach-Ner)

#### 3.2 Použité mikroorganismy

Pro zhodnocení antimikrobní aktivity připravených mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů byly použity následující bakterie, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM):

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

- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062.

Všechny používané bakteriální kmeny byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) na Petriho miskách při teplotě  $4 \pm 2$  °C.

### 3.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko.
- Fotoaparát Sony, Japonsko.
- Vortex, (Heidolph REAX top), Německo.
- Biohazard box EUROFLOW (Clean air), Holandsko.
- Zetasizer nano SZ (Malvern Instruments, Ltd.), Velká Británie.
- Microplate reader Benchmark (Bio-Rad), Velká Británie.
- Autokláv Varioklav H+P, Německo.
- Biologický termostat BT 120, Česká republika.
- Automatické mikropipety Biohit a Nichipet ex.
- Mikrostríkačka Hamillton 1ml.
- Laboratorní sklo (kádinky, pipety, byrety, zkumavky).
- Laboratorní plasty (špičky pro automatické mikropipety, mikrotitrační destičky, očkovací kličky, zkumavky, stríkačky).
- Stríkačkové filtry o velikosti pórů 0.22 µm, Millipore -Velká Británie.
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení.

### 3.4 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý materiál (laboratorní sklo, kultivační média, mikrotitrační destičky, plastové zkumavky), který byl v experimentu použit, byl dekontaminován buď v autoklávu při 132 °C po dobu 20 min nebo UV zářením.

## 3.5 Metodika

### 3.5.1 Příprava mikroemulzí

Pro bakalářskou práci byly připraveny mikroemulze obsahující vybrané druhy esenciálních olejů a etanol plnící funkci ko-surfaktantu. Jako surfaktant byl použit neionický Tween 60

(HLB 14.9), který je díky své hodnotě HLB schopen vytvořit emulze typu o/v. Pro zjištění výskytu jednofázových oblastí, které označují přítomnost mikroemulzí, byly nejprve sestrojeny fázové diagramy tříslučkového systému voda – olej - surfaktant. Vodnou fází tvořila směs vody a propylenglykolu v poměru 1:1 nebo samotná voda. Olejovou fází tvořil příslušný esenciální olej s etanolem v poměru 1:1. Z této olejové fáze a surfaktantu Tween 60 bylo připraveno 17 směsí, ve kterých poměr surfaktantu a olejové fáze byl vždy 1:9, 1.5:8.5, 2:8, 2.5:7.5, 3:7, 3.5:6.5, 4:6, 4.5:5.5, 5:5, 5.5:4.5, 6:4, 6.5:3.5, 7:3, 7.5:2.5, 8:2, 8.5:1.5 a 9:1. Navážky pro přípravu směsí jsou uvedeny v tab. 6. Každá z připravených směsí byla promíchána na třepačce, aby vznikl homogenní roztok. K tomuto roztoku byla nejprve pomocí mikrostříkačky a poté pomocí byrety postupně přidávána vodná fáze do doby, kdy se objevil první zákal. Po každém přidavku vodné fáze byla směs vždy po několik sekund homogenizována pomocí třepačky Vortex. V první sérii experimentů vodnou fází tvořila směs vody a propylenglykolu v poměru 1:1, v sérii druhé to byla pouze voda. Všechny přidávky vodné fáze byly prováděny při laboratorní teplotě. Po dosažení zákalu bylo množství přidané vody zjištěno vážením.

Pro studium antimikrobních vlastností esenciálních olejů byly zvoleny mikroemulze se složení, které zajišťovalo jejich stabilitu a které je uvedeno v tab. 7.

Tab. 6. Teoretická množství složek použitých pro přípravu mikroemulzí.

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

Tab. 7. Nominální složení stabilních mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů.

Navažované hmotnosti [g]		
Směs olej/etanol 1:1	Tween 60	Voda
0.2	0.8	9

### 3.5.2 Grafické znázornění soustav o třech složkách

Složení soustav o třech složkách bývá znázorňováno v tzv. trojúhelníkových diagramech, které využívají toho, že dva ze tří koncentračních údajů (molární nebo hmotnostní procen-



ta) jsou nezávisle proměnné a mohou být vynášeny na dvě osy, které svírají úhel 90° nebo 60° [20].

Na strany trojúhelníku jsou vynášena množství složek v procentech (hmotnostních zlomcích) tak, že jejich hodnoty vzrůstají směrem k vrcholům. Tyto vrcholy představují čisté složky. Strany trojúhelníku znázorňují složení binárních soustav. Body uvnitř trojúhelníku udávají složení tříložkové soustavy [20].

Připravené mikroemulze byly tvořeny kapalnými fázemi o třech omezeně mísitelných složkách 1) esenciální olej v etanolu, 2) Tween 60 a 3) voda (voda s propylenglykolem). Ze získaných údajů byly sestrojeny fázové diagramy, které jsou rozděleny binodální křivkou na dvě oblasti – homogenní, jednofázovou, ve které byla přítomna žádaná mikroemulze typu o/v, a heterogenní, vizuálně zakalenou, která představovala běžnou emulzi, případně jiné typy emulzí uvedené v teoretické části práce.

Fázové diagramy byly sestrojeny s využitím počítačového programu OriginPro8.

### 3.5.2.1 Výpočet složení mikroemulzí/emulzí pro sestrojení fázových diagramů

Složení mikroemulzí/emulzí pro sestrojení fázových diagramů bylo vypočítáno podle vztahů (1) - (4):

$$W_A = \frac{m_A}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (1)$$

$$W_B = \frac{m_B}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (2)$$

$$W_C = \frac{m_C}{\sum m_A + m_B + m_C} \quad (3)$$

$$W_A + W_B + W_C = 1 \quad (4)$$

Kde:

$W_A$ ,  $W_B$ ,  $W_C$  jsou hmotnostní zlomky jednotlivých složek mikroemulze

$m_A$  – hmotnost esenciálního oleje s etanolem [g]

$m_B$  – hmotnost Tweenu 60 [g]

$m_C$  – hmotnost vody (vody s propylenglykolem) [g]

### 3.5.3 Charakterizace mikroemulzí

Připravené mikroemulze byly hodnoceny vizuálním pozorováním, dále byla stanovena velikost jejich částic pomocí fotonové korelační spektroskopie na přístroji Zeta Nano SZ.

#### 3.5.3.1 Měření velikosti částic na přístroji Zeta Nano SZ

Měření velikosti částic bylo provedeno pomocí dynamického rozptylu světla, někdy označovaného také jako fotonová korelační spektroskopie. Tato metoda využívá fluktuace intenzity rozptýleného světla, které v disperzních systémech způsobují částice. Tyto fluktuace jsou způsobeny Brownovým pohybem, který udržuje částice díky elastickým nárazům okolních molekul kapaliny v neustálém pohybu a jsou závislé na velikosti částic. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity v čase popisuje pro velmi malé hodnoty časů autokolerační funkce  $g(t)$ , která je definovaná pomocí tzv. relaxačního času uvádějícího dobu potřebnou k návratu fluktuace dané částice k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Pro malé částice je charakteristické, že se pohybují rychleji a jejich fluktuace zaniká rychleji. U velkých částic je tomu naopak. Hodnotu relaxačního času lze pak vztáhnout k difúznímu koeficientu  $D$  rozptylujících částic [21].

Za předpokladu, že měřené částice mají kulovitý tvar a vzájemně spolu neinteragují, lze jejich velikost stanovit za využití vztahu mezi rychlostí difúze a velikostí částic, tzv. Stokes-Einsteinovou rovnicí (5) [21]:

$$D(x) = \frac{k_B T}{3\pi\eta x} \quad (5)$$

Kde:

$D$  ..... difúzní koeficient

$k_B$  ..... Boltzmannova konstanta

$T$  ..... absolutní teplota

$\eta$  ..... dynamická viskozita kapaliny

$x$  ..... průměr částice

Pro měření velikosti částic byl připraven vzorek pipetováním 1 ml připravené, neředěné mikroemulze do plastové kyvety. Pro zajištění konstantní teploty vzorku byla kyveta uzavřena víčkem a ekvilibrována přímo v přístroji po dobu 5 min na požadovanou teplotu.

Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C a byly použity následující vstupní údaje potřebné pro výpočet velikosti částic: viskozita disperzního média 0.887 cP (voda), 6.368 cP (voda s propylenglykolem), index lomu disperzního média 1.33 a index lomu dispergovaného podílu 1.44. Veškeré vyhodnocení měření bylo prováděno přístrojem Zeta Nano ZS.

### 3.5.4 Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí esenciálních olejů

#### 3.5.4.1 Složení a příprava mikroemulzí pro testování antimikrobních vlastností

Pro testování antimikrobních vlastností připravených mikroemulzí bylo zvoleno složení, které zajišťovalo jejich stabilitu (tab. 7.). Mikroemulze byly připraveny výše popsáním způsobem, tzn. že k naváženému množství směsi příslušného esenciálního oleje a etanolu (1:1) bylo přidáno odpovídající množství surfaktantu. Takto vzniklý roztok byl homogениzován na třepačce. Na závěr bylo přidáno již známé množství demineralizované vody. Toto známé množství vody bylo zjištěno ze sestavených fázových diagramů. Pro testování antimikrobních vlastností byly připravené mikroemulze přefiltrovány přes stříkačkový sterilní filtr s velikostí pórů 0.22 µm pro eliminaci možné mikrobiální kontaminace vzniklé během jejich přípravy. Mikroemulze pro vlastní mikrobiologické zkoušení byly ředěny masopeptonovým bujónem; koncentrace esenciálních olejů byly ve všech mikroemulzích stejné a jsou uvedeny v tab. 8.

Tab. 8. Koncentrace esenciálního oleje v mikroemulzích pro testování antimikrobní účinnosti.

Koncentrace esenciálního oleje v mikroemulzi [µg/ml]					
1.ředění	2.ředění	3.ředění	4.ředění	5.ředění	Koncentrovaná mikroemulze
220	150	110	90	44	9500

### 3.5.5 Kultivační médium – masopeptonový bujón (MPB)

Pro přípravu inokula buněk pro vlastní experiment byl použit masopeptonový bujón (MPB). Složení MPB je uvedeno v tab 9:

Tab. 9. Složení MPB.

Složka	Hmotnost [g]
NaCl	2.0
Beef extrakt (BE)	4.0
Pepton	4.0
Demineralizovaná voda	400.0

Takto připravený bujón byl následně rozplněn do zkumavek a vysterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 min.

### 3.5.6 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny očkováním vybraných mikroorganismů do 5 ml tekutého média. Mikroorganismy pocházely ze zásobních bakteriálních kultur uchovávaných na Petriho miskách. Následná kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 hodin.

## 3.6 Sledování účinku esenciálních olejů v mikroemulzích na vybrané bakterie

Mikroemulze byly dávkovány do sterilních zkumavek a doplněny sterilním MPB do celkového objemu 3 ml. Pět připravených naředěných mikroemulzí, koncentrovaná mikroemulze a čistý MPB byly postupně pipetovány do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky v objemu 200 µl. Jamky byly následně zaočkovány 5 µl suspenze bakterií. Každá mikrotitrační destička obsahovala 12 sloupců a 8 řad. Do řad byla pipetována kultivační média. První řada obsahovala pouze MPB bez obsahu studované mikroemulze. Tato první řada sloužila jako pozitivní kontrola. V druhé řadě byla mikroemulze s koncentrací esenciálního oleje 220 µg/ml. Od třetí do osmé řady byly následně pipetovány další naředěné mikroemulze v sestupném pořadí. Do sloupců byly očkovány bakterie. První dva sloupce nebyly zaočkovány. Tyto sloupce sloužily jako negativní kontrola. Bakterie byly očkovány až od třetího sloupce. Jedna bakterie byla zaočkována do dvou sloupců pro získání spolehlivějších výsledků. Takto připravené mikrotitrační destičky s jednotlivými druhy mikroemulzí byly kultivovány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Po celou dobu kultivace byl ve 30 minutových intervalech spektrofotometricky měřen zákal suspenze při 655 nm ( $OD_{655}$ ). Před každým měřením byla mikrotitrační destička 10 sekund protřepávána.

Jelikož výše uvedenou zkouškou bylo zjištěno, že ve sledovaných koncentracích neměly mikroemulze antimikrobní účinky, byl proveden test neředěné mikroemulze s koncentrací esenciálních olejů ca 50krát vyšší (9500 µg/ml). Cílem testu bylo stanovit, zdali se při této koncentraci antimikrobní účinek olejů projeví. V další práci se pak počítá s použitím relevantnější koncentrační řady.

Měření zákalu suspenze probíhalo na přístroji Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad) a přístroj byl řízen programem Microplate Manager (Bio-Rad). Naměřené průměrné hodnoty byly použity k sestavení růstových křivek. Růst bakterií v čistém MBP byl porovnán s růstem bakterií v MPB s příslušnou koncentrací mikroemulze a vyhodnocen jako index růstu IR. Index růstu byl stanoven po 10 hodinách kultivace. Index růstu byl vypočítán podle vztahu (6) [12]:

$$IR(\%) = \frac{(OD_{655} - OD_{NK})}{OD_{PK}} \cdot 100 \quad (6)$$

Kde:

IR ..... index růstu

$OD_{655}$  .... hodnota zákalu suspenze testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze

$OD_{NK}$  ..... hodnota zákalu negativní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze

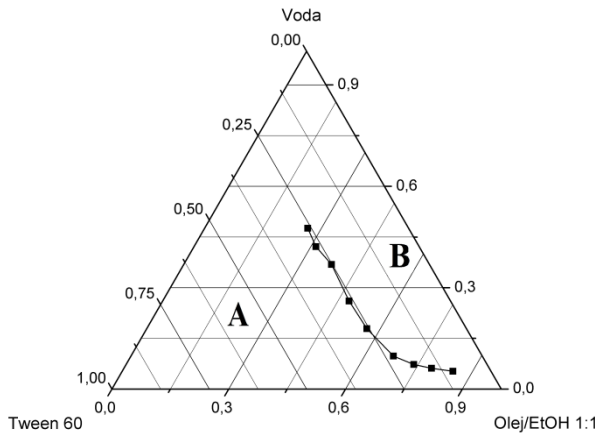
$OD_{PK}$  ..... hodnota zákalu pozitivní kontroly

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

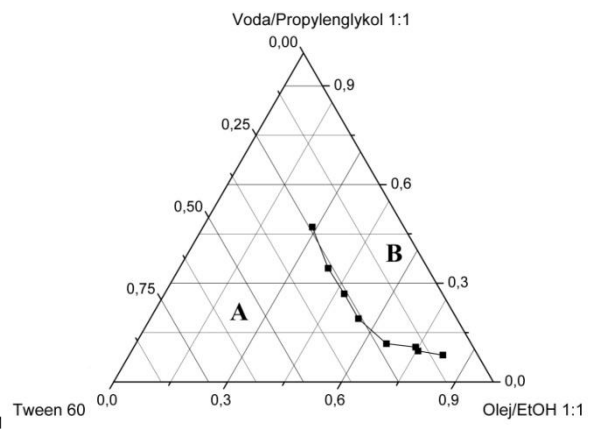
### 4.1 Fázové diagramy – grafické znázornění soustav o třech složkách

Vznik mikroemulzí sledovaných esenciálních olejů byl studován a popsán pomocí fázových diagramů. Mikroemulze byly připraveny míšením třech omezeně mísitelných složek: oleje (esenciální olej s etanolem 1:1), surfaktantu (Tween 60) a vody nebo vody s propylenglykolem v poměru 1:1. Jako surfaktant byl použit Tween 60, který je netoxický a je běžně užíván v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Ko-surfaktantem byl absolutní etanol. Nejdříve byly studovány systémy, ve kterých byla vodná část mikroemulzí tvořena roztokem vody a propylenglykolu v poměru 1:1. Propylenglykol měl v takto připravených systémech zlepšit solubilizaci oleje. V dalším kroku testování byla jako vodná fáze použita pouze demineralizovaná voda. Podobně byl testován vliv snížení obsahu etanolu v olejové fázi z původního poměru esenciální olej:etanol 1:1 na esenciální olej:etanol 4:1. Toto snížení se ale ukázalo jako nevhodné, protože zmenšovalo jednofázovou oblast výskytu mikroemulzí (výsledky nejsou prezentovány). Z esenciálních olejů byly vybrány následující oleje: citrónový, skořicový, hřebíčkový a tymiánový. Pomocí postupu popsaného v kapitole 3.5.2 této bakalářské práce byly sestrojeny fázové diagramy, které jsou souhrnně uvedeny na Obr. 10. Jak je patrné, plochy těchto diagramů jsou rozděleny binodální křivkou na dvě oblasti, a to homogenní (A) a heterogenní (B). Z fázových diagramů je homogenní oblast dobře patrná. Heterogenní oblast (B) je charakteristická omezenou mísitelností jednotlivých složek a přítomností běžné emulze. Oblast neomezené mísitelnosti je typická pro homogenní (jednofázovou) oblast (A) a představuje mikroemulzní region. Z obrázků je zřejmé, že přítomnost propylenglykolu působí pozitivně na rozšíření jednofázové oblasti. U téměř všech použitých esenciálních olejů došlo v přítomnosti propylenglykolu ve vodné fázi ke zvětšení oblasti výskytu mikroemulzí, respektive ke zmenšení heterogenní oblasti. Přítomností propylenglykolu bylo nejméně ovlivněno fázové chování mikroemulzí citronového oleje, což je patrné ze srovnání obr. 10 a) a 10 b), kde je v obou případech patrný jen malý rozdíl mezi velikostmi obou homogenních oblastí. Mikroemulze ostatních esenciálních olejů byly ovlivněny přítomností propylenglykolu podstatně více. To je možné dokumentovat na srovnání obrázků 10 c) a 10 d) pro mikroemulzi skořicového oleje, ze kterých je zcela zřejmá změna velikostí oblastí omezené mísitelnosti, způsobená přítomností propylenglykolu. Při použití propylenglykolu ve vodné fázi byla nejmenší heterogenní oblast zaznamenána u mikroemulze se skořicovým olejem a největší u mikro-

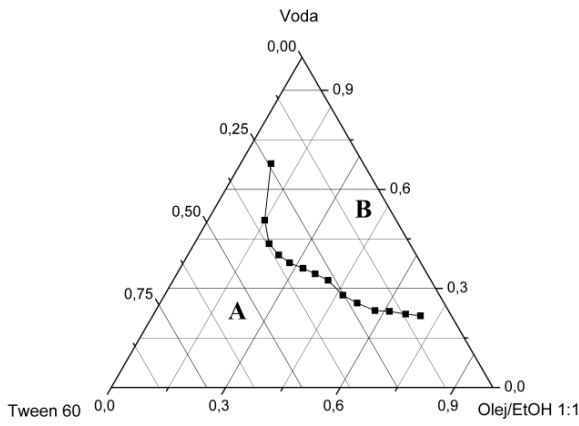
emulze s olejem citronovým a tymiánovým. Obdobné chování bylo možné pozorovat i v případě, kdy vodnou fází tvořila pouze demineralizovaná voda, v jejíž přítomnosti byla heterogenní oblast nejmenší opět u mikroemulze s hřebíčkovým olejem.



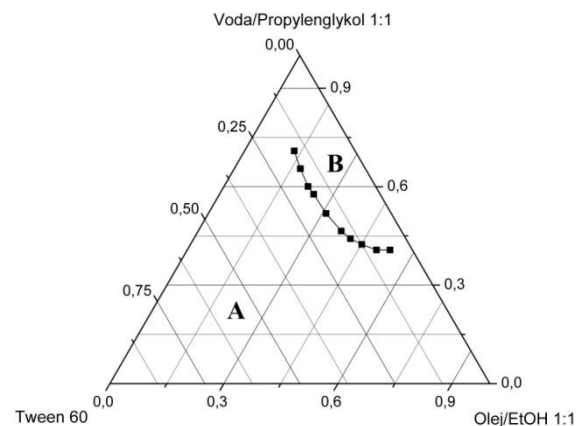
a) citronový olej/voda



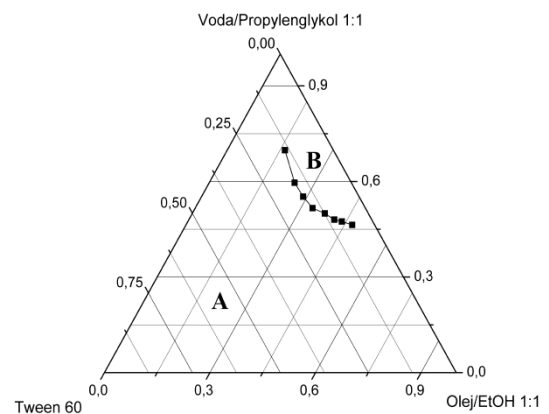
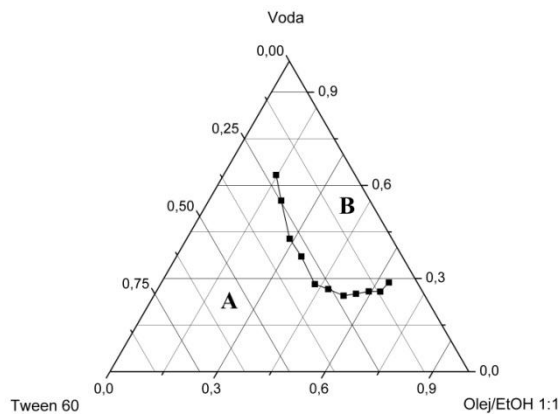
b) citronový olej/voda:propylenglykol 1:1



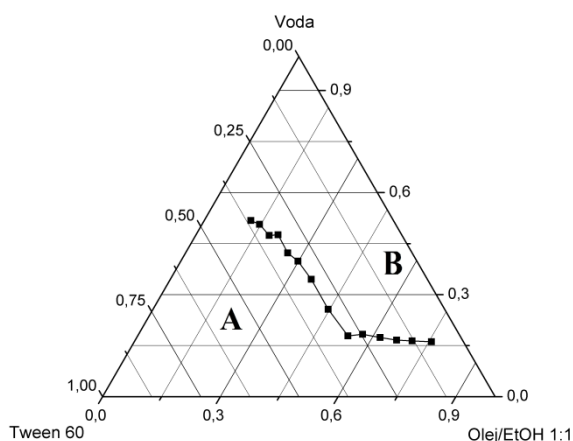
c) skořicový olej/voda



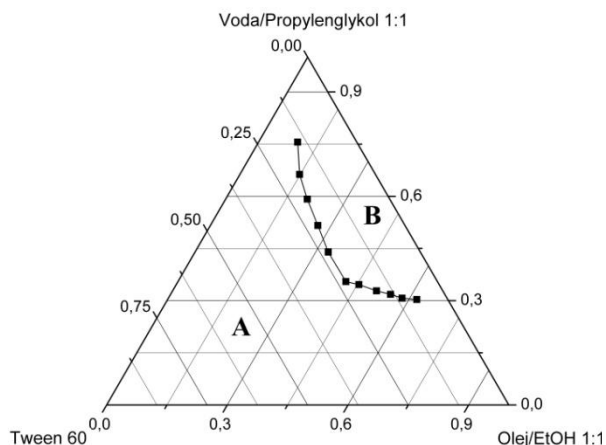
d) skořicový olej/voda:propylenglykol 1:1



e) hřebíčkový olej/voda



f) hřebíčkový olej/voda:propylenglykol 1:1



g) tymiánový olej/voda

Obr. 10. Fázové diagramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde je olejová fáze tvořena uvedenými esenciálními oleji a etanolem v poměru 1:1. Písmenem **A** je označena oblast výskytu mikroemulze (jedna fáze), písmenem **B** oblast heterogenní s výskytem více fází.

h) tymiánový olej/voda:propylenglykol 1:1

## 4.2 Charakterizace mikroemulzí

Velikost částic byla stanovena metodou fotonové korelační spektroskopie. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tab. 10 a 11. Typická distribuce velikostí částic připravených mikroemulzí je znázorněna na obr. 11. Z těchto tabulek vyplývá, že velikost částic připravených mikroemulzí byla homogenní a pohybovala se v rozmezí 9 – 11 nm v případě, kdy disperzním médiem byla směs propylenglykolu s vodou, a 13 – 14 nm v případě, kdy disperzním médiem byla voda. Pro nefiltrované vzorky byla navíc charakteristická přítomnost další populace částic s velikostí cca 300 nm. Množství těchto částic však bylo malé a činilo maximálně 3 % (vztaženo na celkový objem částic v mikroemulzích). Vzhledem ke skutečnosti, že velikost částic byla ve všech případech menší než 15 nm a velikost pórů použitého sterilního filtru je 220 nm, nepředpokládá se, že by filtrace velikost částic ovlivnila.

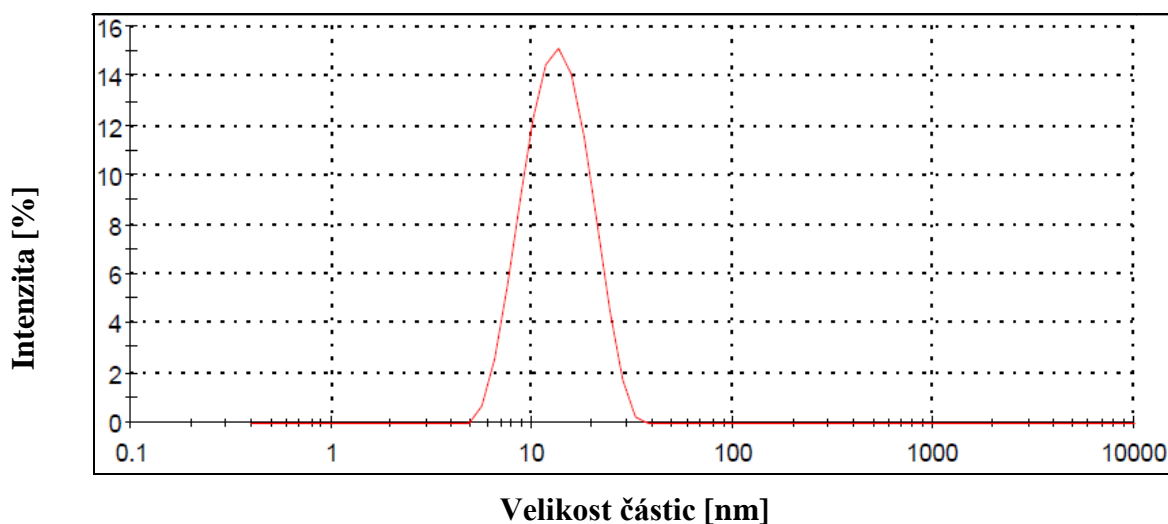


Tab. 10. Velikost částic mikroemulzí s vodnou fází tvořenou směsí voda a propylenglykol v poměru 1:1 stanovená PCS (nefiltrováno přes 0.22  $\mu\text{m}$  sterilní filtr).

Složení olejové fáze mikroemulzí	Velikost částic [nm]
Citrónový olej	10
Skořicový olej	11
Hřebíčkový olej	9
Tymiánový olej	9

Tab. 11. Velikost částic mikroemulzí s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou stanovená PCS (filtrováno přes 0.22  $\mu\text{m}$  sterilní filtr).

Složení olejové fáze mikroemulzí	Velikost částic [nm]
Citrónový olej	14
Skořicový olej	13
Hřebíčkový olej	14
Tymiánový olej	13



Obr. 11. Distribuce velikostí částic mikroemulze s hřebíčkovým olejem.

Vizuální posouzení ukázalo, že mikroemulze určené pro mikrobiologickou analýzu byly transparentní a po dobu potřebnou pro provedení mikrobiologických testů u nich nedocházelo ke vzniku zákalu, nebo dalším jevům svědčícím o jejich rozpadu.

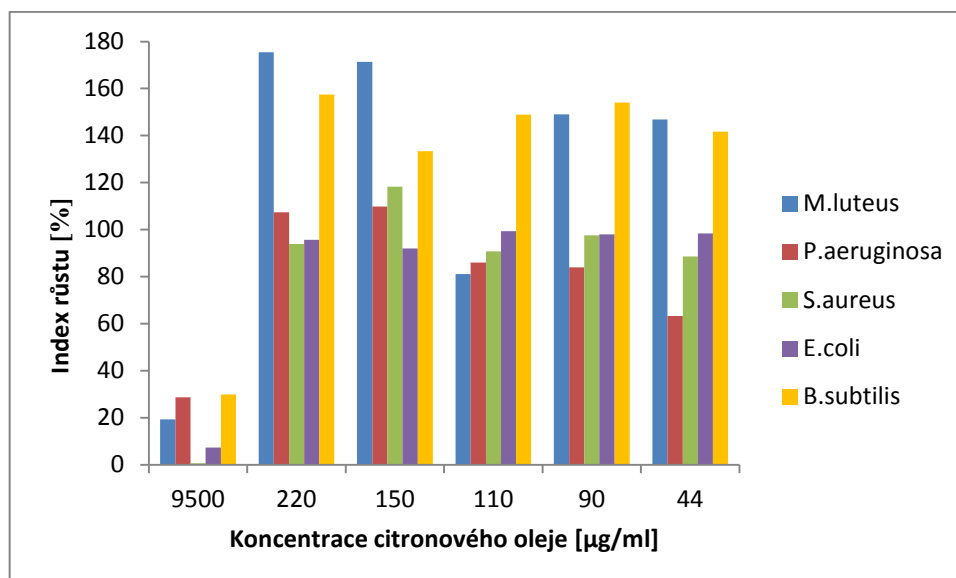
### 4.3 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst bakterií

V práci byly použity mikroemulze obsahující citronový, skořicový, hřebíčkový a tymiánový olej. Oleje byly vybrány na základě informací z literatury, díky jejich možné antimikrobní aktivitě. Připravené mikroemulze byly testovány v rozsahu koncentrací uvedených v tab. 8. Nejprve byla zvolena koncentrační řada 220 – 44 µg/ml s nižšími koncentracemi esenciálních olejů v mikroemulzích. Výsledky testů však ukázaly, že tyto koncentrace nevykazují očekávané účinky. Z tohoto důvodu byla pro další zkoušku zvolena mikroemulze s několikanásobně vyšší koncentrací esenciálního oleje (9500 µg/ml).

Vliv esenciálních olejů v mikroemulzích byl sledován na třech gram pozitivních (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) a dvou gram negativních (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) bakteriích. Růst bakterií byl hodnocen v tekutém médiu jako změna zákalu suspenze buněk měřená spektrofotometricky při 655 nm. Z naměřených údajů byly vypočteny průměry a sestrojeny růstové křivky. Dále byl vyhodnocen index růstu (IR), což je rozdíl mezi růstem bakterií v čistém kultivačním médiu a kultivačním médiu s přidavkem mikroemulze s esenciálními oleji. Hodnoty indexu růstu byly vyhodnocovány po 10 hodinách kultivace. Příklady růstových křivek jsou uvedeny v příloze P II. Výsledky indexu růstu byly graficky vyhodnoceny.

#### 4.3.1 Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

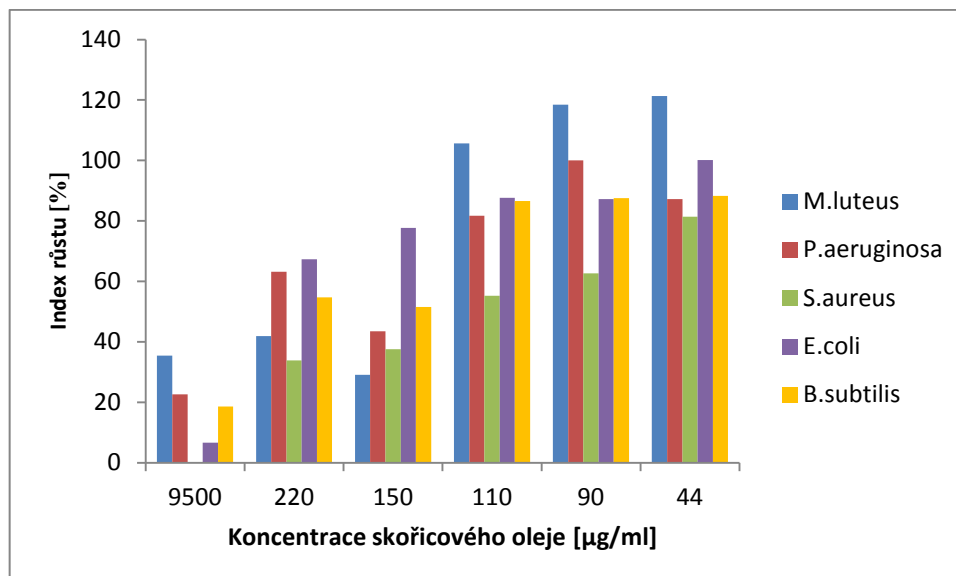
Indexu růstu bakterií při sledovaných koncentracích mikroemulzí s citronovým olejem je graficky vyjádřen na obr. 12. Největší inhibiční účinek citronového oleje v mikroemulzích byl, podle očekávání, zaznamenán při jeho nejvyšší koncentraci, tzn. 9500 µl/ml, která zcela inhibovala růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Obecně nejnižší inhibiční účinek byl zaznamenán u *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, kdy index růstu dosahoval hodnot téměř 150 - 170 %. Z toho lze učinit závěr, že růst těchto bakterií byl sledovanými koncentracemi citronového oleje v mikroemulzích (44 – 220 µg/ml) spíše podporován, než inhibován. Skutečnost, že antimikrobní látka může v nízkých koncentracích podporovat růst, je jev, který byl pozorován například i u monoacylglycerolů [22]. U ostatních bakterií, které byly kultivovány v médiu s mikroemulzí obsahující citronový olej v koncentracích od 44 - 220 µl/ml, byl index růstu srovnatelný s bakteriemi kultivovanými v čistém MPB.



Obr. 12. Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.  
Složení mikroemulzí: citronový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda.

#### 4.3.2 Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

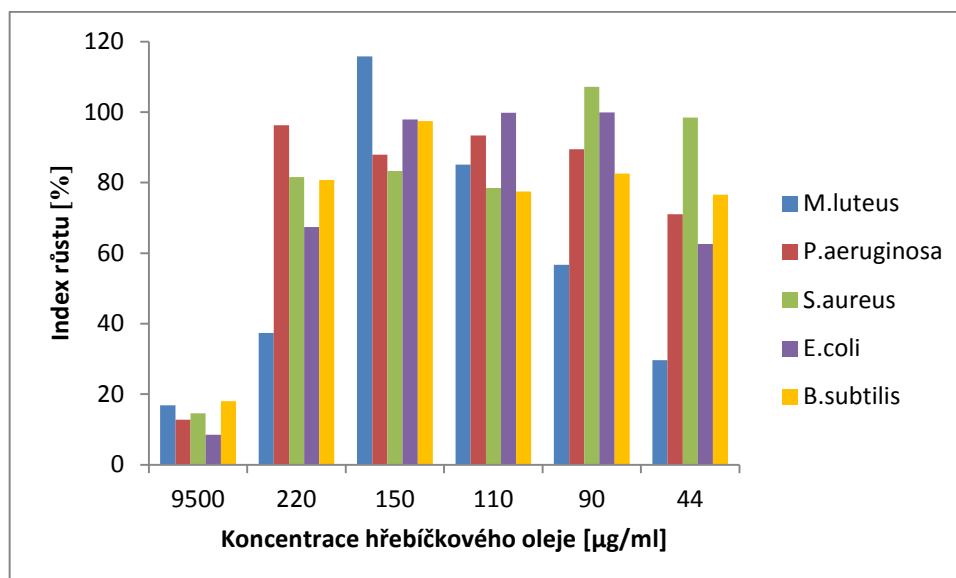
U skořicového oleje se index růstu sledovaných bakterií nejprve zvyšoval se snižující se koncentrací oleje v mikroemulzi. Většina bakterií vykazovala menší hodnoty indexu růstu v porovnání s růstem v čistém MPB. Zvýšení hodnot indexu růstu ve srovnání s MPB bylo opět pozorováno u *Micrococcus luteus* při koncentracích oleje 110, 90 a 44 µg/ml, avšak v rozmezí 9500 až 150 µg/ml byl jeho index růstu ca 40 % a nižší. Při použití neředěné mikroemulze (9500 µg/ml) byla hodnota indexu růstu bakterie *Staphylococcus aureus* nulová a mikroemulze obsahující skořicový olej zde měla maximální inhibiční účinek. Touto koncentrací oleje byly inhibovány i další sledované druhy bakterií, např. index růstu *Escherichia coli* činil 8 % a *Pseudomonas aeruginosa* 20 %. Grafické vyjádření indexu růstu bakterií při sledovaných koncentracích mikroemulzí se skořicovým olejem je zobrazeno na obr. 13.



Obr. 13. Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.  
Složení mikroemulzí: skořicový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda.

#### 4.3.3 Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

Vliv mikroemulze s obsahem hřebíčkového oleje na inhibici růstu bakterií je znázorněn na obr. 14. Z grafu je patrné, že působením mikroemulze s nejvyšší koncentrací oleje došlo ke snížení indexu růstu u všech sledovaných mikroorganismů ( $IR < 20\%$ ). Nejvíce zde byl inhibován růst *Escherichia coli*, kde byl stanoven index růstu 8 %. Průběh závislosti indexu růstu na koncentraci oleje je zajímavý pro *Micrococcus luteus*, u kterého je v rozmezí 9500 – 44 µg/ml patrný Gaussovský průběh, kdy se vzrůstající koncentrací dochází nejprve ke zvýšení indexu růstu (koncentrace 150 µg/ml) a poté k jeho opětovnému snížení (až do koncentrace 44 µg/ml). Růst dalších sledovaných mikroorganismů nebyl mikroemulzemi s hřebíčkovým olejem ve sledovaných koncentracích významně inhibován.

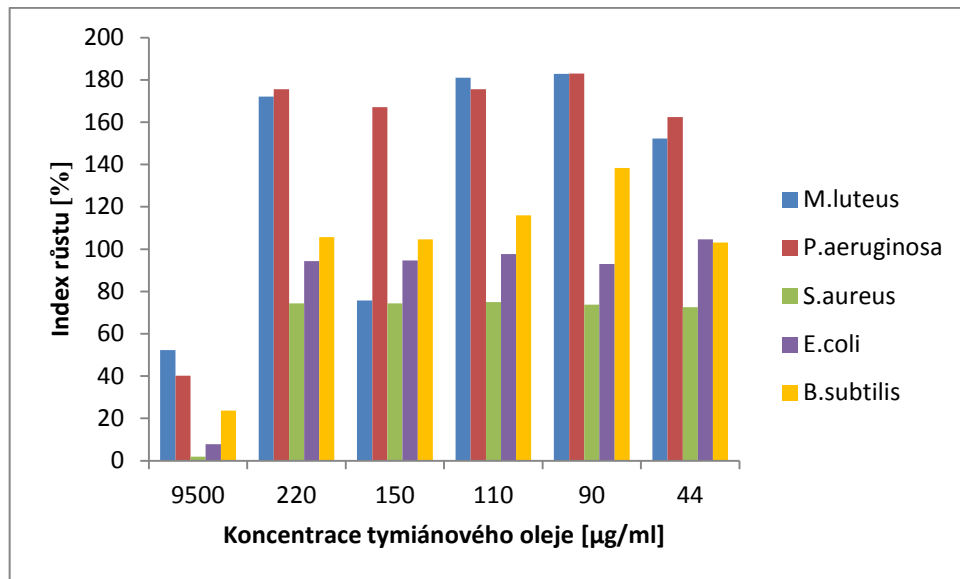


Obr. 14. Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií.

Složení mikroemulzí: hřebíčkový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda.

#### 4.3.4 Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií

Působení mikroemulze s tymiánovým olejem nejvíce odolávaly bakterie *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Hodnoty indexu růstu u těchto bakterií dosahovaly 170 – 180 %, což svědčí o tom, že koncentrace tymiánového oleje od 220 – 44 µg/ml růst sledovaných mikroorganismů podporovaly. Největší inhibiční účinek byl opět zaznamenán u neředěné mikroemulze, kterou byl nejvíce inhibován růst *Staphylococcus aureus* (IR = 2 %) a *Escherichia coli* (IR = 8 %), zatímco nejméně *Micrococcus luteus* (IR = 50 %) a *Pseudomonas aeruginosa* (IR = 40 %). Ostatní stanovené hodnoty indexu růstu bakterií v koncentracích tymiánového oleje v rozmezí 44 – 220 µg/ml byly prakticky srovnatelné a vykazovaly pouze malou koncentrační závislost, např. *Staphylococcus aureus* (IR = 75 %), *Escherichia coli* (IR = 100 %). Grafické vyjádření indexu růstu bakterií v přítomnosti mikroemulzí s tymiánovým olejem je zobrazeno na obr. 15.



Obr. 15. Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: tymiánový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda.

## 5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo připravit mikroemulze s obsahem esenciálních olejů, vhodně je charakterizovat a provést úvodní zkoušky jejich antibakteriální účinnosti. K nalezení vhodného složení zajišťujícího stabilní mikroemulze byly sestrojeny fázové diagramy tříložkového systému voda – olej – surfaktant, kde olejová fáze byla tvořena příslušným esenciálním olejem s etanolem v poměru 1:1 a vodná fáze sestávala buď ze směsi voda/propylenglykol nebo demineralizované vody. Z esenciálních olejů byl vybrán olej citronový, skořicový, hřebíčkový a tymiánový. Jako surfaktant byl použit Tween 60 a ko-surfaktantem byl etanol.

Fázové diagramy prokázaly, že přítomnost propylenglykolu pozitivně ovlivňuje solubilizaci olejů a zvětšuje velikost jednofázové, mikroemulzní oblasti.

U všech připravených mikroemulzí byla stanovena velikost částic metodou fotonové korelační spektroskopie, která ležela v rozmezí 9 – 14 nm. Zároveň byly mikroemulze hodnoceny vizuálně.

Díky sestrojení fázových diagramů bylo zjištěno vhodné složení mikroemulzí zajišťující jejich stabilitu a k testování inhibičního účinku na vybrané bakterie (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) byly připraveny mikroemulze ve složení esenciální olej/etanol/Tween 60/demineralizovaná voda.

Největší inhibiční účinek na sledované bakterie vykazovaly neředěné mikroemulze s koncentrací esenciálních olejů 9500 µg/ml, v jejichž přítomnosti byly hodnoty indexu růstu všech bakterií nižší než 50 %. Nejcitlivější bakterií byl *Staphylococcus aureus*, jehož růst byl mikroemulzemi s obsahem citronového, skořicového a tymiánového oleje zcela inhibován. Nejvíce odolnou bakterií byl *Micrococcus luteus* s hodnotami indexu růstu často přesahujícími 100 %. Z výsledku je rovněž zřejmé, že nelze jednoznačně určit, zda mikroemulzemi byly více inhibovány grampozitivní nebo gramnegativní bakterie.

Je třeba konstatovat, že výsledky předložené práce představují úvodní studii do problematiky antimikrobní účinnosti mikroemulzí esenciálních olejů, kterou je třeba dále rozšířit. Další práce bude zaměřena na následující aktivity:

- zlepšení formulace mikroemulzí, především zvýšení obsahu esenciálních olejů;

- 
- podrobnější studium antimikrobní účinnosti připravených mikroemulzí ve vhodných koncentračních rozmezích;
  - vyjasnění vlivu přítomnosti etanolu a Tweenu 60 na antimikrobní účinky mikroemulzí.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob.* 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001, 160 s. ISBN 80-731-8016-2.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav.* Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-807-0807-453.
- [3] KŘÍŽOVÁ, Markéta. *Příprava stabilních mikroemulzí 1-monoacylglycerolů s antimikrobními účinky.* Zlín, 2011. Diplomová práce. UTB ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [4] Microemulsions. PATEL, Mrunali R. [online]. [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <Http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsions-novel-drug-delivery-vehicle>.
- [5] *Chemie a technologie tenzidů a detergentů: Fyzikální, chemické a technické vlastnosti aktivních látek* [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: [http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0006\\_chemie\\_a\\_tecnologie\\_tuku\\_a\\_detergentu/distancni\\_text\\_II/M0006\\_chemie\\_a\\_tecnologie\\_tuku\\_a\\_detergentu\\_distancni\\_text\\_ii.pdf](http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0006_chemie_a_tecnologie_tuku_a_detergentu/distancni_text_II/M0006_chemie_a_tecnologie_tuku_a_detergentu_distancni_text_ii.pdf).
- [6] GARTI, Nissim. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals.* Boca Raton, Fla: CRC Press, 2008. ISBN 978-142-0074-369.
- [7] Mikroemulze. [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mikroemulze.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html).
- [8] AZEEM, Adnan, Mohammad RIZWAN, Farhan J. AHMAD, Zeenat I. KHAN, Roop K. KHAR, Mohammed AQIL a Sushama TALEGAONKAR. Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. 2008, s. 278-289. ISSN 1872-2113/08. DOI: 18722113.
- [9] KIZLINK, Juraj. *Technologie chemických látek.* Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, 2001. ISBN 80-214-2013-8.
- [10] Ko-surfaktant. [online]. [cit. 2012-03-31]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/ko-surfaktant.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/ko-surfaktant.html).
- [11] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology.* 3: Wiley-Interscience, 2006.

- [12] ŠEVČÍKOVÁ, Petra. *Příprava emulzí*. Zlín, 2010. Diplomová práce. UTB ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Pavlína Vltavská, Ph.D.
- [13] PAUL, Bidyut K. a Satya P. MOULIK. *Current science. Uses and applications of microemulsions*. 2001.
- [14] CAN BAŞER a DEMIRCI. *Chemistry of Essential Oils*. BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, c2007, s. 43-75. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [15] VONÁŠEK, František, Emilie TREPKOVÁ a Ladislav NOVOTNÝ. *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p., 1987.
- [16] SOBKOVÁ, Kristýna. *Antibakteriální účinky přírodních látek*. Pardubice, 2009. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.
- [17] KOROCH a JULIANI. *Bioactivity of Essential Oils and Their Components*. BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, c2007, s. 87-93. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [18] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. *Current Medicinal Chemistry. Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. 2003.
- [19] POKLUDOVÁ, Lucie. *STUDIJNÍ TEXT MASARYKOVY UNIVERZITY. Základy terapie antibiotiky*.
- [20] ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK. *Fyzikální chemie I*. Vyd. 4. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 180 s. ISBN 80-731-8324-2.
- [21] *Nanočástice - Měření velikosti a stability pomocí fotonové korelační spektroskopie (PCS)* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: [http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin\\_2010/file/CHEMAGAZIN\\_XXI\\_4\\_cl4.pdf](http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl4.pdf) .
- [22] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 978-082-4740-375.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

o/v	System olej ve vodě.
v/o	System voda v oleji.
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha (z angl. hydrophilic-lipophilic balance).
DNA	Kyselina deoxyribonukleová.
GC	Plynová chromatografie.
MIC	Minimální inhibiční koncentrace.
MPA	Masopeptonový agar.
MPB	Masopeptonový bujón.
CCM	Česká sbírka mikroorganismů.
OD	Optická hustota.
IR	Index růstu.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Příklady emulzí</i> .....	13
<i>Obr. 2. Mechanismy rozpadu emulzních systémů</i> .....	14
<i>Obr. 3. Základní typy mikroemulzních systémů</i> .....	15
<i>Obr. 4. Dělení surfaktantů</i> .....	17
<i>Obr. 5. Fázový diagram o třech složkách</i> .....	22
<i>Obr. 6. Izoprenové jednotky</i> .....	27
<i>Obr. 7. Příklady seskviterpenů</i> .....	27
<i>Obr. 8. Eugenol, skořicový aldehyd, vanilin</i> .....	27
<i>Obr. 9. <math>\gamma</math>-lakton, <math>\delta</math>-lakton</i> .....	28
<i>Obr. 10. Fázové diagramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde je olejová fáze tvořena uvedenými esenciálními oleji a etanolem v poměru 1:1. Písmenem <b>A</b> je označena oblast výskytu mikroemulze (jedná fáze), písmenem <b>B</b> oblast heterogenní s výskytem více fází</i> .....	48
<i>Obr. 11. Distribuce velikostí částic mikroemulze s hřebíčkovým olejem</i> .....	49
<i>Obr. 12. Vliv citronového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: citronový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda</i> .....	51
<i>Obr. 13. Vliv skořicového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: skořicový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda</i> .....	52
<i>Obr. 14. Vliv hřebíčkového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: hřebíčkový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda</i> .....	53
<i>Obr. 15. Vliv tymiánového oleje v mikroemulzi na růst vybraných bakterií. Složení mikroemulzí: tymiánový olej:etanol 1:1/Tween 60/voda</i> .....	54
<i>Obr. 16. Připravené mikroemulze s vodnou fází složenou ze směsi voda/propylenglykol 1:1 (nestabilní)</i> .....	63
<i>Obr. 17. Připravené mikroemulze s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou (stabilní)</i> .....	63
<i>Obr. 18. Graf závislosti zákalu na čase pro <i>S.aureus</i> v mikroemulzi se skořicovým olejem</i> .....	64
<i>Obr. 19. Graf závislosti zákalu na čase pro <i>S. aureus</i> v mikroemulzi s tymiánovým olejem</i> .....	64

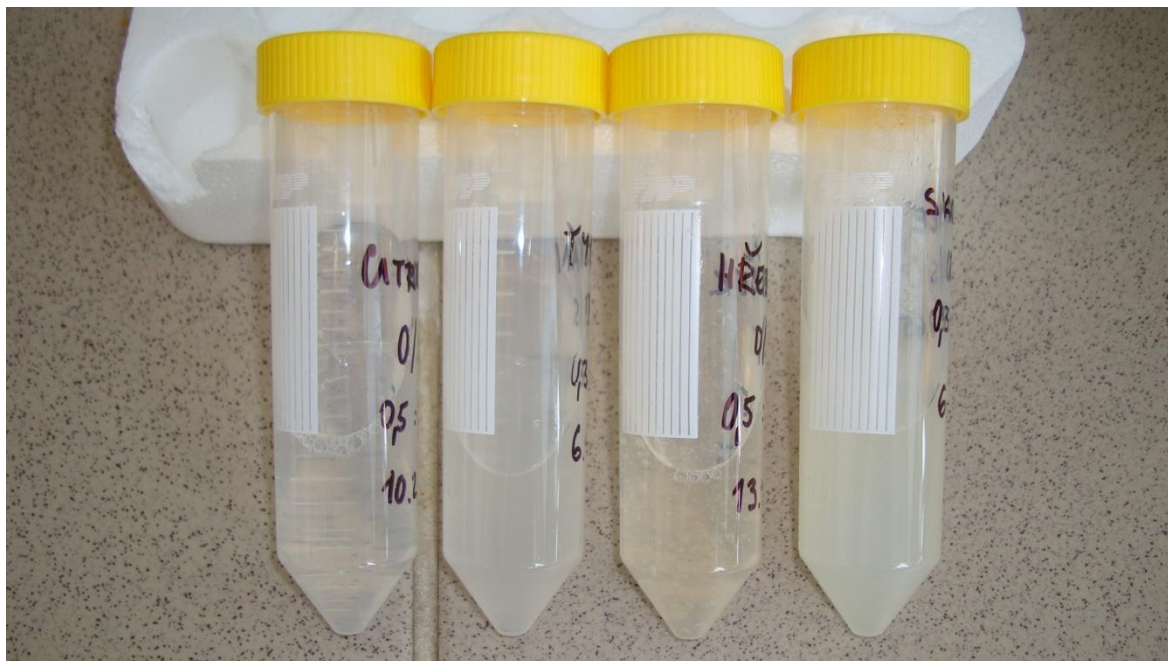
**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Přehled nejběžnějších anionických surfaktantů .....</i>	18
<i>Tab. 2. Přehled nejběžnějších kationických surfaktantů .....</i>	19
<i>Tab. 3. Praktické použití surfaktantů v závislosti na hodnotě HLB .....</i>	20
<i>Tab. 4. Příklady surovin pro přípravu kosmetických mikroemulzí .....</i>	21
<i>Tab. 5. Zdroje a složení vybraných esenciálních olejů .....</i>	30
<i>Tab. 6. Teoretická množství složek použitých pro přípravu mikroemulzí .....</i>	40
<i>Tab. 7. Nominální složení stabilních mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů .....</i>	40
<i>Tab. 8. Koncentrace esenciálního oleje v mikroemulzích pro testování antimikrobní účinnosti .....</i>	43
<i>Tab. 9. Složení MPB. ....</i>	44
<i>Tab. 10. Velikost částic mikroemulzí s vodnou fází tvořenou směsí voda a propylenglykol v poměru 1:1 stanovená PCS (nefiltrováno přes 0.22 μm sterilní filtr). ....</i>	49
<i>Tab. 11. Velikost částic mikroemulzí s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou stanovená PCS (filtrováno přes 0.22 μm sterilní filtr) .....</i>	49

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I .....	60
Příloha P II .....	61

## PŘÍLOHA P I: PŘIPRAVENÉ MIKROEMULZE

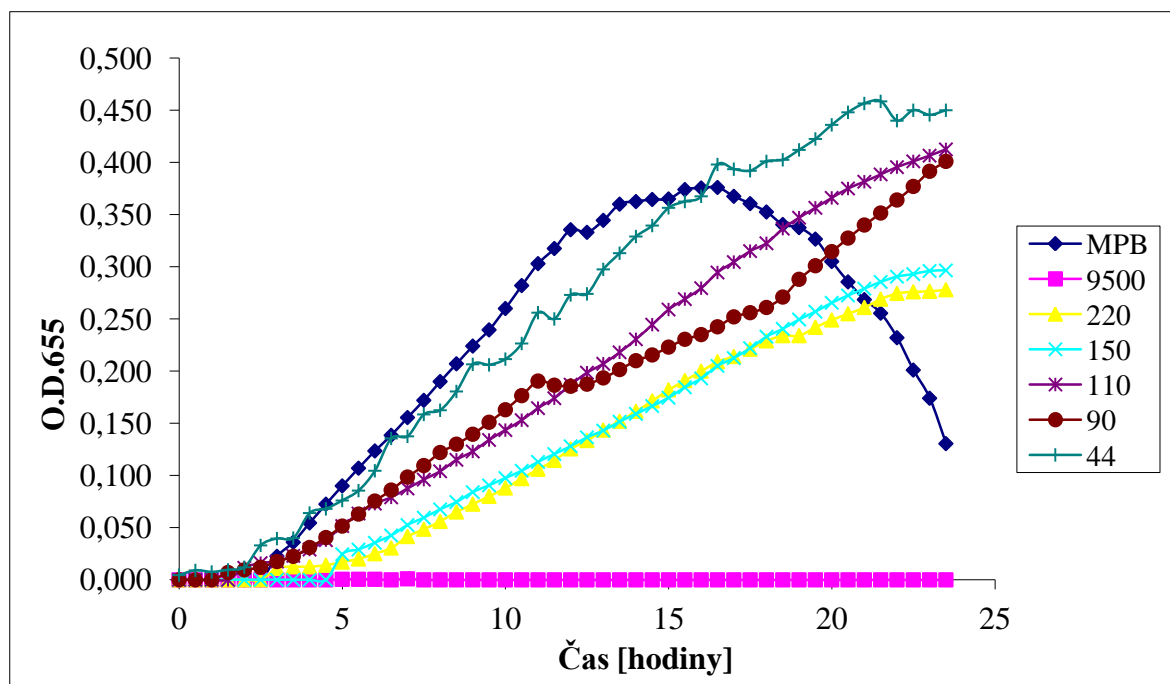


Obr. 16. Připravené mikroemulze s vodnou fází složenou ze směsi voda/propylenglykol 1:1 (nestabilní).

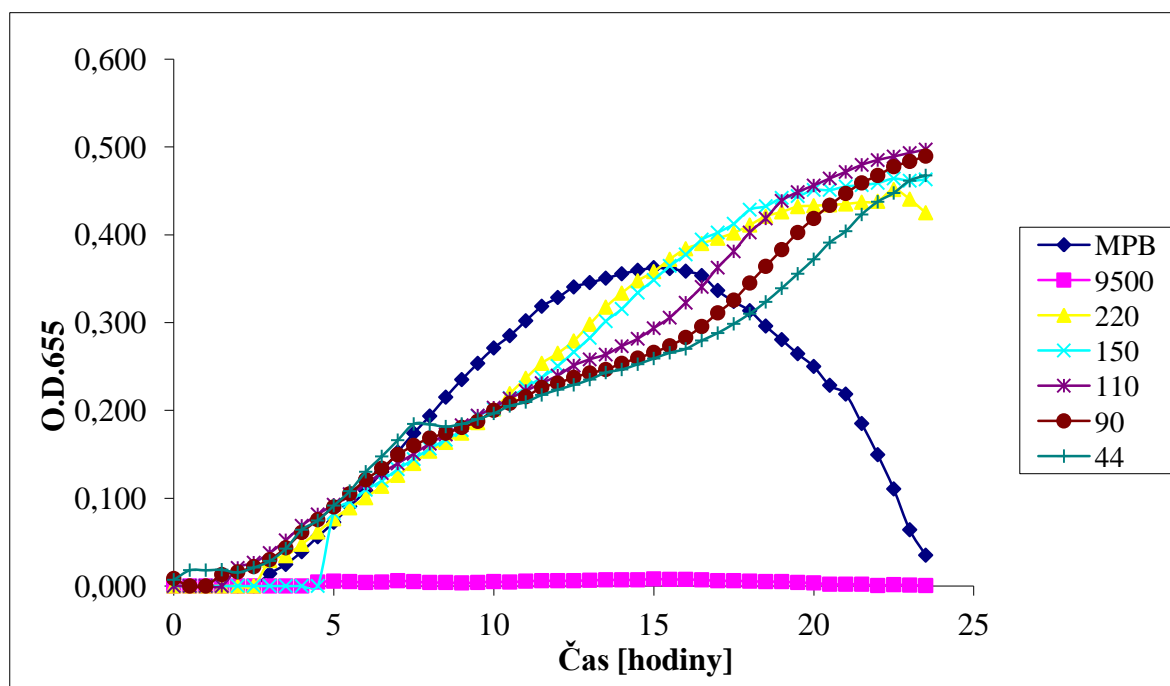


Obr. 17. Připravené mikroemulze s vodnou fází tvořenou demineralizovanou vodou (stabilní).

## PŘÍLOHA P II: PŘÍKLADY RŮSTOVÝCH KŘIVEK SLEDOVANÝCH BAKTERIÍ



Obr. 18. Graf závislosti zákalu na čase pro *S.aureus* v mikroemulzi se skořicovým olejem.



Obr. 19. Graf závislosti zákalu na čase pro *S. aureus* v mikroemulzi s tymiánovým olejem.