



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED NATURAL EXTRACTS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Šandová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1588/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Lucie Šandová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Antimikrobiální aktivita vybraných přírodních extraktů

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární rešerši na téma:
  - problematika mikrobiální rizikovosti kosmetických přípravků
  - možnosti využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů
  - přírodní kosmetika a specifika její konzervace
2. V praktické části posuďte antimikrobiální účinky vybraných extraktů.
3. Zjištěná data vyhodnoťte, porovnejte s výstupy literární rešerše a zformulujte závěry práce.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Lucie Šandová  
student(ka)

-----  
Ing. Jana Zemanová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan



## ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit antimikrobiální aktivitu vybraných přírodních extraktů, konkrétně tří modelových extraktů vyrobených z třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) a čtyř komerčních extraktů – z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), meduňky lékařské (*Melissa officinalis*), echinaceových bylinných kapek (*Echinacea purpurea*) a extraktu echinacey (*Echinacea purpurea*) se zázvorem vůči vybraným mikroorganismům.

Teoretická část je zaměřena na popis bioaktivních látek, vyskytujících se v rostlinách. Dále popisuje extrakční metody pro získávání extraktů z rostlinných materiálů, metody pro stanovení antimikrobiální aktivity a na závěr využití přírodních extraktů v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

V experimentální části byl testován antimikrobiální účinek zmíněných extraktů vůči gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, grampozitivní bakterii *Bacillus cereus* a kvasince *Candida glabrata*. Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity a porovnány dvě metody – jamková a disková difúzní metoda.

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti vybraným mikroorganismům vykazoval komerční extrakt meduňky lékařské, s vysokým obsahem geraniolu a citronellolu. Významnou antimikrobiální aktivitu vykazoval i komerční extrakt levandule lékařské. Naopak extrakty z echinacey nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu proti vybraným mikroorganismům.

## ABSTRACT

The aim of the bachelor thesis was to determine antimicrobial activity of selected natural extracts, specifically three model extracts made from purple coneflower (*Echinacea purpurea*) and four commercial extracts – true lavender (*Lavandula angustifolia*), lemon balm (*Melissa officinalis*), echinacea herbal drops (*Echinacea purpurea*) and echinacea extract (*Echinacea purpurea*) with ginger, against selected microorganisms.

Theoretical part is focused on description of bioactive substances that are found in plants. It also describes extraction methods used for obtaining extracts from plant materials, methods for determining antimicrobial activity and then the use of natural extracts in food and cosmetic industry.

In experimental part, antimicrobial effect of the extracts was tested against gram-negative bacteria *Escherichia coli*, gram-positive bacteria *Bacillus cereus* and yeast *Candida glabrata*. For determination of the antimicrobial activity, two methods (hole method and disc diffusion method) were used and compared.

The highest antimicrobial activity against selected microorganisms was showed by commercial extract of lemon balm, which contains lot of geraniol and citronellol. Significant antimicrobial activity had also been shown by commercial extract of true lavender. On the contrary, extracts from Echinacea had not shown any antimicrobial activity against selected microorganisms.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antimikrobiální aktivita, mikrobiální rizikovost, přírodní extrakty, přírodní kosmetika, konzervace, levandule lékařská, meduňka lékařská, třapatka nachová, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida glabrata*.

## **KEYWORDS**

Antimicrobial activity, microbial risk, natural extracts, natural cosmetics, preservation, lavender (*Lavandula angustifolia*), lemon balm (*Melissa officinalis*), purple coneflower (*Echinacea purpurea*), *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida glabrata*.

ŠANDOVÁ, Lucie. *Antimikrobiální aktivita vybraných přírodních extraktů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124028>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jana Zemanová.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studentky

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat Ing. Janě Zemanové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytnuté cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Márii Ďubašákové za pomoc při práci v laboratoři a vyhodnocení výsledků, doc. Ing. Evě Vítové Ph.D. za pomoc při zpracování bakalářské práce a v neposlední řadě Radce Novákové za pomoc při práci v laboratoři a poskytnutý čas.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Antimikrobiální aktivita .....	9
2.2	Esenciální oleje .....	9
2.3	Charakteristika bioaktivních látek .....	10
2.3.1	Fenolické látky .....	11
2.3.2	Terpeny, terpenoidy .....	12
2.3.3	Alkaloidy .....	14
2.4	Vybrané přírodní extrakty .....	14
2.4.1	Levandulový extrakt .....	14
2.4.2	Meduňkový extrakt .....	14
2.4.3	Echinaceový extrakt .....	15
2.5	Extrakční metody vhodné pro získávání extraktů z rostlinných materiálů .....	15
2.6	Využití přírodních extraktů v potravinářství .....	16
2.7	Využití přírodních extraktů v kosmetických produktech .....	17
2.7.1	Kosmetické přípravky .....	17
2.7.2	Mikrobiální rizikovost kosmetických přípravků .....	17
2.7.3	Konzervační látky používané v kosmetice .....	18
2.7.4	Přírodní kosmetika .....	21
2.7.5	Využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů .....	24
2.8	Metody vhodné pro stanovení antimikrobiální aktivity .....	25
2.8.1	Disková difúzní metoda .....	25
2.8.2	Jamková difúzní metoda .....	26
2.8.3	Antimikrobiální gradientní metoda (E-test) .....	26
2.8.4	Tenkvrstvá chromatografie – bioautografie .....	26
2.8.5	Diluční metody .....	26
2.9	Charakteristika použitých mikroorganismů .....	27
2.9.1	Escherichia coli .....	27
2.9.2	Bacillus cereus .....	27
2.9.3	Candida glabrata .....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
3.1	Seznam použitých pomůcek, přístrojů a chemikálií .....	30
3.1.1	Seznam použitých pomůcek a přístrojů .....	30
3.1.2	Seznam použitých chemikálií .....	30
3.2	Analyzované vzorky .....	30
3.2.1	Extrakty z echinacey .....	30
3.2.2	Levandulová silice FRANCE ( <i>Lavandula Hybrid a Abrial Herb Oil</i> ) .....	31
3.2.3	Meduňka citronelová indická silice ( <i>Cymbopogon Winterianus Oil</i> ) .....	31
3.3	Seznam použitých mikroorganismů .....	32
3.4	Kultivační média a jejich příprava .....	32
3.4.1	Nutrient Agar No. 2 (masopeptonový agar - MPA) .....	32
3.4.2	Malt Extract Agar Base (sladinový agar) .....	32

3.4.3	Masopeptonový bujon .....	32
3.4.4	Sladinový bujon.....	32
3.5	Očkování a kultivace mikroorganismů .....	33
3.6	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	33
3.6.1	Jamková difuzní metoda.....	33
3.6.2	Disková difuzní metoda .....	34
3.7	Statistické vyhodnocení výsledků měření .....	35
4	VÝSLEDKY .....	36
4.1	Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 40% .....	36
4.2	Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 20% .....	38
4.3	Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z kořene echinacey 20% .....	39
4.4	Antimikrobiální aktivita echinaceových bylinných kapek.....	41
4.5	Antimikrobiální aktivita extraktu echinacey se závorem .....	42
4.6	Antimikrobiální aktivita levandulové silice.....	44
4.7	Antimikrobiální aktivita meduňky citronelové indické silice.....	46
5	DISKUZE.....	50
6	ZÁVĚR .....	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	53
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	60

# 1 ÚVOD

Výroba kosmetických produktů je ovlivněna požadavky spotřebitelů. V současnosti mnoho spotřebitelů vyhledává potraviny bez chemických postřiků a přísad, a stejně je tomu i v kosmetickém průmyslu. Spotřebitelé vyžadují kosmetické produkty bez synteticky vyrobených látek. Z tohoto důvodu spotřebitelé upřednostňují přírodní kosmetiku.

Vyrobít kosmetiku bez konzervačních látek nebo za využití rostlinných konzervačních látek je obtížné. Konzervační látky se v kosmetických produktech využívají k inhibici mikroorganismů. Většina kosmetických produktů obsahuje jako hlavní složku vodu, která významně napomáhá vytvářet příznivé prostředí pro růst a množení mikroorganismů. Mikroorganismy způsobují změnu zbarvení, nepříjemné aroma a rozklad účinných látek kosmetického produktu.

Kosmetické produkty bez konzervačních látek jsou např. ústní vody, parfémy a oleje. Tyto produkty není potřeba chránit, protože obsahují buď vysoké množství alkoholu, který inhibuje mikroorganismy, nebo neobsahují vodu, která významně napomáhá vytvářet příznivé prostředí pro růst a množení mikroorganismů a mikroorganismy tak zahynou.

Pro konzervaci kosmetických produktů pomocí rostlinných konzervačních látek se často využívají látky s antimikrobiálními účinky, jako jsou bylinné extrakty a esenciální oleje. Jedná se o látky, které jsou účinné proti vybraným mikroorganismům. Jejich kombinací je možné vytvořit komplexní ochranu pro kosmetický produkt.

Cílem této bakalářské práce je zpracování problematiky mikrobiální rizikovosti kosmetických přípravků, možnosti využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů a přírodní kosmetiky spolu se specifiky její konzervace. Cílem experimentální části je stanovení antimikrobiální aktivity vybraných přírodních extraktů vůči vybraným mikroorganismům, kterými jsou *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* a *Candida glabrata*.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

Tato práce je zaměřena na stanovení antimikrobiální aktivity extraktu připraveného z třapatky nachové (*Echinacea purpurea*). Pro srovnání byly analyzovány komerčně získané extrakty echinacey, levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) a meduňky lékařské (*Melissa officinalis*).

V následujících kapitolách je uvedena charakteristika, složení a vlastnosti zmíněných rostlinných materiálů a možnosti jejich praktického využití. Samostatná kapitola je věnována možnostem stanovení antimikrobiální aktivity.

### 2.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální látky jsou látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu. Antimikrobiální aktivita je síla látky inhibovat růst mikroorganismu, popř. usmrtit daný mikroorganismus. Antimikrobiální látky se rozlišují na antibakteriální, antimykotické a antivirové. Látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu, lze použít jako konzervační látky v potravinářství i v kosmetických přípravcích a jsou účinnou složkou řady léčivých produktů. Látky přírodního původu jsou vnímány jako účinné, bezpečné a spotřebiteli lépe přijímané [1].

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabraňuje růstu mikroorganismů. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení bakterie za určitou dobu [2].

### 2.2 Esenciální oleje

Byliny a jejich esenciální oleje byly používány od počátku lidské historie. Jejich prospěšné vlastnosti byly použity k maskování nepříjemných pachů, přilákání pozornosti ostatních lidí, přidávání chuťových a aromatických vlastností připraveným pokrmům, parfémům a kosmetice [3].

Esenciální oleje jsou definovány jako těkavé sekundární metabolity rostlin, které rostlině dodávají výraznou chuť a vůni. Produkuje je více než 17 500 druhů rostlin, z nichž asi jenom 300 se komerčně využívá. Sloučeniny obsažené v esenciálních olejích jsou syntetizovány v cytoplazmě a plastidech rostlinných buněk. Jsou produkovány a skladovány ve složitých sekrečních strukturách, jako jsou žlázy, sekreční dutiny a pryskyřičné kanály, dále se vyskytují jako kapičky v listech, stoncích, květech a ovoci, kůře a kořenech rostlin [3].

Esenciální oleje jsou vonné, těkavé, hydrofobní látky. Jedná se o komplexní směs sekundárních metabolitů skládající se z fenypropenů a terpenů s nízkým bodem varu. Podrobná analýza složení těkavých sloučenin olejů se získává plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. V esenciálních olejích se vyskytují cenné látky v podobě terpenoidů jako linalool, geraniol, borneol, mentol, thujanol, citronellol a další. Dalšími cennými látky jsou fenoly a aromatické aldehydy. Mezi fenoly řadíme thymol, karvakrol, eugenol, guajakol a mezi aromatické aldehydy patří cinnamaldehyd, kumarin, phellandral. Mají většinou cytotoxickou aktivitu, která je způsobena přítomností fenolů, aldehydů a alkoholů. Je účinná proti některým lidským nebo zvířecím patogenům a parazitům. Vykazují také vysokou antimikrobiální a antioxidační aktivitu [4].

Antimikrobiální vlastnosti rostlin jsou částečně připisovány jejich esenciálním olejům. Hydrofobnost esenciálních olejů a jejich složek je důležitá charakteristika, díky které se esenciální oleje mohou akumulovat v dvojvrstvě bakteriální buněčné membrány a mitochondrií, čímž se naruší struktura buňky, což má za následek jejich vyšší propustnost. Kromě toho antimikrobiální mechanismus některých esenciálních olejů tkví v narušení homeostáze buňky, což má za následek inhibici růstu a uhynutí buňky. Esenciální oleje reprezentují zdroj přírodních antimikrobiálních látek, což může být využito v potravinářském průmyslu jako biopreparáty zabraňující kažení potravin a prodlužující použitelnost produktů. Esenciální oleje by dále mohly snížit dávku chemických konzervačních látek a tím zmírnit jejich vedlejší účinky. Fenolické sloučeniny patří mezi sekundární metabolity s nejlepší antimikrobiální aktivitou, které se nacházejí v esenciálních olejích [4].

Při výrobě potravin je vážným problémem inhibice růstu mikroorganismů pomocí zavedených konzervačních látek. Odpor společnosti k používání synteticky připravených konzervačních látek jako je kyselina benzoová, kyselina sorbová, kyselina mléčná a další, vyžaduje nalezení alternativních řešení. Alternativním řešením může být využití esenciálních olejů jako konzervačních látek. Antimikrobiální vlastnosti esenciálních olejů by mohly vyřešit i problém s rostoucím počtem rezistentních kmenů mikroorganismů vůči stávajícím konzervačním látkám [3].

Esenciální oleje se z rostlin získávají různými typy destilace (hydrodestilací, parní destilací, suchou destilací) nebo lisováním rostlin za studena. Popřípadě je lze také izolovat fermentací, drcením, extrakcí nebo hydrolyzou. V závislosti na zvolené metodě se chemické složení získaného esenciálního oleje může lišit [3].

Esenciální oleje se využívají v potravinářském průmyslu pro výrobu cukrovinek, nápojů, sirupů aj. Setkáváme se s nimi i v kosmetice, při výrobě parfémů a produktů na tělo, dále pak se využívají ve farmaceutickém průmyslu pro své funkční vlastnosti a setkat se s nimi můžeme i při aromaterapii [4].

Chemické složení esenciálních olejů může být ovlivněno původem rostliny, environmentálními a genetickými faktory, druhem a poddruhem, zeměpisnou lokací, ročním obdobím, částí rostliny, která je zkoumána, nebo metodou, která byla použita k izolaci [4].

### **2.3 Charakteristika bioaktivních látek**

Mnoho aktivních látek je izolováno z rostlin. Rostliny tyto látky syntetizují jako ochranu proti hmyzu, býložravcům či různým mikroorganismům. Jsou to látky, které jsou zodpovědné za aroma (terpenoidy), za rostlinný pigment (chinony a taniny) a za chuť (terpenoidní kapsaicin) [5].

Rostliny jsou nepřetržitě v kontaktu s různými mikroorganismy včetně bakterií, hub a virů. S některými z nich žijí rostliny ve vzájemné symbióze, jedná se o rhizobie, rhizobakterie a plísňové interakce. Rhizobie jsou bakterie, které fixují vzdušný dusík v kořenovém systému. Rhizobakterie jsou schopny regulovat choroby rostlin způsobené půdními patogeny. Mnoho mikroorganismů ale nemá pozitivní vliv pro vývoj, reprodukci a produkci rostlin. Jedná se o patogeny, proti kterým mají rostliny vrozenou imunitu, jež zahrnuje několik obranných



mechanismů. Některé z těchto obranných funkcí jsou již předem vytvořeny jako součást rostlinných pletiv. Jedná se o fytoanticipiny, které představují základní chemickou bariéru proti mikrobiálním útokům. Fytoalexiny jsou aktivovány po rozpoznání patogenních mikroorganismů, zahrnují posílení buněčné stěny, biosyntézu lytických enzymů a produkci sekundárních metabolitů jako antimikrobiálních látek. Rozdělení fytoanticipinů a fytoalexinů není až tak jednoduché, protože jedna látka může být jak fytoanticipin, tak i fytoalexin v téže rostlině. Existuje i možnost, kdy je tato látka v jedné rostlině označována jako fytoanticipin a v druhé jako fytoalexin [6].

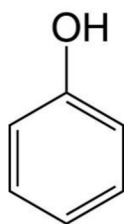
Mnoho rostlinných sekundárních metabolitů má různé biologické účinky jako antibakteriální, antimykotické, protizánětlivé a protirakovinové. Primární metabolity jsou sloučeniny produkované rostlinou pro její růst a správné fungování metabolismu. Sekundární metabolity, které jsou rostlinou vytvářeny jako produkty primárního metabolismu, slouží jako ochrana rostliny proti mikroorganismům, hmyzu a býložravcům. Sekundární metabolity jsou aktivnější proti grampozitivním bakteriím a většinou neaktivní proti gramnegativním bakteriím [7].

Bioaktivní složky v aromatických rostlinách mají obecně schopnost chránit tělo před poškozením způsobeným oxidativním stresem vyvolaným volnými radikály zhašením singletového kyslíku a indukci cytochromu nebo jiných enzymů. Navíc mohou inhibovat oxidační žluknutí, u některých produktů zpomalit vývoj nežádoucí chuti a přispívají ke zpomalení mikrobiálního růstu v potravinách [4].

### 2.3.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou látky, které mají hydroxylovou skupinu vázanou na benzenový kruh (**Obrázek 1**) a jsou zodpovědné za vůni a chuť prakticky všech potravin a rostlin. Jsou to látky s významnými antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi, které slouží také jako obranné látky rostlin. Jako vonné látky se uplatňují jednoduché fenoly, vznikající jako degradační produkty fenolových kyselin. Látky zodpovědné za chuť jsou jednoduché fenoly a polyfenoly jako např. třísloviny, flavonoidy, flavony, chinony, lignany a další látky [8].

Jedny z nejjednodušších aktivních látek se skládají z jediného substituovaného fenolového kruhu. Mezi tyto látky řadíme kyselinu skořicovou, kofeinovou, která je účinná proti virům, bakteriím a houbám. Další sloučeniny mohou být vícenásobně substituované a hydroxylované. Stupeň hydroxylace souvisí s toxicitou sekundárního metabolitu. Čím více je struktura metabolitu oxidována, tím účinnější je jako inhibiční látka [5].



**Obrázek 1:** Základní struktura fenolických látek [9].

### ***Flavonoidy, flavony***

Flavonoidy jsou fenolické struktury, které se hojně vyskytují ve fotosyntetických buňkách. Obvykle se vyskytují v mnoha jedlých částech rostlin, jako jsou ovoce, zelenina, ořechy a semena. Mnoho flavonoidů má antibakteriální, antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky. Jsou syntetizovány rostlinami jako reakce na mikrobiální infekce, proto jsou považovány za účinné antimikrobiální látky proti široké škále mikroorganismů. Jejich aktivita je pravděpodobně způsobena schopností vytvářet komplexy s extracelulárními buněčnými stěnami i rozpustnými proteiny a s bakteriálními buněčnými stěnami [5], [7].

Jedná se o rostlinné fenoly odvozené od 2H-chromenu substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, neboli flavanu. Tyto fenoly mají v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Některé jsou významná přírodní barviva, zatímco jiné jsou známé pro svoji hořkou a trpkou chuť [8].

Flavony jsou fenolové struktury obsahující jednu karbonylovou skupinu. Hydroxylací flavonu vzniká flavonol [5].

### ***Chinony***

Chinony jsou aromatické kruhy se dvěma substitucemi ketonu. Jsou to velice reaktivní látky, které jsou zodpovědné za typické hnědnutí u krájeného nebo poškozeného ovoce a zeleniny. Dále jsou to také meziprodukty v syntéze melaninu v lidské kůži. Chinonová antimikrobiální aktivita pochází z jejich schopnosti poskytnout volné radikály. Chinony nevratně reagují s nukleofilními aminokyselinami v proteinech, což většinou vede k inaktivaci proteinu a ke ztrátě jeho funkce [5].

Chinony tvoří ireverzibilní komplexy s aminokyselinami v proteinech, a tím je deaktivují. Tyto vlastnosti chinonů jim umožňují reagovat s povrchovými adhezemi, polypeptidy v buněčné stěně a membránovými enzymy [10].

### ***Třísloviny***

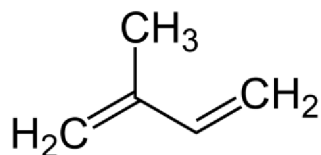
Jedná se o polymerní fenolické látky, které dělíme na hydrolyzovatelné a kondenzované. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou založeny na kyselině galové, obvykle jako vícenásobné estery s D-glukosou. Kondenzované třísloviny jsou odvozeny od flavonoidních monomerů. Třísloviny se mohou tvořit kondenzací derivátu flavanu či polymerací chinonových jednotek [5].

### **2.3.2 Terpeny, terpenoidy**

Obecná struktura terpenů (***Obrázek 2***) je  $C_xH_y$ , často se vyskytují jako monoterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a další. Sloučeniny obsahující další prvky, obvykle kyslík, se nazývají terpenoidy. Terpenoidy jsou syntetizovány z acetátových jednotek, obsahují rozsáhlé větvení a jsou cyklizovány. Terpeny a terpenoidy jsou aktivní proti bakteriím, houbám a virům [5].

K biosyntéze terpenů dochází prostřednictvím dvou různých biologických drah [7]:

- Dráha kyseliny mevalonové produkuje seskviterpeny, steroly a ubichinony.
- Methyl-erythritol fosfátová dráha vytváří většinu syntetizovaných sloučenin jako hemiterpeny, monoterpeny, diterpeny.



*Obrázek 2: Základní struktura terpenů [11].*

### **Linalool**

Jedná se o monoterpenuid složený z okta-1,6-dienů substituovaného methylovými skupinami v poloze 3 a 7 a hydroxy-skupinou v pozici 3, neboli 3,7-dimethylokta-1,6-dien-3-ol. Byl izolován z rostliny *Ocimum canum* (bazalka pravá), setkáme se s ním i v levanduli a meduňce. Působí jako rostlinný metabolit, těkavá olejová složka, antimikrobiální látka a vůně [12].

### **Linalyl acetát**

Linalyl acetát neboli 3,7-dimethylokta-1,6-dien-3-ylacetát je monoterpenuid. Jedná se o acetátový ester linaloolu. Tvoří hlavní složku esenciálních olejů z levandule a bergamotu (*Citrus bergamia*). Linalyl acetát je aromatická složka přirozeně se vyskytující i v mnoha dalších rostlinách [13].

### **Citral**

Citral, neboli geranial, je monoterpenuid, který se skládá z okta-2,6-dienalů substituovaného methylovými skupinami v polohách 3 a 7. Jedná se o 3,7-dimethylokta-2,6-dienal vyskytující se jako čirá žlutá kapalina s citronovým aroma, která má menší hustotu než voda. Je nerozpustný ve vodě. Používá se při výrobě dalších chemikálií. Jako rostlinný metabolit se nachází v meduňce [14].

### **Citronellal**

Citronellal, neboli 3,7-dimethylokt-6-enal, je monoterpenuid. Jedná se o hlavní složku citronelového oleje, která má výraznou citronovou vůni. Nachází se v bylinkách a kořeni. Jako rostlinný metabolit se nachází v rostlině *Eucalyptus citriodora* (Korymbie citroníková) a v meduňce. Využívá se jako účinné antitykotikum [15].

### **Borneol**

Borneol, neboli (1R,4R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, je bíle zbarvená hrudkovitá pevná látka. Má charakteristické ostré aroma podobné kafru. Je mírně hustší než voda, nerozpustný ve vodě a snadno hoří. Používá se k výrobě parfémů. Vyskytuje se v echinacee [16].

### **Bornyl acetát**

Bornyl acetát, neboli 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl acetát, je bezbarvá až nažloutlá kapalina s vůní jehličí. Není rozpustný ve vodě, ale je rozpustný ve většině pevných a minerálních olejů. Jako rostlinný metabolit se také nachází v echinacee. Využívá se při výrobě parfémovaných mýdel nebo osvěžovačů vzduchu [17].

### **Germacrene D**

Germacrene D se používá jako potravinářská přídatná látka ve formě koření, výtažků, barviv a příchutí. Jako rostlinný metabolit ho taktéž najdeme v echinacee [18].

### 2.3.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou velká a strukturálně různorodá skupina sekundárních metabolitů, které mají mikrobiální, rostlinný nebo živočišný původ. Jsou přítomny v různých částech rostlin, ale najdeme i sloučeniny, které se nacházejí pouze v konkrétní části rostliny. Alkaloidy jsou heterocyklické struktury obsahující jeden nebo více atomů dusíku. Jsou klasifikovány na základě své chemické struktury nebo přírodního původu. Jsou známy v tradiční i moderní medicíně, některé jsou užívány jako rekreační nebo zneužívající drogy, jako je kofein, kokain a nikotin. Některé alkaloidy jsou vysoce toxické, což vede k častým otravám [10].

Tyto metabolické sloučeniny se rozlišují do tří skupin [7].

- Pravé alkaloidy – obsahují dusík v heterocyklickém kruhu, jsou bazické (např. nikotin).
- Pseudoalkaloidy – nejsou odvozeny od aminokyselin, jsou bazické (např. kofein).
- Protoalkaloidy – deriváty aminokyselin, ale dusík není v heterocyklickém kruhu, jsou bazické (např. alkaloidy odvozené od fenylethylaminu).

## 2.4 Vybrané přírodní extrakty

### 2.4.1 Levandulový extrakt

Levandulový extrakt se vyrábí z krytosemenné dvouděložné rostliny levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). Tato rostlina se řadí do řádu hluchavkotvaré a čeledi hluchavkovité. Je bohatá na silice, kumariny, flavonoidy, kyselinu rozmarýnovou, třísloviny a terpeny jako linalool a linalyl acetát. Hojně se pěstuje na jihovýchodě Francie v Provence, kde se jí daří. Extrakt z této rostliny můžeme získat buď extrakcí, nebo lisováním za studena. Levandulový extrakt má řadu využití od použití v potravinářství, až ke kosmetice a léčbě různých bolestí či úzkostí. V potravinářství se využívá jako ochucovadlo při výrobě sladkostí a sirupu, její květy se přidávají do džemů a při výrobě levandulového octa. Dále se využívá sušený květ levandule jako součást provensálského koření či při kořenění masa. Levandulový extrakt je účinný proti bolestem hlavy, úzkostem a proti hmyzu, dále při únavě, podrážděnosti a při kožních problémech. V kosmetice se levandulový extrakt využívá při tvorbě vonných esencí (parfémy, toaletní vody a další), popřípadě se využívá proti mastné akné pleti [19], [20].

### 2.4.2 Meduňkový extrakt

Meduňkový extrakt se vyrábí z krytosemenné dvouděložné rostliny meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Tato rostlina se řadí do řádu hluchavkotvaré a čeledi hluchavkovité. V meduňce jsou hojně zastoupeny terpenové silice (citral, citronellal, linalool) a dále třísloviny, hořčiny, kyselina kávová, flavonoidy a další látky. Velmi dobře se jí daří na plném slunci či v polostínu a je často pěstována na polích ve střední Evropě. Meduňka je bylinou, která je využívána v potravinářství, kosmetice i pro potřeby farmaceutického průmyslu. V potravinářském průmyslu slouží meduňkový extrakt jako koření jak na maso, tak do salátů nebo jako dochucovadlo do hořčice a omáček. Z extraktu se dá vyrobit i sirup a různé likéry. Díky typickému citronovému aroma se meduňkový extrakt využívá i v kosmetice a parfumerii. Meduňka působí kladně na lidský organismus, dokáže ho uklidnit, tiší záchvaty kašle a má výborné zklidňující účinky [21], [22].

### 2.4.3 Echinaceový extrakt

Extrakt z echinacey se vyrábí z krytosemenné dvouděložné rostliny třapatky nachové (*Echinacea purpurea*). Tato rostlina se řadí do řádu hvězdicotvaré a čeledi hvězdicovité. V echinacee jsou zastoupeny fenolové sloučeniny odvozené od kyseliny kofeinové, polysacharidy, nenasycené alifatické složky (alkylamidy, echinocein, izobutylamidy) a silice (borneol, bornyl acetát, germacrene D). Echinacea neboli slunečný klobouk, byla tradiční léčivou rostlinou severoamerických Indiánů. Tato rostlina pochází z plání Severní Ameriky a dnes je již hojně rozšířená na východě Afriky a v Evropě. Indiáni žvýkali kořen této rostliny, protože v něm je obsaženo nejvíce aktivních látek, které pomáhají zvyšovat imunitu, podporují činnost bílých krvinek a účinkují proti zánětům dýchacích či močových cest nebo proti žaludečním potížím. Echinacea se dá využít nejen vnitřně, ale i vně, a to jako účinný pomocník při boji s ekzémy, lupénkou či akné. Tato bylina se nejčastěji využívá ve formě tinktury, můžeme se s ní setkat v podobě příměsí různých čajů a sirupů [23], [24].

## 2.5 Extrakční metody vhodné pro získávání extraktů z rostlinných materiálů

Extrakce je definována jako separace jedné nebo několika složek obsažených v pevné matici solubilizací v tekutině. Extrakce rostlin je proces, jehož cílem je extrahovat určité složky přítomné v rostlinách. Rostlina je uvedena do kontaktu s rozpouštědlem. Požadované rostlinné složky jsou poté obsaženy v rozpouštědle, které se poté odstraní, aby se izoloval rostlinný extrakt [25].

Při extrakci hraje důležitou roli rozpouštědlo. Při výběru rozpouštědla by mělo být zvaženo několik parametrů, jako jsou selektivita, rozpustnost, náklady a bezpečnost. Rozpouštědla s blízkou hodnotou polaritativy solutu budou pro extrakci vhodnější. Naopak rozpouštědla s vzdálenější hodnotou polaritativy solutu budou méně vhodná. Alkoholy jsou univerzální rozpouštědla při extrakci pro fytochemické zkoumání [26].

Obecný postup extrakce může být upraven pěti různými způsoby, jako jsou macerace, odvar nebo reflux, trávení, infuze a vyluhování nebo perkolace. Macerace probíhá při pokojové teplotě, kdy se části rostlin přelívají studenou vodou a nechají se macerovat. Při odvaru nebo refluxu se části rostlin extrahují do rozpouštědla, které je postupně zahřáté na bod varu. Při trávení jsou části rostlin extrahovány do rozpouštědla o teplotě vyšší než pokojové, ale nižší než je teplota bodu varu. Při infuzi se části rostlin přelívají vroucím rozpouštědlem, které se poté ochladí [25].

Extrakce dle Soxhleta spojuje výhody refluxní extrakce a perkolace. Využívá principu refluxu a sifonu pro kontinuální extrakci byliny čerstvým rozpouštědlem. Je to metoda s vysokou účinností extrakce, která vyžaduje menší množství rozpouštědla a kratší dobu extrakce [26].

Další metody pro získání extraktů z rostlin jsou tlaková kapalinová extrakce, extrakce superkritickou tekutinou, ultrazvuková extrakce, mikrovlnná extrakce, extrakce pulzním elektrickým polem, extrakce pomocí enzymu, hydrodestilace a destilace parou [26].

Extrakční metody se dají kombinovat s dalšími procesy jako destilace, rektifikace. Dále se často využívá použití různých rozpouštědel buď postupně, nebo v kombinaci. Na kvalitu rostlinného extraktu má vliv několik faktorů, jako je například volba vhodného rozpouštědla, zařízení nebo samotné rostliny. Rostlina je ovlivněna klimatickými podmínkami, pěstitelskými postupy nebo místem původu. Je třeba pamatovat, že stejný postup extrakce nevede vždy ke stejnému produktu [25].

## **2.6 Využití přírodních extraktů v potravinářství**

Mnoho potravinářských produktů rychle podléhá zkažení, a vyžaduje tak ochranu před znehodnocením během jejich přípravy, skladování, distribuce a následné konzumace. Potravinářské výrobky mohou být kontaminovány bakteriemi a houbami, které mohou způsobit nežádoucí reakce zhoršující chuť, vůni, barvu a texturní vlastnosti potravin, a v neposlední řadě mohou způsobit různá onemocnění. Aby se zabránilo těmto nežádoucím reakcím, byla v potravinářském průmyslu zavedena řada konzervačních technik, jako je tepelné zpracování, solení, okyselení nebo sušení. V posledních letech se díky obavám spotřebitelů kvůli přítomnosti syntetických chemických přísad v potravinách staly populárními potraviny konzervované přírodními přísadami. Pro inhibici růstu nežádoucích mikroorganismů v potravinech mohou být antimikrobiální látky přidávány přímo do formulace produktu, nebo mohou být začleněny do obalového materiálu, dále mohou být potraviny potaženy antimikrobiální látkou na povrchu. Hlavními přírodními sloučeninami s žádoucími účinky jsou rostlinné éterické oleje, enzymy získané ze živočišných zdrojů (lysozym, laktoferrin), bakteriociny z mikrobiálních zdrojů (nisin, natamycin), organické kyseliny (kyselina sorbová, propionová, citronová) a přirozeně se vyskytující polymery (chitosan). Antimikrobiální aktivita rostlinných éterických olejů je způsobena jejich chemickou strukturou, zejména přítomností hydrofilních funkčních skupin, konkrétně hydroxylové skupiny fenolických sloučenin [27].

Použití antimikrobiálních látek v potravinářském průmyslu je novou technologií pro zvýšení trvanlivosti, kvality a bezpečnosti potravin. Antimikrobiální látky mohou být přírodní a syntetické. Přestože syntetické konzervační látky jsou schváleny vládními agenturami, jejich použití je spotřebiteli často odmítáno. Proto přírodní antimikrobiální látky získávají čím dál větší oblibu pro konzervaci potravin [28].

Většina potravin vyžaduje během skladování ochranu proti mikrobiální kontaminaci. Jelikož roste zájem o co nejméně zpracované produkty, výzkumní pracovníci hledají mírnější konzervační techniky, aby nedocházelo k nutričnímu a sensorickému znehodnocení a zároveň byl produkt bezpečný. Správnou kombinací přírodních antimikrobiálních látek je možné docílit inhibice mikroorganismů a prodloužení trvanlivosti potraviny bez ovlivnění jejich sensorických a nutričních hodnot [27].

Minimálně zpracované produkty, jako jsou ovoce a zelenina, se konzervují ponořením, impregnací, potažením a postříkáním aktivními látkami [27].

Čerstvé mléčné výrobky jsou snadno kontaminovatelné nežádoucími mikroorganismy. Dochází k vytvoření nežádoucího vzhledu, chuti a ohrožení bezpečnosti produktu. Přírodní látky samotné nebo v kombinaci s jinými konzervačními metodami se aplikují do mléka nebo na sýr rozprašováním, ponořením nebo poprášením produktu. Antimikrobiální látky

mohou být naneseny na obalové materiály, které přicházejí do styku se sýrem nebo jako součást balících folií [27].

U masných výrobků použití přírodních antimikrobiálních látek podporuje lepší trvanlivost [27].

Čerstvé ryby se díky svému biologickému složení velmi rychle kazí. Hlavní příčinou je aktivita patogenních mikroorganismů, které vyvolávají ztrátu esenciálních mastných kyselin, vitamínů rozpustných v tucích a snižují funkčnost bílkovin. Ošetření čerstvých ryb přírodními antimikrobiálními látkami je dostatečně účinné jako konzervační metoda pro tento typ potravin [27].

Esenciální oleje vykazující antimikrobiální aktivitu jsou slibnými konzervačními látkami. Jejich chemická struktura má velký vliv na inhibici mikroorganismů. Přítomnost hydrofilních funkčních skupin, jako jsou hydroxylové skupiny, zvyšuje jejich účinnost. Esenciální oleje z hřebíčku, oregana, rozmarýnu, tymiánu, šalvěje obsahující fenolové skupiny jsou v tomto směru považovány za neúčinnější oleje. Vykazují vyšší antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním bakteriím. Určité esenciální oleje jsou účinné antimikrobiální látky, které jsou schopny prodloužit kvalitu a trvanlivost potravinářských výrobků, ale mohou vykazovat vedlejší účinky. Při vyšších koncentracích mohou způsobit podráždění sliznice, alergii nebo fototoxické reakce [28].

## **2.7 Využití přírodních extraktů v kosmetických produktech**

### **2.7.1 Kosmetické přípravky**

Kosmetickým přípravkem se rozumí jakákoliv látka nebo směs určená ke kontaktu s vnějšími částmi lidského těla (epidermis, vlasový systém, nehty, rty a další) nebo se zuby a dutinou ústní. Kosmetické produkty se využívají s cílem čištění, k ochranně a zlepšení vzhledu pokožky, dále k parfemaci a korekci tělesných pachů [29].

Mezi kosmetické přípravky řadíme různé mycí produkty (mýdla, sprchové gely, pěny, oleje, pleťové vody na obličej, pasty, atd.), krémy (na tělo, na obličej), zkrášlující produkty (řasenky, pudr, oční stíny a linky, produkty na rty, atd.) a mnohé další. Na každém z těchto přípravků musí být viditelně vyznačené datum expirace daného produktu, číslo šarže, seznam přísad, popis a funkce produktu. Datum expirace musí být čitelné a kosmetický přípravek bez této informace není možné prodat. Toto datum určuje dobu, po kterou je možné daný produkt bezpečně používat. Číslo šarže slouží především pro kontrolu dané výrobní várky. V seznamu přísad musí být na prvním místě látka, která je v produktu obsažena v největším množství. Další látky jsou seřazeny podle klesajícího množství. Tomuto seznamu látek musí předcházet slovo „Ingredients“ [30].

### **2.7.2 Mikrobiální rizikovost kosmetických přípravků**

Kosmetický produkt obsahuje velké množství vody, organických a anorganických sloučenin. Použitím těchto látek se zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace. Aby nedocházelo ke kontaminaci, jsou kosmetické přípravky konzervovány. Nejběžněji je využívána konzervace za použití antimikrobiálních látek. Tato chemická činidla mají různé mechanismy

antimikrobiálního působení v závislosti na jejich chemické struktuře a reaktivitě funkční skupiny [29].

Ideální konzervační systém by měl produkt chránit před mikrobiální kontaminací, a to jak v původním uzavřeném balení až do použití, tak i v otevřeném obalu po celou dobu jeho používání. Kůže a sliznice jsou chráněny proti mikroorganismům epidermálním hydrolipidovým filmem, avšak jejich přítomnost v těchto přípravcích může zvýšit riziko výskytu mikrobiální infekce. K mikrobiální kontaminaci může dojít během výroby, kdy se jedná o primární kontaminaci. Na začátku je důležitá i kvalitní kontrola vstupních surovin. K sekundární kontaminaci dochází v důsledku používání produktu spotřebitelem [29].

Mezi nejčastěji vyskytující se mikroorganismy v kosmetických produktech patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cloacae*, *Achromabacter xylosoxidans*, *Rhizobium radiobacteria*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecium* a *Klebsiella pneumoniae* [31], [32].

Konzervační látky se v kosmetice používají v nízkých koncentracích, aby se minimalizovalo riziko toxicity pro spotřebitele. Při těchto nízkých koncentracích může docházet k rezistenci u mikroorganismů a inaktivaci konzervačního činidla. Obecně jsou nejodolnější bakteriální endospory, oproti tomu citlivé na konzervační látky jsou grampozitivní bakterie. Protože existuje vzájemný vztah mezi použitím konzervačních látek a vývojem rezistence, jsou nezbytné alternativní formy konzervace, které jsou založené na nově vznikajících přírodních produktech [29].

Mikrobiální kontaminace kosmetického produktu způsobuje nežádoucí změny aromatu, barvy, viskozity a účinků produktu. Tyto změny jsou způsobeny produkcí mikrobiálních metabolitů a mikrobiologickým rozkladem účinných složek produktu. Využívání konzervačních systémů pro kosmetické produkty snížilo riziko mikrobiální kontaminace. Kosmetické produkty prochází bezpečnostními kontrolami a v případě mikrobiální kontaminace dochází k viditelným změnám až po několika měsících po uplynutí doby expirace [32].

### **2.7.3 Konzervační látky používané v kosmetice**

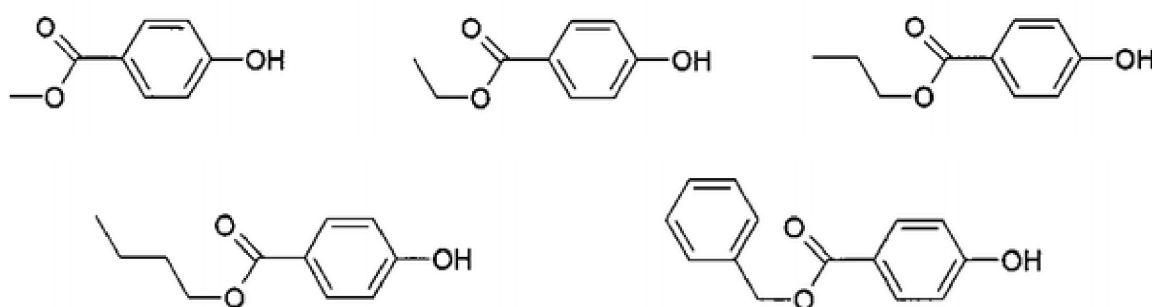
Kosmetické přípravky jsou tvořeny látkami, které jsou snadno biologicky rozložitelné. Přítomnost mnoha mikroorganismů v daném přípravku způsobí, že produkt se stane nepříjemným a nebezpečným pro lidský organismus, mohou po jeho použití vznikat ekzémy, začervenání místa, podráždění. Konzervační látky jsou antimikrobiální přísady, které jsou přidávány do kosmetických přípravků. Tyto látky inhibují růst mikrobiálních kontaminantů a snižují jejich přítomnost v daném produktu. Mezi konzervační látky využívané v kosmetice řadíme parabeny, látky uvolňující formaldehyd, fenoxylethanol, isothiazolinon a organické kyseliny [33].



### Parabeny

Mezi parabeny patří methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben a benzylparaben (**Obrázek 3**). Tyto látky jsou nejčastěji používané konzervační látky v kosmetice, jsou účinné proti plísním a některým gram pozitivním bakteriím. Tyto konzervační látky jsou povoleny jak pro *rinse-off* produkty (produkty, které se oplachují), tak i pro *leave-on* produkty (produkty, které se nechávají na pokožce a neoplachují se) [33].

Parabeny mohou být v kosmetických přípravcích bezpečně použity až do výše 25 %. Dávka parabenů typicky používaná v kosmetických přípravcích se pohybuje v rozmezí 0,01-0,30 %. Parabeny jsou nejméně alergenními konzervačními prostředky na trhu, i přesto jsou spotřebiteli často odmítány a tak kosmetický průmysl hledá další alternativy. Bohužel tyto alternativy často způsobují alergické reakce [34].

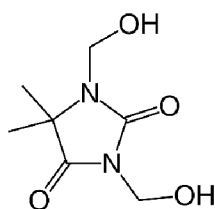


**Obrázek 3:** Struktura methylparabenu (vlevo nahoře), ethylparabenu (uprostřed nahoře), propylparabenu (vpravo nahoře), butylparabenu (vlevo dole) a benzylparabenu (vpravo dole) [35].

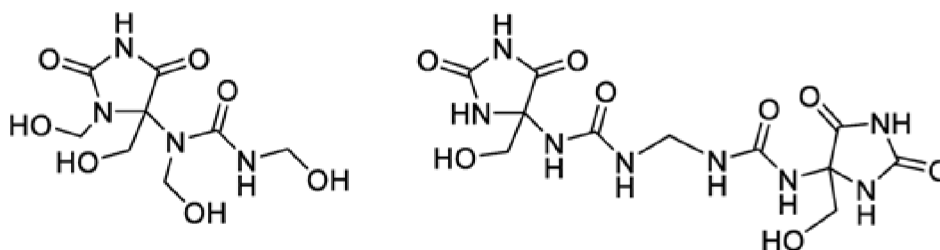
### Látky uvolňující formaldehyd

Mezi látky uvolňující formaldehyd patří DMDM Hydantoin (**Obrázek 4**), diazolidinyl močovina a imidazolidinyl močovina (**Obrázek 5**). Tyto konzervační látky jsou velmi účinné proti bakteriím, ale skoro neúčinné proti plísním. Postupně se uvolňující formaldehyd, zajišťuje mikrobiální inhibici i v nízkých koncentracích [33].

Látky uvolňující formaldehyd jsou po parabenech nejběžněji používané konzervační látky. Často se používají jako náhrada parabenů [34].



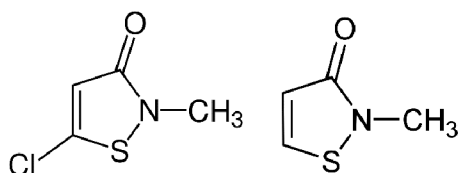
**Obrázek 4:** DMDM Hydantoin [36].



**Obrázek 5:** Diazolidinyl močovina (vlevo) a imidazolidinyl močovina (vpravo) [37].

### **Isothiazolinony**

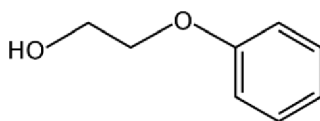
Mezi isothiazolinony patří směs látek methylchloroisothiazolinu a methylisothiazolinonu, komerčně nazývaná kathon (**Obrázek 6**), která zajišťuje kosmetickým přípravkům širokou ochranu proti mikroorganismům v celém rozsahu pH využívaného v kosmetice. Tato konzervační látka je vhodná pro produkty typu *rinse-off*. Tyto látky mohou u spotřebitelů s citlivou pokožkou způsobit podráždění kůže [33].



**Obrázek 6:** Methylchloroisothiazolin (vlevo) a methylisothiazolinon (vpravo) tvoří směs komerčně nazývanou kathon [38], [39].

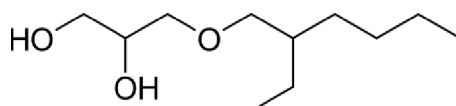
### **Fenoxyethanol**

Mezi konzervační látky na bázi fenoxyethanolu (**Obrázek 7**) patří optiphen, který je považován za šetrnější konzervační látku. Tato konzervační látka je směsí fenoxyethanolu s kaprylyl glykolem nebo kyselinou sorbovou či sorbanem draselným nebo EDTA, aby se pokrylo širší spektrum mikrobiální inhibice. Tyto látky jsou účinné proti bakteriím, nejlépe proti gramnegativním bakteriím a účinnost těchto látek není ovlivněna hodnotou pH. Koncentrace fenoxyethanolu je povolena až do 1% [33].



**Obrázek 7:** Fenoxyethanol [40].

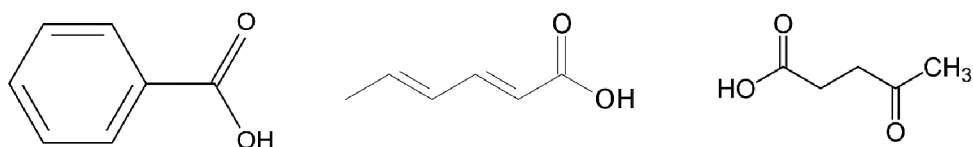
Látky na bázi fenoxyethanolu se často kombinují s ethylhexylglycerinem (**Obrázek 8**). Jedná se o konzervační a velmi účinnou deodorační směs aktivních látek. Spolehlivě inhibuje růst a množení bakterií způsobujících zápach. Dále může zvýšit účinnost tradičních konzervačních látek. Tato směs látek působí jako zvlhčující činidlo a neovlivňuje přirozenou flóru pokožky [41].



**Obrázek 8:** Ethylhexylglycerin [42].

### **Organické kyseliny a jejich soli**

Mezi organické kyseliny patří kyselina benzoová (benzoan sodný), kyselina sorbová (sorban sodný, sorban draselný) a kyselina levulová (**Obrázek 9**). Tyto konzervační látky jsou účinné při inhibici plísní a v kombinaci s jinými organickými kyselinami nebo s diazolidinyl močovinou je možné rozšířit spektrum mikrobiální inhibice. Vyžadují vodnou bázi a pH v oblasti 2-6. I přestože jsou často vyráběny synteticky, jsou považovány za „přírodní alternativy“ [31].



**Obrázek 9:** Kyselina benzoová (vlevo), kyselina sorbová (uprostřed) a kyselina levulová (vpravo) [43], [44], [45].

Konzervační látky v kosmetických produktech účinně inhibují mikroorganismy na určitou dobu, avšak při použití vysoké koncentrace mohou způsobit různá podráždění, ekzémy, alergie a další [33].

#### **2.7.4 Přírodní kosmetika**

Přírodní kosmetika obsahuje pouze látky vyskytující se v přírodě, jako jsou rostliny a minerály z obnovitelných přírodních zdrojů. Jedná se o látky, které nejsou vyrobeny synteticky, ale jsou získávány pouze z přírodních materiálů. Přírodní kosmetika by neměla obsahovat umělá barviva, synteticky vyrobené látky a další průmyslově zpracované suroviny jako ropné přísady [46].

Jelikož termín „přírodní kosmetika“ není v legislativě definován, nelze jednoznačně určit co je a co není přírodní kosmetický produkt. Přírodní kosmetické produkty neznamenají zdravější a bezpečnější pro lidskou pokožku, spíš naopak, často se jedná o hyperalergenní produkty [47].

Převážná většina kosmetiky není přírodní z toho důvodu, že příroda není schopna vyrobit látky řešící problémy, které má kosmetika řešit. Existuje pouze několik přírodních povrchově aktivních čisticích látek. Problém není pouze u povrchově aktivních látek, ale dále neexistuje příliš mnoho přírodních emulgátorů, přírodních zahušťovadel nebo konzervačních látek [48].

#### **Konzervace přírodní kosmetiky**

Výrobky bez vody, které nepřijdou do kontaktu s vodou, nemusí obsahovat konzervační látky, pokud se dodrží čistota prostředí a pracovníků při výrobě. Jedná se například o směsi olejů, ve kterých je velmi nízká pravděpodobnost, že by v nich bakterie mohly přežít bez vody. Ale i oleje potřebují určitou ochranu, aby nedošlo ke ztrátě účinných vlastností. Do olejů se často přidává antioxidant, který zabraňuje negativním změnám v produktu. Nejčastěji využívaný antioxidant je vitamin E. Vitamin E pomáhá chránit produkt z hlediska stability, ale není schopen inhibovat bakterie [49].

Další produkty, které nevyžadují konzervační látky, jsou výrobky s hodnotami pH pod 4 nebo nad 8 nebo produkty s vysokým obsahem alkoholu [49].

Esenciální oleje mají antimikrobiální vlastnosti a mohou tak inhibovat daný mikroorganismus. Bohužel neexistuje esenciální olej, který by byl schopný dokonale inhibovat větší skupinu mikroorganismů. Proto je lepší použít kombinaci několika esenciálních olejů pro rozšíření oblasti inhibovaných mikroorganismů. Nevýhodou esenciálních olejů je používání vysokých koncentrací, aby byly považovány za účinné konzervační látky, což vede k častým kožním alergickým reakcím [49].

**Tabulka 1:** Esenciální oleje a jimi inhibované mikroorganismy.

<b>Rostlinný extrakt</b>	<b>Aktivní látky</b>	<b>Inhibované MO</b>	<b>Zdroj</b>
Levandule lékařská ( <i>Lavandula angustifolia</i> )	Linalool Linalyl acetát	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	[50] [51] [52]
Meduňka lékařská ( <i>Melissa officinalis</i> )	Citral Citronellal Linalool	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonela enterica</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Fusarium oxysporum albedinis</i> <i>Fusarium oxysporum lini</i> <i>Mucor ramannianus</i> <i>Aspergillus niger</i>	[53] [54]
Třapatka nachová ( <i>Echinacea purpurea</i> )	Borneol Bornyl acetát Germacrene D	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Hemophilus influenzae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Trypanosoma brucei</i>	[55] [56]

**Tabulka 1 - pokračování: Esenciální oleje a jimi inhibované mikroorganismy.**

<b>Rostlinný extrakt</b>	<b>Aktivní látky</b>	<b>Inhibované MO</b>	<b>Zdroj</b>
Zázvor lékařský ( <i>Zingiber officinales</i> )	Zingiberen Bisabolen Kurkumen Zingiberol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[57] [58]
Kadidlovník pravý ( <i>Boswellia sacra</i> )	$\beta$ -pinen $\alpha$ -terpinen	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[59]
Myrta ( <i>Myrtus communis</i> )	$\beta$ -pinen Eukalyptol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[59]
Tymián obecný ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Linallol Geranyl propionát	<i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[59]
Citrus limonový ( <i>Citrus limon</i> )	$\alpha$ -pinen $\beta$ -pinen Limonen Geraniol $\gamma$ -terpinen Neral	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Candida sp.</i> <i>Aspergillus niger</i>	[50] [59]
Tea tree ( <i>Melaleuca alternifolia</i> )	$\alpha$ -terpinen $\gamma$ -terpinen p-cymen Eukalyptol $\alpha$ -terpineol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	[50] [52]
Skořice ( <i>Cinnamomum ceylanicum</i> )	Cinnamaldehyd Eugenol Linalool $\beta$ -karyofylen	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	[52] [60]
Heřmáněk pravý ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Chamazulen Bisabolol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	[52] [61]

Přírodní konzervační látky pro kosmetické produkty [49]:

- Benzylalkohol je vyráběn rostlinami, má příjemnou vůni a nachází se v některých esenciálních olejích. Účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, houbám i kvasinkám.
- Kyselina dehydrooctová má účinek závislý na pH, nejlépe funguje při pH nižším než 6.
- Kyselina sorbová získána z rostliny jeřábu ptačího.
- Sorban draselný, přirozeně se vyskytující v mnoha rostlinách, účinkuje nejlépe při pH pod 6. Využívá se v široké škále produktů.
- Kyselina benzoová přirozeně se vyskytující v mnoha rostlinách.
- Glyceryl Caprylate pracuje v širokém rozmezí pH 4 až 8.
- Spectrastat-Inolex je směs kyseliny kaprylhydroxamové, kaprylyl glykolu a glycerolu, která nejlépe působí při neutrálním pH. Může interagovat se zbytkovým železem za vzniku oranžového zbarvení produktu.
- Geogard ECT je směs benzylalkoholu, kyseliny salicylové, glukonové a sorbové. Jedná se o širokospektrální konzervační látku.
- Geogard Ultra je ve vodě rozpustná širokospektrální látka. Je stabilní v širokém rozmezí pH 3 až 7.
- Konzervační systém glyceryl kaprylát a glyceryl undecylenát je všestranný a účinný. Může být začleněn do olejové nebo vodní fáze. Účinný při pH 5,5 a nižším.
- Naticid má široké spektrum účinnosti, je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním v rozsahu pH 4 až 9.
- Ethyl lauroyl arginát je potravinářské povrchově aktivní činidlo s antimikrobiálními vlastnostmi. Je výborným přírodním konzervačním prostředkem pro vlasové přípravky, protože inhibuje *Malassezia furfur*, která je zodpovědná za lupy. Dále inhibuje *Propionibacterium acnes*, které způsobuje akné. Nejedná se o dráždivý přípravek.
- Biosecur je 100% přírodní konzervační látka vyrobená z extraktu citrusů.

### 2.7.5 Využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů

Kosmetické přípravky s antimikrobiálními účinky jsou přípravky, které poskytují spotřebiteli ochranu antimikrobiálními sloučeninami. Kosmetické produkty, jako jsou ústní vody, dezinfekční produkty na kůži nebo antibakteriální mýdla, prokázaly tyto účinky [29].

V současné době v Evropě je hranice mezi léčivými produkty a kosmetickými produkty s antimikrobiálními účinky jasně stanovená Nařízením Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009. Ale i přesto je často jediný rozdíl mezi těmito produkty pouze v koncentraci aktivní složky v produktu [29], [32].

Kůže chrání tělo před vnějším prostředím je největší orgán našeho těla. Pomáhá regulovat teplotu a rovnováhu tekutin, vytváří ochranou bariéru proti škodlivým mikrobům, chemikáliím a poskytuje určitou ochranu před slunečním zářením. Nejsvrchnější vrstvou kůže je *stratum corneum*, jedná se o selektivně propustnou, heterogenní vrstvu pokožky. Tato vrstva pokožky

chrání před vysycháním dalších vrstev kůže, a zadržuje tak dostatek vody, aby mohla fungovat [62].

Termín „přírodní“ je definován jako surovina, která je produkována přírodou nebo se nachází v přírodě a je přímo extrahována z rostlin nebo živočišných produktů. Zdroje přírodních surovin mohou zahrnovat byliny, ovoce, květiny, listy, minerály, vodu a další suroviny. Přírodní suroviny pro léčebné i kosmetické účely byly využívány už před mnoha lety, dokud se nezačaly objevovat syntetické látky s podobnými vlastnostmi. V dnešní době se začíná opět přiklánět k přírodním látkám, i přestože přírodní produkty jsou komplexní směsí mnoha chemických sloučenin, které mohou dráždit víc než syntetické látky. Bioaktivní výtažky obsahují velké množství vitamínů, antioxidantů, éterických olejů, proteinů a dalších, které mohou být přínosné pro zajištění živin pro zdravou pokožku. Další důvod přiklání se k přírodním látkám je čím dál vyšší mikrobiální rezistence proti konvenčním antimikrobiálním látkám. Ochranné metabolismy rostlin v podobě fenolických sloučenin, které reagují s buněčnou membránou nebo buněčnou stěnou mikroorganismů vedou ke změně propustnosti membrány. Změna propustnosti membrány následně může vést až k destrukci buňky. Fenolické sloučeniny by mohly jako přírodní antimikrobiální látky inhibovat růst patogenních mikroorganismů, a tím zlepšit skladovatelnost různých produktů [62].

## **2.8 Metody vhodné pro stanovení antimikrobiální aktivity**

### **2.8.1 Disková difúzní metoda**

Testování antimikrobiální aktivity pomocí diskové difúzní metody na agaru bylo poprvé použito v roce 1940. V současné době se jedná o oficiální metodu, která je používána v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální aktivity [63].

Při tomto testování antimikrobiální aktivity se agarové plotny naočkují připravenou suspenzí se zvoleným mikroorganismem. Poté se na agarovou plotnu nanese sterilní disk z filtračního papíru (o průměru 6 mm), které obsahují testovanou látku o určité koncentraci (nejčastěji rostlinný výtažek, éterický olej, drogy a další). Počet disků je různý, nejčastěji však 4 nebo 6 disků na jednu Petriho misku, z toho vždy jeden disk jako tzv. kontrolní. Petriho misky s naočkovanými agarovými plotnami se inkubují za vhodných podmínek. Během inkubace antimikrobiální látka difunduje do agaru a postupně inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Během inkubace se zaznamenává průměr inhibičních růstových zón. Jelikož inhibice bakteriálního růstu neznámá bakteriální smrt, tato metoda nemůže rozlišit baktericidní a bakteriostatické účinky. Dále tato metoda není vhodná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace, jelikož nelze určit přesné množství antimikrobiálního činidla rozptýleného do agarového média. Tato metoda je velice jednoduchá s nízkými náklady. Dále pomocí této metody lze určit antimikrobiální aktivitu pro obrovský počet antimikrobiálních látek v kombinaci s různými mikroorganismy [63].

Disková difúzní metoda je založena na stanovení inhibiční zóny, která je úměrná citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látku přítomnou na disku. Průměr inhibiční zóny kolem antimikrobiálního disku souvisí s minimální inhibiční koncentrací pro konkrétní bakterii a zvolenou koncentrací antimikrobiální látky. Obecně platí, že čím větší je inhibiční zóna,

tím nižší je požadovaná koncentrace antimikrobiálních látek pro inhibici růstu mikroorganismů [64].

### **2.8.2 Jamková difúzní metoda**

Pro hodnocení antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů se často používá jamková difúzní metoda. Tato metoda je velmi podobná diskové difúzní metodě. Na celý povrch připravené agarové plotny se nanese suspenze s testovaným mikroorganismem. Do agarové plotny se pomocí sterilního korkového vrtáku vytvoří jamky. Nejčastěji 4 nebo 6 jamek na jednu Petriho misku. Do vytvořených jamek se napipetuje zvolený objem rostlinného extraktu nebo antimikrobiální látky v požadované koncentraci. Agarové plotny jsou inkubovány za vhodných podmínek v závislosti na testovacím mikroorganismu. Během inkubace antimikrobiální látka difunduje v agarovém médiu a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene [63].

### **2.8.3 Antimikrobiální gradientní metoda (E-test)**

Pro stanovení antimikrobiální rezistence se využívá metody exponenciálního gradientu. Jedná se o kvantitativní metodu, která kombinuje princip diluční metody a difúzní metody pro stanovení minimální inhibiční koncentrace. E-test byl vyvinut k zajištění přímé kvantifikace antimikrobiální citlivosti mikroorganismů [65]. [65]

Tento test je založen na možnosti vytvoření koncentračního gradientu antimikrobiálního činidla testovaného na agarovém médiu. Jedná se o plastový proužek, který na jedné straně obsahuje zvyšující se koncentrační gradient antimikrobiálního činidla. Tato strana proužku je poté položena na agarové médium inokulované testovaným mikroorganismem. Na druhé straně je kontinuální stupnice ředění. Minimální inhibiční koncentrace je stanovena na průsečíku proužku a inhibiční zóny. E-test se využívá pro stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik, antimykotik. Tato metoda je snadná, ale poměrně nákladná [63].

### **2.8.4 Tenkovrstvá chromatografie – bioautografie**

Tato technika kombinuje tenkovrstvou chromatografii s biologickými i chemickými detekčními metodami. Tato metoda je vhodná pro organické a rostlinné extrakty a jejich antibakteriální a antimykotické účinky. Pro stanovení antimikrobiálních sloučenin existují tři techniky [63].

- Difúze na agaru – nepřímá bioautografie
- Přímá bioautografie
- Biologický test na agaru (*Agar overlay bioassay*)

### **2.8.5 Diluční metody**

Diluční metody jsou nejvhodnější pro stanovení minimální inhibiční koncentrace, protože nabízejí možnost odhadnout koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla, pomocí zředění agaru nebo živného média (makrodiluce nebo mikrodiluce). Zaznamenaná hodnota MIC je definována jako nejnižší koncentrace testovaného antimikrobiálního činidla, které inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu [63].

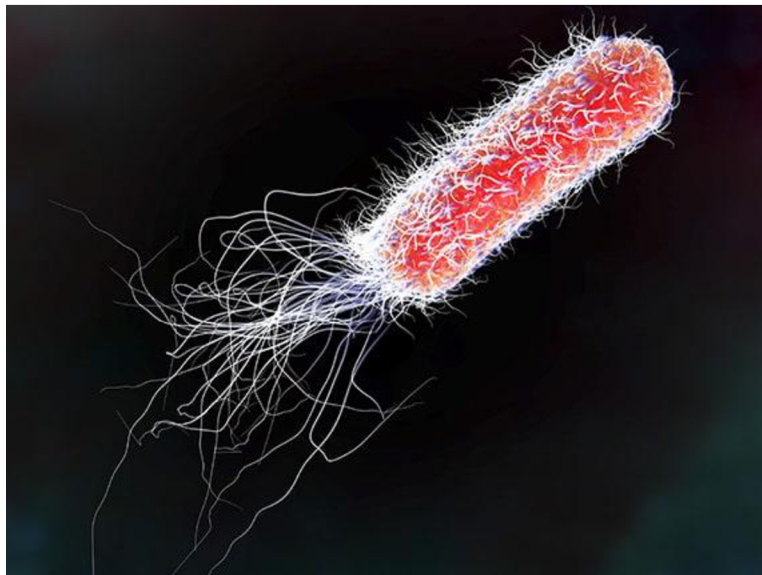
- Bujónová diluční metoda
- Agarová diluční metoda



## 2.9 Charakteristika použitých mikroorganismů

### 2.9.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (**Obrázek 10**) řadíme do čeledi *Enterobacteriaceae*, která patří do domény *Bacteria*. Je to mezofilní bakterie, jejíž optimální teplota je kolem 37°C. Její buněčná stěna se nebarví podle Grama, je označována jako gramnegativní. Má tyčinkovitý tvar, pohybuje se pomocí bičíku a na jejím povrchu se nachází mnoho fimbrií. Upřednostňuje prostředí bez přítomnosti kyslíku, ale přesto jí nevadí ani přítomnost kyslíku, je to tedy fakultativně anaerobní bakterie. *Escherichia coli* je modelovým mikroorganismem, na kterém jsou pozorovány nejrůznější biochemické, genetické i fyziologické studie. Je přirozeně přítomná v lidském trávicím traktu, díky tomu se může vyskytovat jako kontaminant v potravinách, které přichází do kontaktu s hnojenou půdou. V potravinách zkvašuje laktosu ale i další cukry (glukosu, některé pentosy a alkoholické cukry) na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>, popř. kyselinu pyrohroznovou a kyselinu mravenčí (část je rozkládána na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>). Přítomnost tohoto mikroorganismu v potravinách slouží k hodnocení hygienických parametrů. U člověka mohou některé kmeny způsobovat střevní onemocnění [66], [67].



**Obrázek 10:** *Escherichia coli* [68].

### 2.9.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (**Obrázek 11**) řadíme do čeledi *Bacillaceae*, která patří do domény *Bacteria*. Jedná se o fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie ve tvaru tyčinek, které mohou rozkládat různé organické sloučeniny. Mají specifické požadavky na teplotu kolem 37°C, jsou označovány jako tzv. mezofilní bakterie. Patří do skupiny sporotvorných bakterií, to jsou bakterie, které tvoří spory. Spory jsou klidová stádia buněk, která slouží k přežití i v nepříznivých podmínkách. *Bacillus cereus* je bakterie běžně se vyskytující v půdě a vegetaci, může být přítomna i v potravinách. Přítomností tohoto mikroorganismu v potravinách obsahujících škrob dochází k produkci toxinů, které mohou vést k průjemovým onemocněním či nevolnosti. Rozlišujeme dva druhy toxinů, které je schopna tato bakterie vyprodukovat. Jedná se o enterotoxin a emetický toxin. Enterotoxin je složen z vazebné složky a dvou hemolytických složek označených HBL a ve většině případů způsobuje průjemové

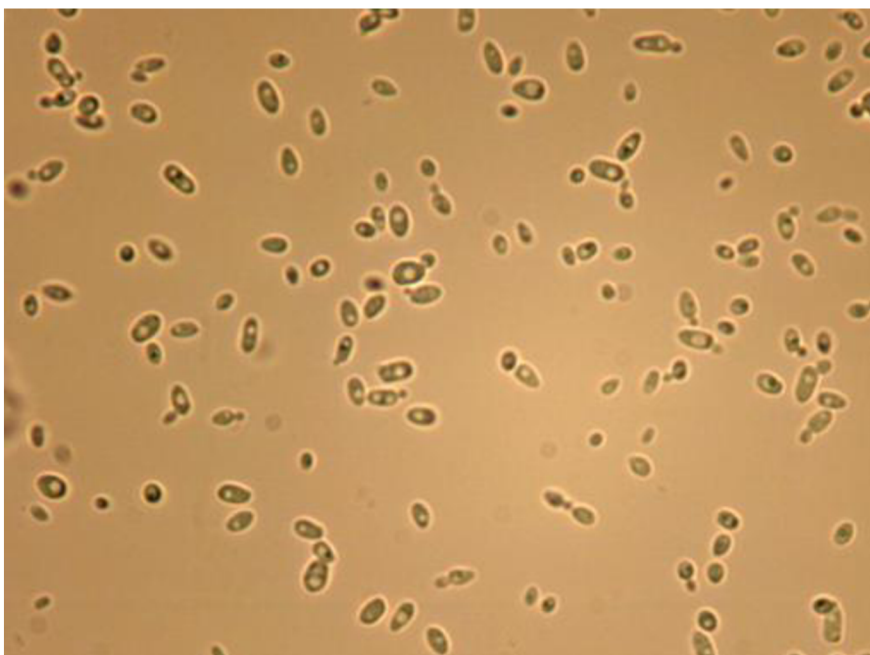
onemocnění. Emetický toxin je syntetizován v kontaminovaném potravinářském produktu (nejčastěji se jedná o rýži, těstoviny, mléčné výrobky), kde mikroorganismus roste. Po konzumaci kontaminovaného produktu způsobuje nevolnost a vyvolává syndrom zvracení [67], [69].



**Obrázek 11:** *Bacillus cereus* [70].

### 2.9.3 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* (**Obrázek 12**) řadíme do čeledi *Saccharomycetaceae*, která patří do říše *Fungi*. Dříve byl tento mikroorganismus zařazen do rodu *Torulopsis*, kvůli nedostatečné produkci pseudohyf. Později pak bylo stanoveno, že schopnost produkovat pseudohyfy není spolehlivým rozlišovacím faktorem a *Torulopsis glabrata* byla zařazena do rodu *Candida*. Jedná se o kvasinku, která existuje jako malá blastokonidie. To je spora, která vzniká pučením a vytváří hladké, krémové kolonie. Je patogenem za všech podmínek, mezi biochemické reakce charakteristické pro *Candida glabrata* patří fermentace a asimilace pouze glukosy a trehalosy. Druhy *Candida* jsou všudypřítomné v organismu, nejčastěji je přítomný druh *C. albicans* a hned potom *C. glabrata* a *C. tropicalis*. Nejčastěji se vyskytují v dutině ústní, v pohlavních orgánech a krevním řečišti. *C. glabrata* má zvýšenou odolnost proti antimykotikům a patří mezi tzv. nozokomiální mikroorganismy. Způsobuje vnitřní či vnější onemocnění spojená s hospitalizací v nemocnici. *C. glabrata* nebyla zatím pozorována v potravinách, vyjma potravin, u kterých probíhá proces fermentace [71].



*Obrázek 12: Candida glabrata zobrazena pod mikroskopem [72].*

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam použitých pomůcek, přístrojů a chemikálií

##### 3.1.1 Seznam použitých pomůcek a přístrojů

Laboratorní váhy-KERN, EMB, spol. s. r. o., Kyjov

Autokláv-Vaposteri BMT, Brno

Biologický inkubátor P100-U, Biotech Praha

Drobné laboratorní sklo a pomůcky: kahan, mikropipety, skleněné pipety, Petriho misky, korkvrt, očkovací klička, Erlenmeyerovy baňky, zkumavky aj.

##### 3.1.2 Seznam použitých chemikálií

Destilovaná voda (VWR)

Ethanol 96% (VWR)

#### 3.2 Analyzované vzorky



**Obrázek 13:** Analyzované vzorky (zleva – echinacea se zázvorem, echinaceové bylinné kapky, meduňka citronelová indická slice, levandulová silice FRANCE, laboratorně připravený extrakt z kořene echinacey 20%, laboratorně připravený extrakt z květu echinacey 20%, laboratorně připravený extrakt z květu echinacey 40%).

V experimentální části práce byly analyzovány modelové vzorky extraktů z květu a kořene echinacey (*Echinacea purpurea*). Pro srovnání byly vybrány a analyzovány komerčně získané vzorky – extrakty (silice) echinacey, levandule a meduňky (viz dále).

##### 3.2.1 Extrakty z echinacey

**Extrakt z květu echinacey 40% – laboratorně připravený extrakt**

Hnědá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

Macerace květu 1:10 probíhala 6 hodin v 40% roztoku ethanolu.

***Extrakt z květu echinacey 20% – laboratorně připravený extrakt***

Hnědá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

Macerace květu 1:10 probíhala 6 hodin v 20% roztoku ethanolu.

***Extrakt z kořene echinacey 20% – laboratorně připravený extrakt***

Světle hnědá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

Macerace kořenu 1:10 probíhala 24 hodin v 20% roztoku ethanolu.

***Echinaceové bylinné kapky***

Hnědá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

Kapky byly pořízené u firmy AROMATICA CZ s.r.o., Masarykovo nám. 101/3, Šlapanice, ČR. Po otevření byly skladovány v lednici při 5°C.

Složení: pitná voda, ethanol, echinacea purpurea.

Výrobek obsahuje minimálně 40 obj. % alkoholu.

***Echinacea se zázvorem***

Hnědá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

Kapky byly pořízené u firmy AROMATICA CZ s.r.o., Masarykovo nám. 101/3, Šlapanice, ČR. Po otevření byly skladovány v lednici při 5°C.

Složení: lihový extrakt echinacea purpurea, extrakt zázvoru lékařského, emulgátor E433.

Výrobek obsahuje minimálně 40 obj. % alkoholu.

**3.2.2 Levandulová silice FRANCE (*Lavandula Hybrida Abrial Herb Oil*)**

Světle žlutá čirá kapalina s charakteristickým aroma.

- Teplota vzplanutí 66 °C.
- Hustota 0,89 g.cm<sup>-3</sup> při 20 °C.

Silice byla pořízena u firmy PhDr. Ľubica Belášová, Kounice 449, ČR. Po otevření byla skladována v lednici při 5°C.

***Seznam alergenních složek***

- Limonene (1,0 %)
- Linalool (37,0 %)

**3.2.3 Meduňka citronelová indická silice (*Cymbopogon Winterianus Oil*)**

Bezbarvá až žlutá čirá kapalina s charakteristickým zápachem.

- Teplota vzplanutí 68 °C.
- Hustota 0,888 g.cm<sup>-3</sup> při 20 °C.

Silice byla pořízena u firmy PhDr. Ľubica Belášová, Svatý Štěpán 139, Brumov-Bylnice, ČR. Po otevření byla skladována v lednici při 5°C.

### **Seznam alergenních složek**

- Citral (2,0 %)
- Citronellol (11,0 %)
- Eugenol (1,0 %)
- Geraniol (22,0 %)
- Limonene (4,0 %)
- Linalool (1,0 %)

### **3.3 Seznam použitých mikroorganismů**

Mikroorganismy pocházely z České sbírky mikroorganismů v Brně. *Bacillus cereus* a *Candida glabrata* byly uchovávány v termostatu při teplotě 25°C. *Escherichia coli* byla uchovávána v lednici při 5°C. Kultivace všech tří mikroorganismů probíhala na šikmém agaru v uzavřené zkumavce v termostatu při teplotě 25°C.

### **3.4 Kultivační média a jejich příprava**

Veškerá používaná média byla připravena podle návodu (viz dále). Jejich sterilace probíhala v autoklávu při teplotě 121,1°C a tlaku 101,3 kPa po dobu 30 minut.

#### **3.4.1 Nutrient Agar No. 2 (masopeptonový agar - MPA)**

Nutrient Agar No. 2 se skládá z masového peptonu 10,0 g.l<sup>-1</sup>, hovězího extraktu 10,0 g.l<sup>-1</sup>, chloridu sodného 5,0 g.l<sup>-1</sup> a agaru 15,0 g.l<sup>-1</sup>.

Příprava: Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 8,0 g přípravku a bylo přidáno 200 ml destilované vody. Roztok byl zahříván do úplného rozpuštění a poté byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121°C.

Toto kultivační médium bylo použito pro bakterie *Bacillus cereus* a *Escherichia coli*.

#### **3.4.2 Malt Extract Agar Base (sladinový agar)**

Malt Extract Agar Base obsahuje sladový extrakt 30,0 g.l<sup>-1</sup>, mykologický pepton 5,0 g.l<sup>-1</sup> a agar 15,0 g.l<sup>-1</sup>.

Příprava: Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 10,0 g přípravku a bylo přidáno 200 ml destilované vody. Roztok byl ponechán 15 minut v klidu, aby nabobtnal a poté byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121°C.

Toto kultivační médium bylo použito pro kvasinku *Candida glabrata*.

#### **3.4.3 Masopeptonový bujon**

Bujon obsahuje pepton z živočišných tkání 10,0 g.l<sup>-1</sup>, hovězí extrakt 10,0 g.l<sup>-1</sup> a chlorid sodný 5,0 g.l<sup>-1</sup>.

Příprava: Do baňky bylo naváženo 25,0 g přípravku a bylo přidáno 1000 ml destilované vody. Roztok byl zahříván do úplného rozpuštění a poté byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121°C.

#### **3.4.4 Sladinový bujon**

Sladinový bujon obsahuje sladivý extrakt 13,0 g.l<sup>-1</sup>, želatinový pepton 5,5 g.l<sup>-1</sup> a kvasinkový extrakt 0,5 g.l<sup>-1</sup>.

Příprava: Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 19,2 g přípravku a bylo přidáno 1000 ml destilované vody. Roztok byl zahříván do úplného rozpuštění a poté byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121°C.

### **3.5 Očkování a kultivace mikroorganismů**

Jednotlivé mikroorganismy na šikmém agaru byly nejprve přeočkovány do tekutého živného média - bujónu. Po kultivaci (25 °C, 24 hod.) byly odpipetovány 2 ml do 150 ml vysterilizovaného agaru, ochlazeného na 42–45 °C. Takto připravené zaočkované médium bylo rozléváno na plastové Petriho misky. Tyto byly po ztuhnutí použity na stanovení antimikrobiální aktivity.

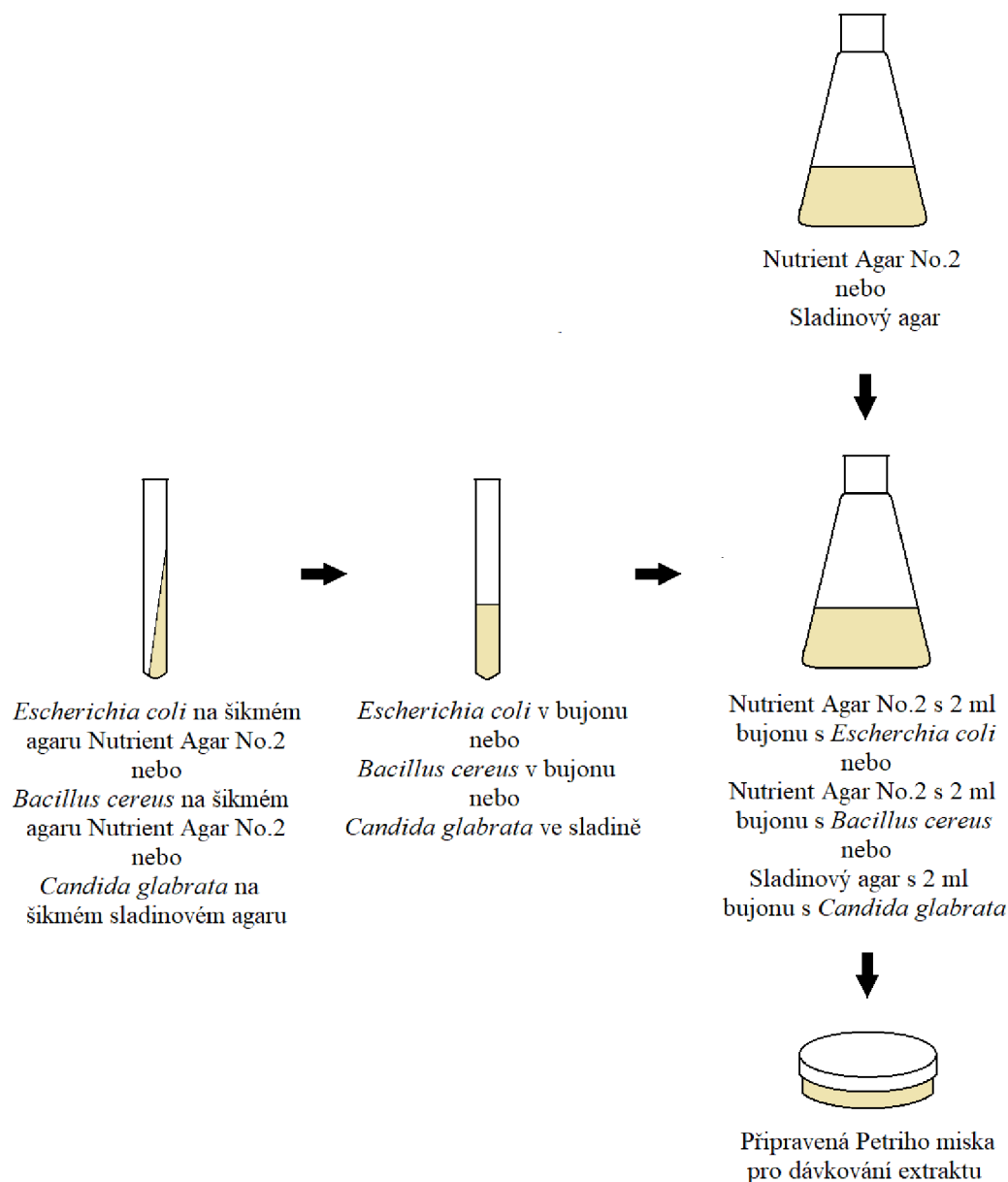
### **3.6 Stanovení antimikrobiální aktivity**

K ověření antimikrobiální aktivity vybraných vzorků byly použity a porovnány disková a jamková difúzní metoda.

#### **3.6.1 Jamková difúzní metoda**

Do ztuhlého agaru byly pomocí korkovrtu udělány 4 jamky. Do tří jamek bylo napipetováno 100 µl zvoleného extraktu. Do poslední jamky bylo napipetováno 100 µl destilované vody nebo ethanolu. Petriho misky byly uloženy do termostatu ke kultivaci při 25 °C a pozorovány v časových intervalech. *Bacillus cereus* po 48 hodinách a *Escherichia coli* a *Candida glabrata* po týdnu. Při pozorování byly zaznamenávány inhibiční zóny. Pomocí pravítka byl změřen průměr inhibiční zóny s přesností na 1 mm.



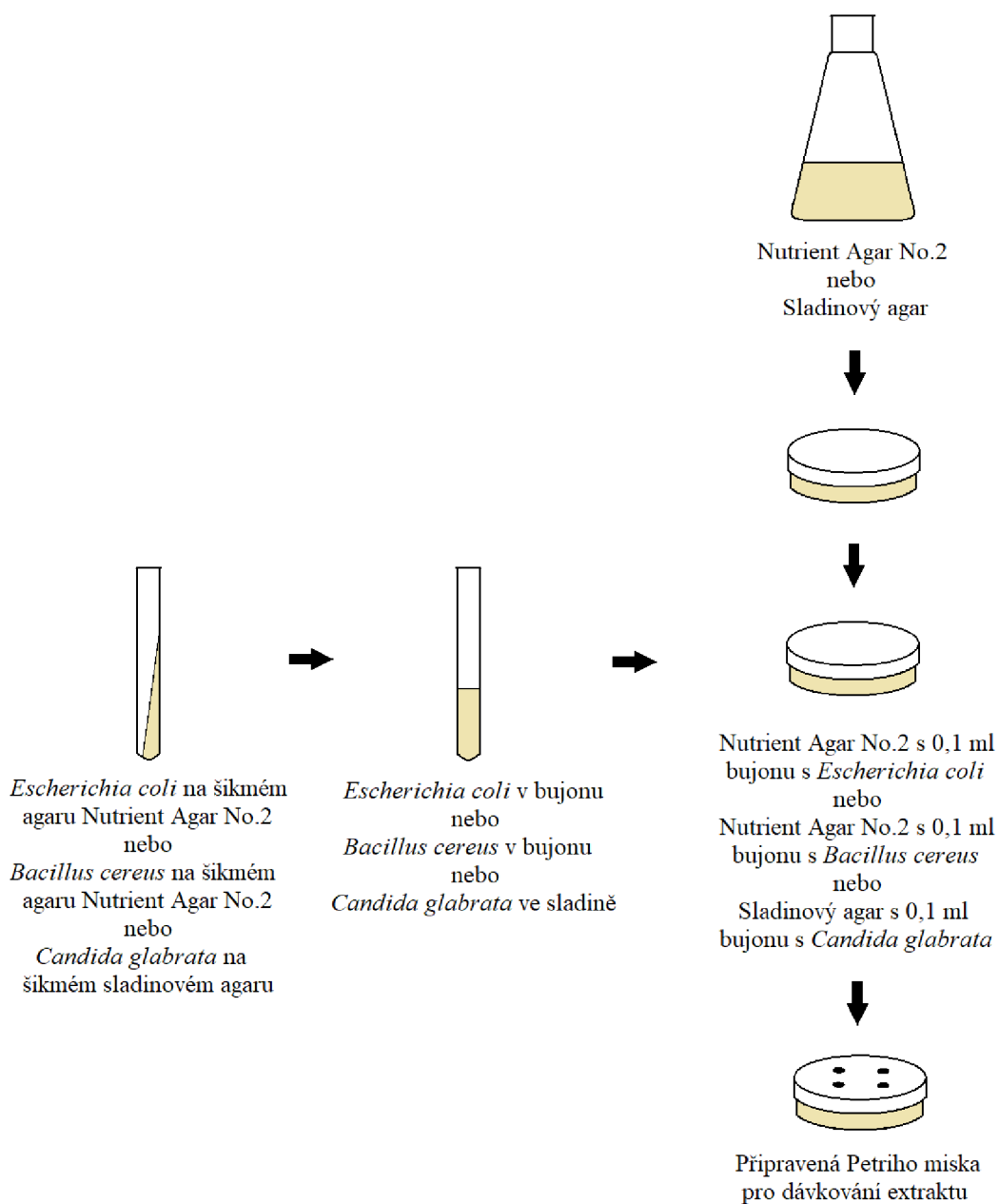


*Obrázek 14: Schéma přípravy Petriho misek pro jamkovou difúzní metodu.*

### 3.6.2 Disková difúzní metoda

V tomto případě byly připraveny obvyklým způsobem Petriho misky s příslušným agarem; po ztuhnutí bylo do každé Petriho misky napipetováno 0,1 ml naočkovaného bujonu, který byl pomocí hokejky rozetřen. Takto připravené agary byly ponechány hodinu v klidu při laboratorní teplotě. Poté byla do Petriho misek s *Escherichia coli* nalita tenká vrstvička agaru, která překryla agar s inokulem. Následně byly na ztuhlý agar ožehnutou pinzetou nanášeny disky z filtračního papíru o průměru 6 mm. Na tři disky byla pomocí mikropipety kápnuta malá kapička zvoleného extraktu a na poslední disk destilovaná voda nebo ethanol. Petriho misky byly uloženy do termostatu ke kultivaci při 25 °C a pozorovány v časových intervalech. *Bacillus cereus* po 48 hodinách a *Escherichia coli* a *Candida glabrata* po týdnů. Při pozorování byly zaznamenávány inhibiční zóny. Pomocí pravítka byl změřen průměr inhibiční zóny s přesností na 1 mm.





**Obrázek 15:** Schéma přípravy Petriho misek pro diskovou difúzní metodu.

### 3.7 Statistické vyhodnocení výsledků měření

Každé měření (pro každý mikroorganismus) bylo provedeno dvakrát (paralelně 2 Petriho misky). Výsledky byly zpracovány pomocí programu MS Excel a jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SD.

## 4 VÝSLEDKY

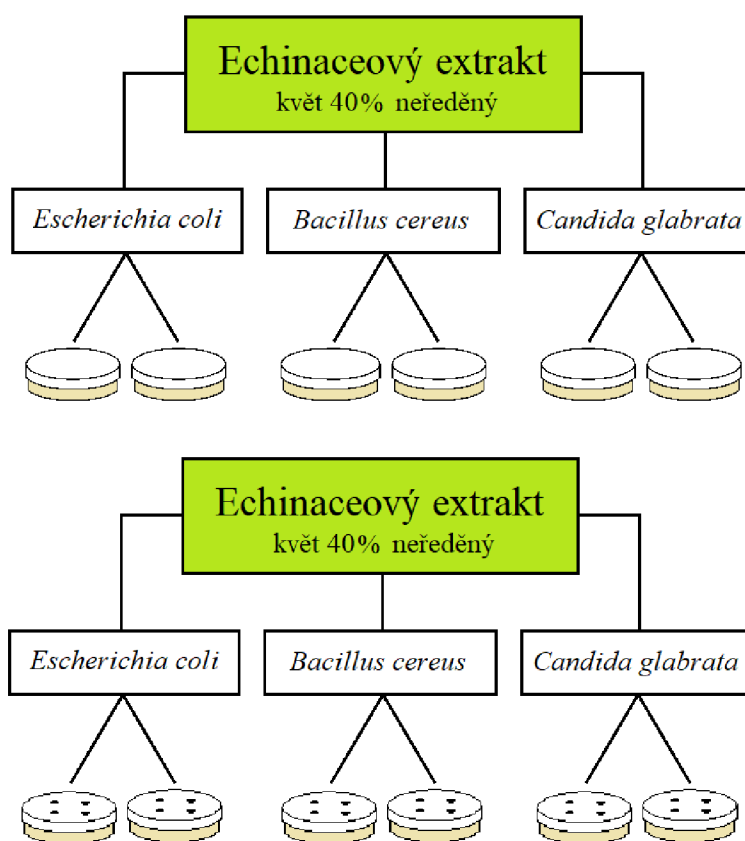
Cílem této bakalářské práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity modelových vzorků extraktů z echinacey a komerčních extraktů echinacey, meduňky a levandule.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly aplikovány a následně porovnány dvě klasické, v praxi často používané metody - difúzní jamková metoda a disková metoda (viz kap. 3.7). Princip obou metod spočívá v jednoduchém měření průměru inhibičních zón vzniklých v důsledku potlačení růstu testovacích mikroorganismů na agarovém mediu. Jako testovací mikroorganismy byly použity bakterie *Bacillus cereus* a *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*, okamžitě dostupné v mikrobiologické laboratoři na ÚCHPBT.

Antimikrobiální aktivita proti *Bacillus cereus* byla stanovena po 48 hodinách, proti *Escherichia coli* a *Candida glabrata* po týdnu. Velikost inhibiční zóny byla měřena pomocí pravítka (s přesností na 1 mm).

### 4.1 Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 40%

Rozvržení experimentu je uvedeno na *Obrázku 16*.

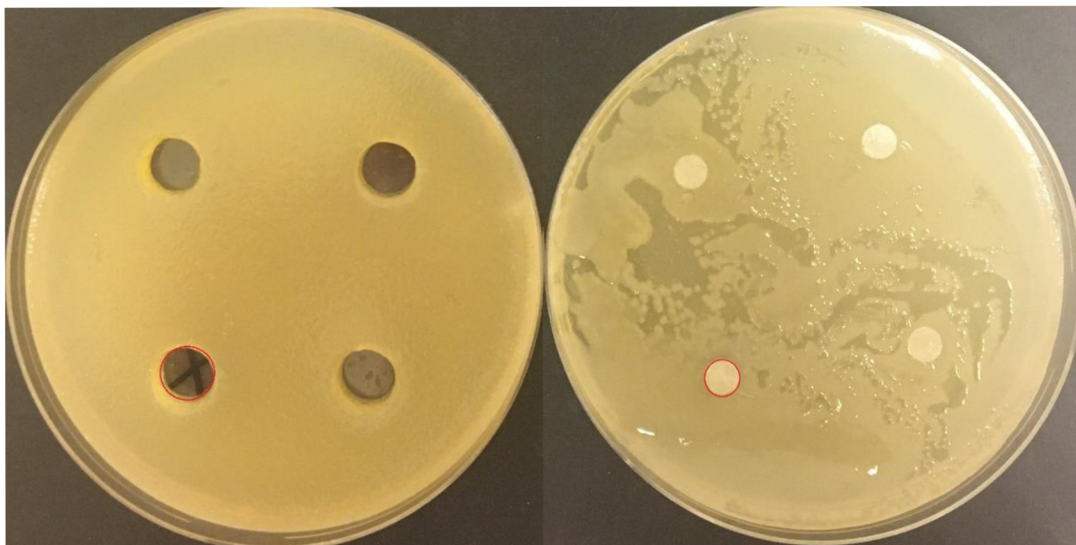


**Obrázek 16:** Stanovení antimikrobiální aktivity laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 40 % jamkovou a diskovou difúzní metodou.

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěného extraktu z květu echinacey 40%. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 40% ethanolu.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanese kapka neředěného extraktu z květu echinacey 40%. Na poslední disk byla nanese kapka 40% ethanolu.

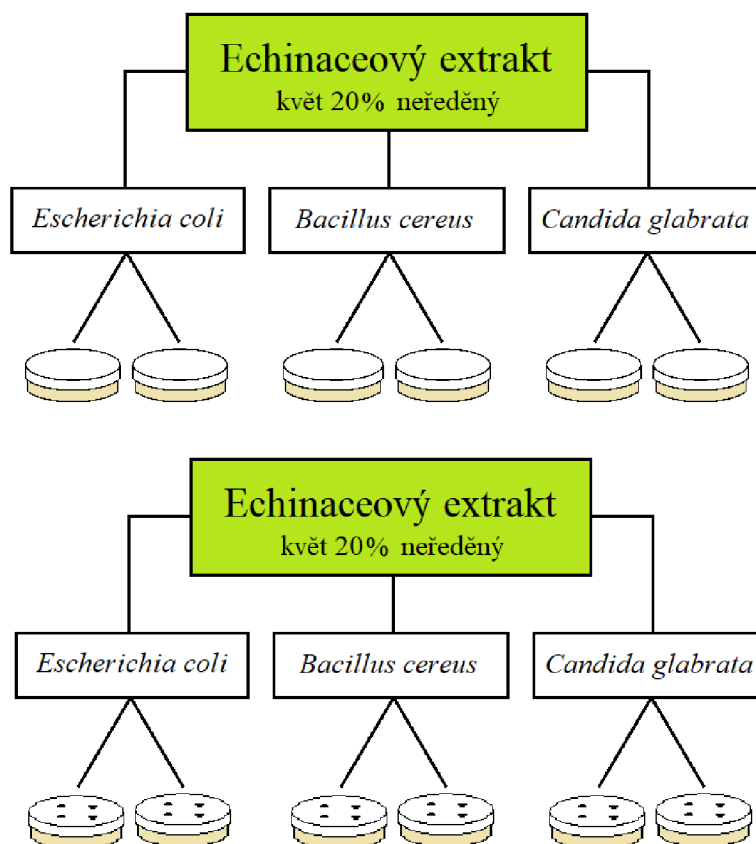
Tento extrakt nevykazoval inhibiční účinnost vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, což je patrné i z ukázky na **Obrázku 17**.



**Obrázek 17:** Účinek neředěného laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 40% na *Escherichia coli* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

## 4.2 Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 20%

Rozvržení experimentu je uvedeno na *Obrázku 18*.

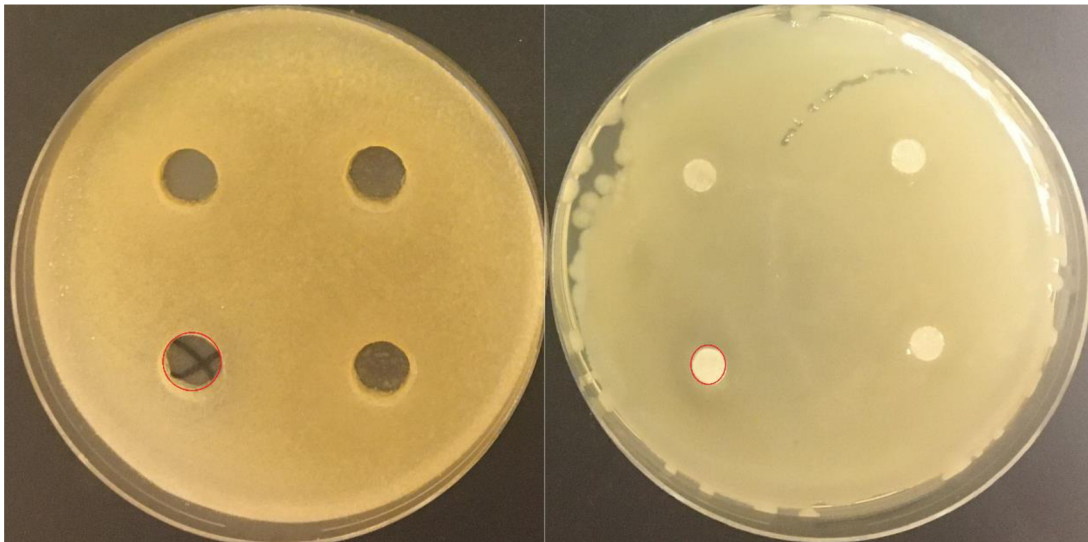


**Obrázek 18:** Stanovení antimikrobiální aktivity laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 20% jamkovou a diskovou difúzní metodou.

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěného extraktu z květu echinacey 20%. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 20% ethanolu.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanесena kapka neředěného extraktu z květu echinacey 20%. Na poslední disk byla nanесena kapka 20% ethanolu.

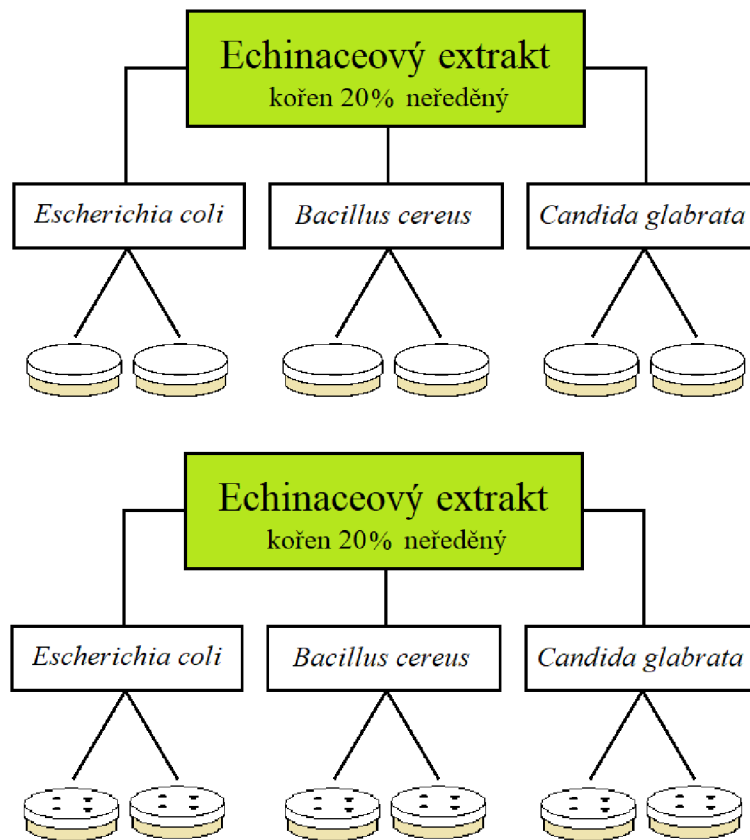
Tento extrakt nevykazoval inhibiční účinnost vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, což je patrné i z ukázky na *Obrázku 19*.



**Obrázek 19:** Účinek neředěného laboratorně připraveného extraktu z květu echinacey 20% na *Bacillus cereus* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

### 4.3 Antimikrobiální aktivita laboratorně připraveného extraktu z kořene echinacey 20%

Rozvržení experimentu je uvedeno na **Obrázku 20**.

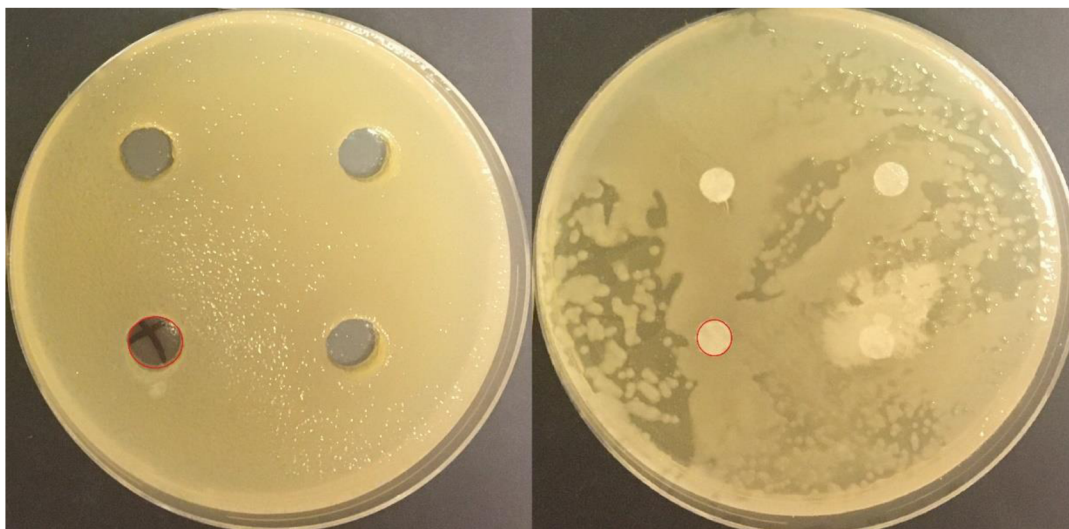


**Obrázek 20:** Stanovení antimikrobiální aktivity laboratorně připraveného extraktu z kořene echinacey 20% jamkovou a diskovou difúzní metodou.

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěného extraktu z kořene echinacey 20%. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 20% ethanolu.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanесena kapka neředěného extraktu z kořene echinacey 20%. Na poslední disk byla nanесena kapka 20% ethanolu

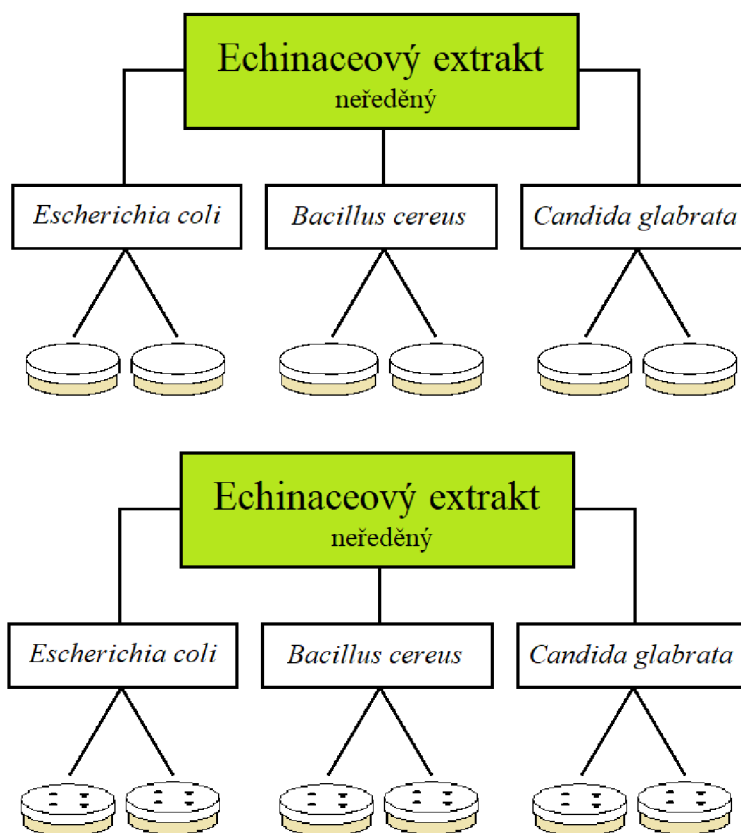
Tento extrakt nevykazoval inhibiční účinnost vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, což je patrné i z ukázky na **Obrázku 21**.



**Obrázek 21:** Účinek neředěného laboratorně připraveného extraktu z kořene echinacey 20% na *Escherichia coli* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

#### 4.4 Antimikrobiální aktivita echinaceových bylinných kapek

Rozvržení experimentu je uvedeno na *Obrázku 22*.



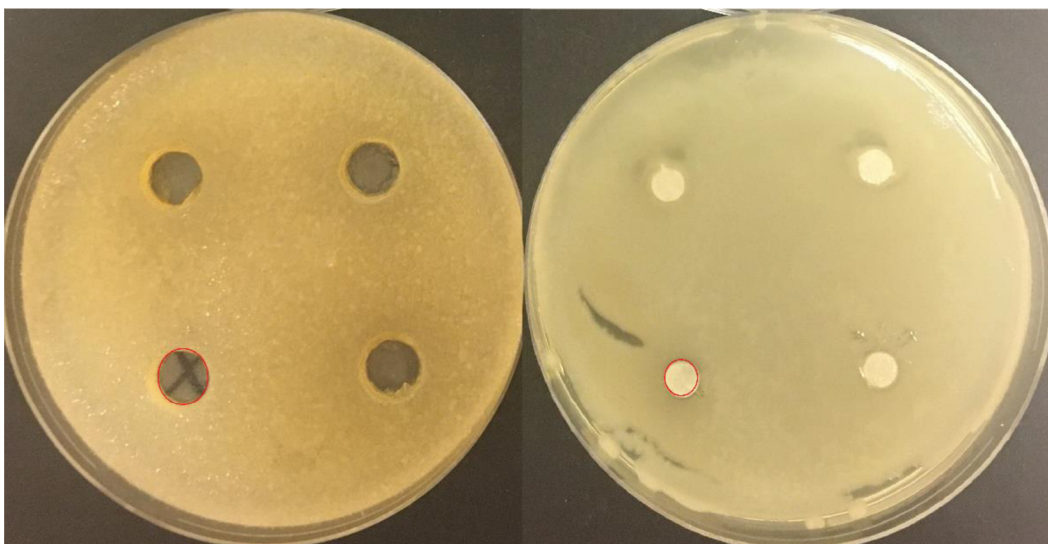
*Obrázek 22: Stanovení antimikrobiální aktivity echinaceových bylinných kapek jamkovou a diskovou difúzní metodou.*

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěných echinaceových bylinných kapek. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 40% ethanolu.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanесena kapka neředěných echinaceových bylinných kapek. Na poslední disk byla nanесena kapka 40% ethanolu.

Tento extrakt nevykazoval inhibiční účinnost vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, což je patrné i z ukázky na *Obrázku 23*.

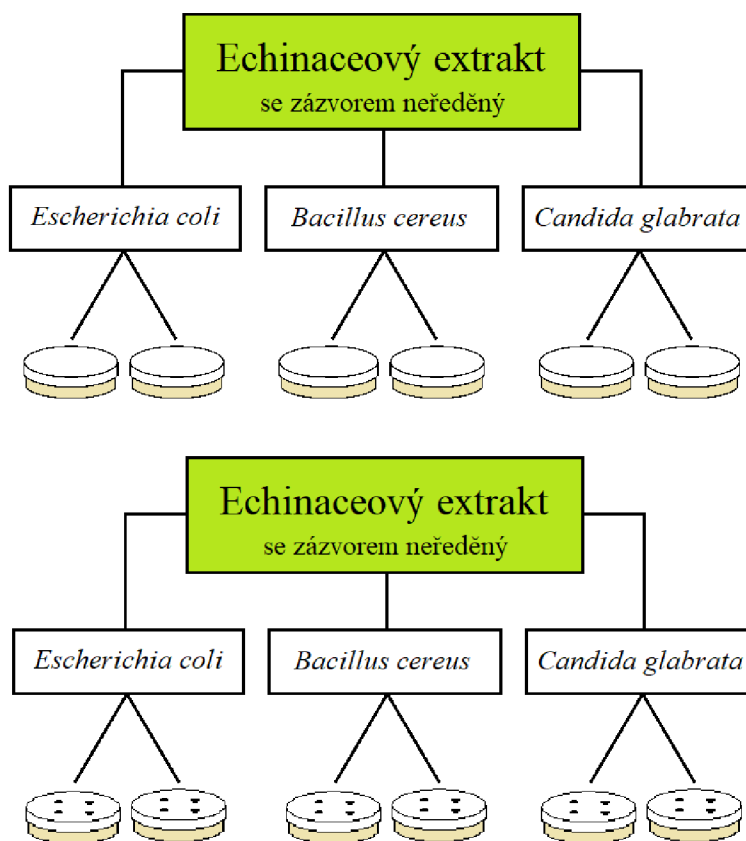




**Obrázek 23:** Účinek neředěných echinaceových bylinných kapek na *Bacillus cereus* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

#### 4.5 Antimikrobiální aktivita extraktu echinacey se zázvorem

Rozvržení experimentu je uvedeno na *Obrázku 24*.



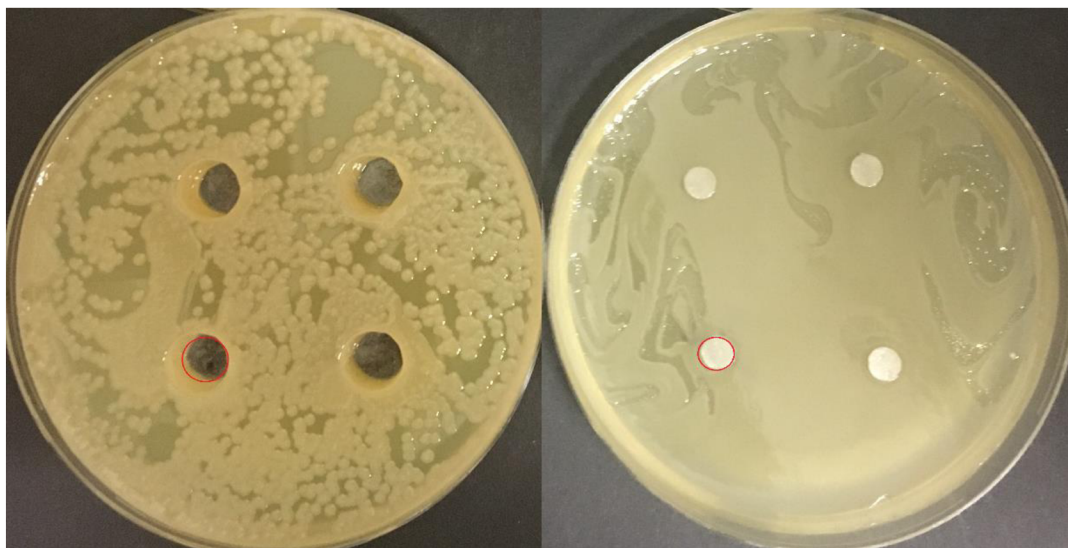
**Obrázek 24:** Stanovení antimikrobiální aktivity extraktu echinacey se zázvorem jamkovou a diskovou difúzní metodou.



V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěného extraktu echinacey se zázvorem. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 40% ethanolu.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanесena kapka neředěného extraktu echinacey se zázvorem. Na poslední disk byla nanесena kapka 40% ethanolu.

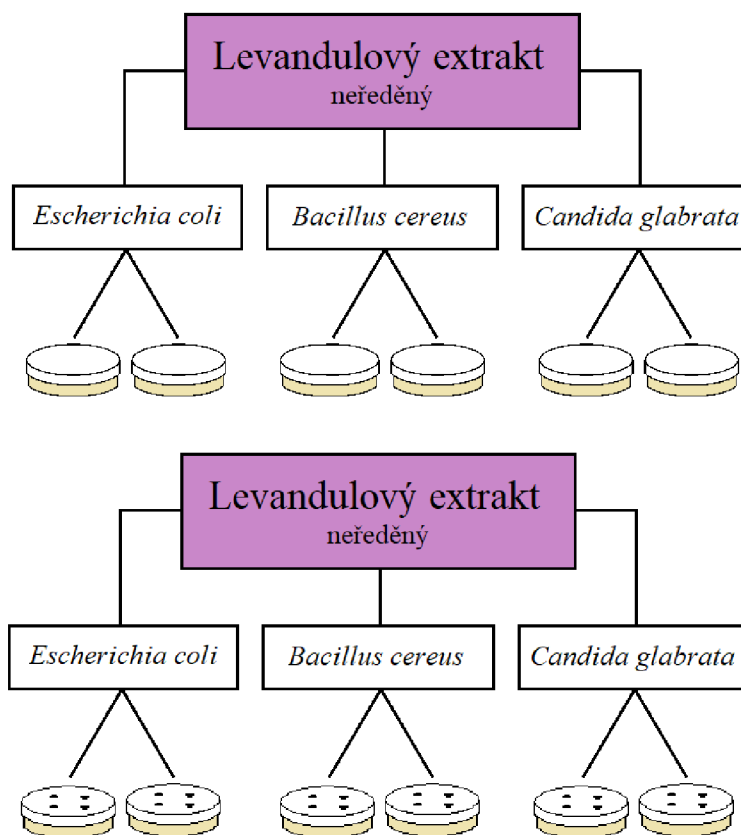
Tento extrakt nevykazoval inhibiční účinnost vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, což je patrné i z ukázky na **Obrázku 25**.



**Obrázek 25:** Účinek neředěného extraktu echinacey se zázvorem na *Escherichia coli* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

## 4.6 Antimikrobiální aktivita levandulové silice

Rozvržení experimentu je uvedeno na *Obrázku 26*.



**Obrázek 26:** Stanovení antimikrobiální aktivity levandulové silice jamkovou a diskovou difúzní metodou.

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří z nich bylo napipetováno 100  $\mu$ l neředěné levandulové silice. Do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l vysterilizované vody. Pro každý mikroorganismus byly připraveny dvě Petriho misky s agarem. Naměřené průměry inhibičních zón jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři z nich byla tyčinkou nanесena kapka neředěné levandulové silice. Na poslední disk byla nanесena kapka sterilní vody. Pro každý mikroorganismus byly připraveny dvě Petriho misky s agarem. Naměřené průměry inhibičních zón jsou uvedeny v *Tabulce 3*.

Z výsledků v *Tabulkách 2 a 3* a ukázky na *Obrázku 27* je patrné, že levandulová silice vykazovala inhibiční účinnost vůči sledovaným mikroorganismům.

V případě *Escherichia coli* a *Candida glabrata* u jamkové difúzní metody jsme pozorovali úplné usmrcení mikroorganismu, kdy nebyl ani po týdnu patrný jeho růst. Na obrázku (*Obrázek 27*) pozorujeme lepší růst mikroorganismu v případě diskové difúzní metody. To je způsobeno množstvím nanесeného extraktu. V případě jamkové difúzní metody se do jamky pipetovalo 100  $\mu$ l extraktu a v případě diskové difúzní metody se na disk nanášela kapka extraktu o objemu přibližně 30  $\mu$ l, což odpovídá menšímu množství extraktu, tudíž i lepšímu

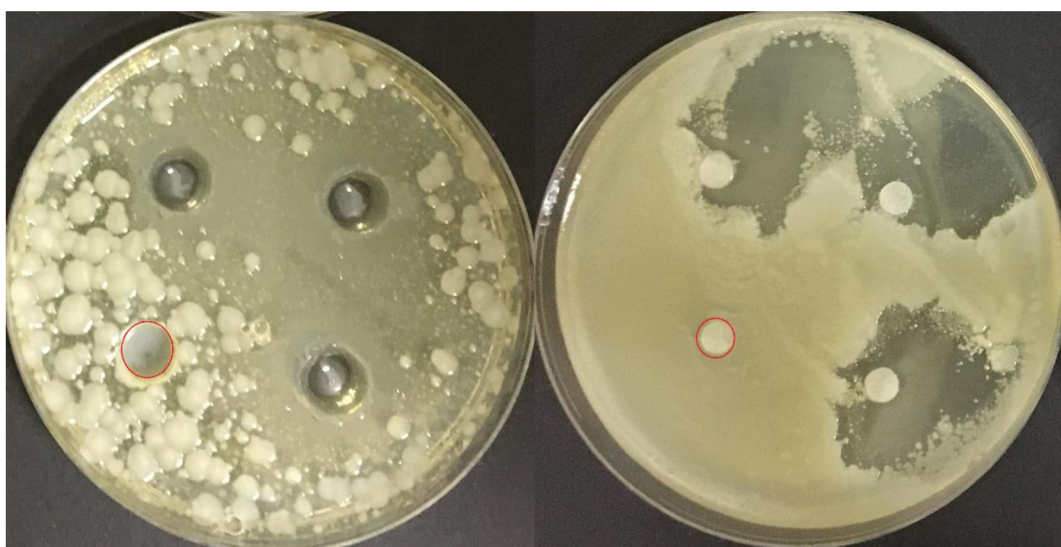
růst mikroorganismů. Z výsledku stanovení antimikrobiální aktivity můžeme říct, že levandulová silice je velmi účinná proti *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* a *Candida glabrata*.

**Tabulka 2:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) neředěné levandulové silice FRANCE (jamková difúzní metoda).

	Levandulová silice FRANCE
	neředěná
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	25,8 ± 2,3
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

**Tabulka 3:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) neředěné levandulové silice FRANCE (disková difúzní metoda).

	Levandulová silice FRANCE
	neředěná
<i>Escherichia coli</i>	30,2 ± 2,3
<i>Bacillus cereus</i>	26,2 ± 4,8
<i>Candida glabrata</i>	9,7 ± 2,5

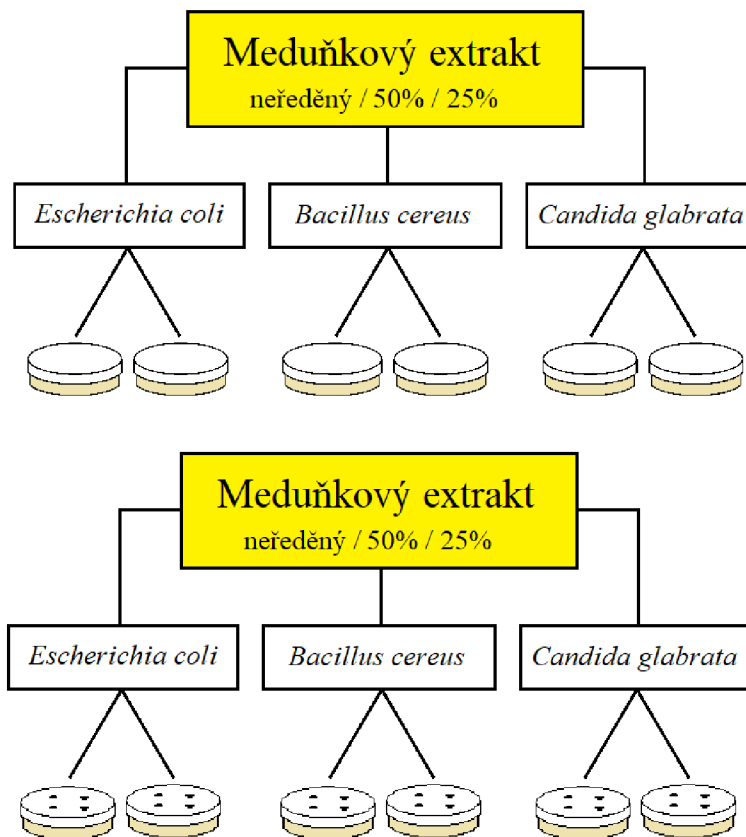


**Obrázek 27:** Účinek neředěné levandulové silice FRANCE na *Bacillus cereus* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

#### 4.7 Antimikrobiální aktivita meduňky citronelové indické silice

V tomto experimentu byl použit neředěný, 50% a 25% roztok meduňky citronelové indické silice. Na ředění roztoku byl použit ethanol.

Rozvržení experimentu je uvedeno v **Obrázku 28**.



**Obrázek 28:** Stanovení antimikrobiální aktivity meduňky citronelové indické silice jamkovou a diskovou difúzní metodou.

V případě jamkové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 jamkami o velikosti 1,0 cm. Do tří z nich bylo napipetováno 100  $\mu$ l připraveného roztoku, do poslední jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l 96% ethanolu. Naměřené průměry inhibičních zón jsou uvedeny v **Tabulce 4, 5 a 6**.

V případě diskové difúzní metody byly připraveny agarové plotny se 4 disky o velikosti 0,6 cm. Na tři disky byla tyčinkou nanесena kapka připraveného roztoku, na poslední disk byla nanесena kapka sterilní vody. Naměřené průměry inhibičních zón jsou uvedeny v **Tabulce 7, 8 a 9**.

Z výsledků v **Tabulkách 4 - 9** a ukázek na **Obrázcích 29 – 31** je patrné, že meduňková silice vykazovala inhibiční účinnost vůči sledovaným mikroorganismům.

Meduňka citronelová indická silice byla zkoumána ve třech koncentracích – neředěná, 50% a 25%. U neředěných extraktů (**Obrázek 29**) nebyl pozorován žádný růst mikroorganismu ani u jedné metody. Stejně tomu bylo i u 50% roztoku meduňky citronelové indické silice

(**Obrázek 30**). U 25% roztoku meduňky citronelové indické silice nebyl pozorován růst mikroorganismu pouze u jamkové difúzní metody. U diskové difúzní metody byly pozorovány inhibiční zóny v Petriho misce s *Candida glabrata* (**Obrázek 31**). Při použití 25% roztoku meduňky citronelové indické silice Petriho misky s *Escherichia coli* a *Bacillus cereus* neprokázaly žádné inhibiční zóny. Můžeme říci, že malé množství (kapka o objemu přibližně 30 µl) 25% roztoku meduňky citronelové indické silice nevykazuje antimikrobiální aktivitu.

**Tabulka 4:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) neředěné meduňky citronelové indické silice (jamková difúzní metoda).

	Meduňka citronelová indická silice neředěný
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	MO nenarostl
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

**Tabulka 5:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) 50% roztoku meduňky citronelové indické silice (jamková difúzní metoda).

	Meduňka citronelová indická silice 50%
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	MO nenarostl
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

**Tabulka 6:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) 25% roztoku meduňky citronelové indické silice (jamková difúzní metoda).

	Meduňka citronelová indická silice 25%
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	MO nenarostl
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

**Tabulka 7:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) neředěné meduňky citronelové indické silice (disková difúzní metoda).

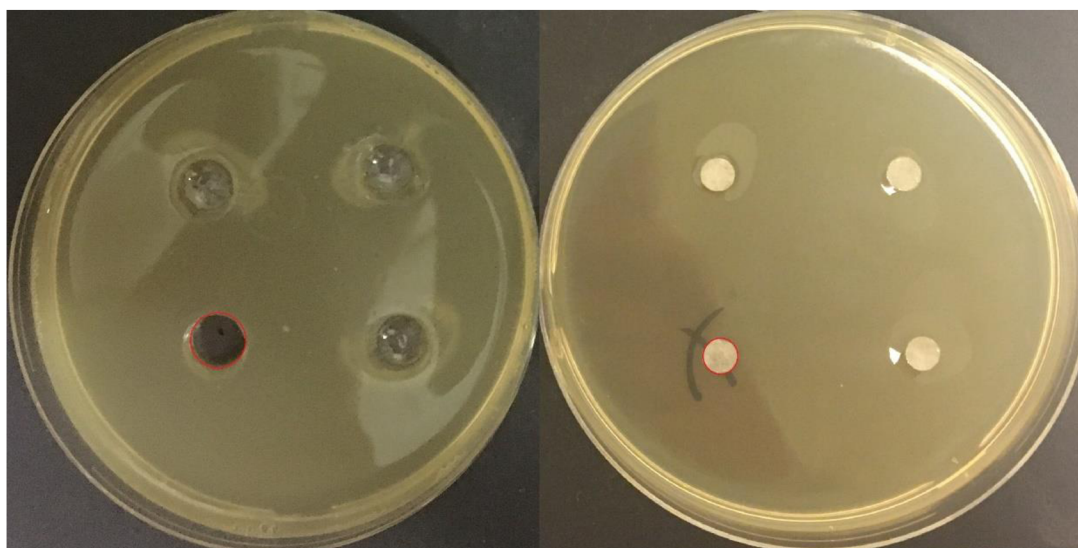
	Meduňka citronelová indická silice neředěný
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	MO nenarostl
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

**Tabulka 8:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) 50% roztoku meduňky citronelové indické silice (disková difúzní metoda).

	Meduňka citronelová indická silice
	50%
<i>Escherichia coli</i>	MO nenarostl
<i>Bacillus cereus</i>	MO nenarostl
<i>Candida glabrata</i>	MO nenarostl

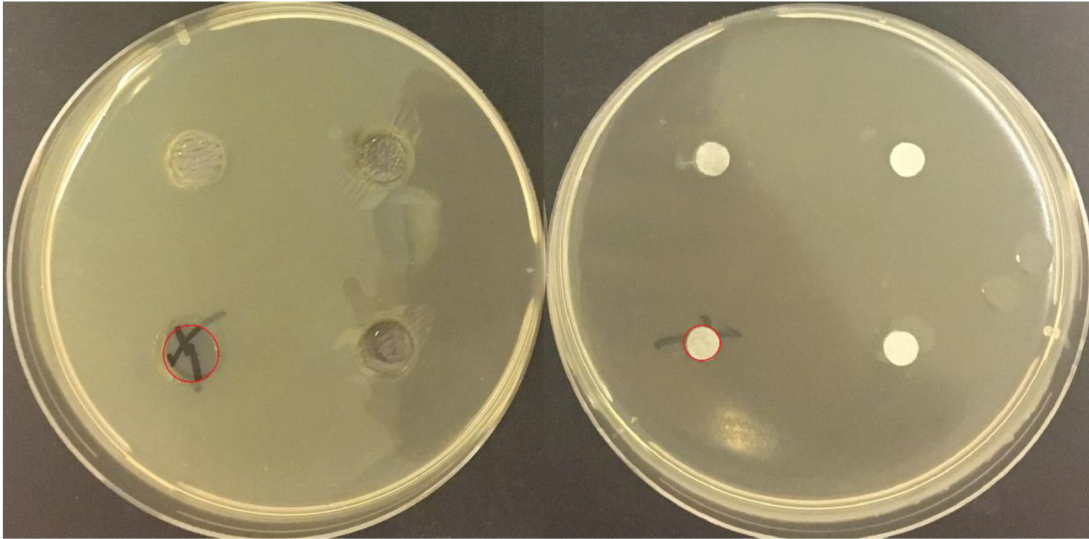
**Tabulka 9:** Antimikrobiální aktivita (průměr inhibičních zón v mm) 25% roztoku meduňky citronelové indické silice (disková difúzní metoda).

	Meduňka citronelová indická silice
	25%
<i>Escherichia coli</i>	0 ± 0
<i>Bacillus cereus</i>	0 ± 0
<i>Candida glabrata</i>	19,5 ± 1,6

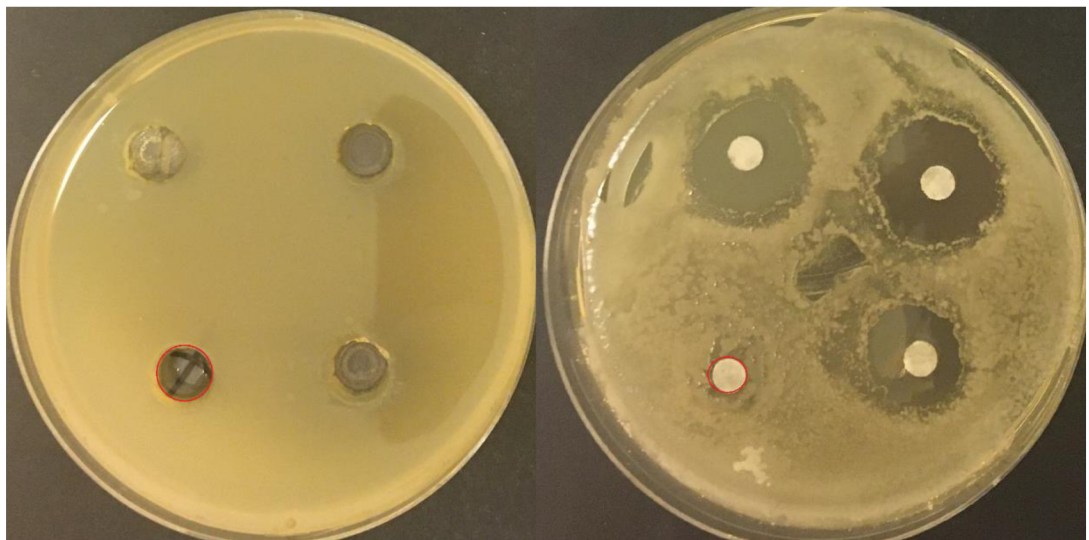


**Obrázek 29:** Účinek neředěné meduňkové citronelové indické silice na *Candida glabrata* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.





**Obrázek 30:** Účinek 25% roztoku meduňky citronelové indické silice na *Bacillus cereus* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.



**Obrázek 31:** Účinek 25% roztoku meduňky citronelové indické silice na *Candida glabrata* jamkovou a diskovou difúzní metodou se slepým vzorkem vlevo dole.

## 5 DISKUZE

Antimikrobiální aktivita laboratorně připravených přírodních extraktů z kořene a květu echinacey nebyla prokázána. Tyto extrakty vykazovaly nulové inhibiční zóny proti vybraným mikroorganismům. Výsledky byly stejné v případě obou použitých metod. Komerční extrakty echinaceové bylinné kapky a echinacea se závorem, taktéž neprokázali žádnou antimikrobiální aktivitu proti vybraným mikroorganismům.

Levandulová silice FRANCE vykazovala antimikrobiální aktivitu proti všem vybraným mikroorganismům. V případě jamkové metody vykazovala silice největší antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli* a *Candida glabrata*. U diskové metody byly za daných podmínek pozorovány největší inhibiční zóny u *Escherichia coli*. Z výsledků víme, že při jamkové metodě mikroorganismy nenarostli ve dvou případech, což je způsobeno množstvím použitého extraktu. U jamkové metody se do jamek pipetuje 100  $\mu$ l a u diskové metody se na disk nanáší pouze jedna kapka extraktu pipetou o objemu přibližně 30  $\mu$ l.

Antimikrobiální aktivita meduňky citronelové indické silice byla stanovena ve třech koncentracích. Neředěný extrakt vykazoval příliš velkou antimikrobiální aktivitu a vybrané mikroorganismy zahynuly. Srovnatelně na tom byl i 50% extrakt. 25% extrakt v případě jamkové metody způsobil také zahynutí mikroorganismů. U diskové metody byly pozorovány inhibiční zóny u kvasinky *Candida glabrata* o průměru  $19,5 \pm 1,6$  mm. V případě *Escherichia coli* a *Bacillus cereus* nebyl pozorován žádný inhibiční účinek. Tudíž 25% extrakt meduňky citronelové indické silice byl neúčinný proti těmto dvěma mikroorganismům.

Z výsledků je patrné, že největší antimikrobiální aktivitu proti všem vybraným mikroorganismům vykazovala meduňka citronelová indická silice. Vysokou antimikrobiální aktivitu vykazovala i levandulová silice FRANCE. Laboratorně získané i komerční extrakty echinacey nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu vůči vybraným mikroorganismům.



## 6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování problematiky mikrobiální rizikovosti kosmetických přípravků, možnosti využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů a přírodní kosmetiky a specifika její konzervace.

Kosmetické i potravinářské produkty jsou dobrým prostředím pro růst a množení mikroorganismů. Tyto produkty obsahují ve většině případů vodu, která je z tohoto hlediska mikrobiologicky rizikovou surovinou. Aby nedocházelo k růstu a množení mikroorganismů je potřeba daný produkt ochránit konzervačním zákrokem nebo přípravkem (syntetické konzervační látky, přírodní konzervační látky).

Spotřebitelé odmítají používání syntetických konzervačních látek do kosmetických produktů, z toho důvodu výrobci hledají nové způsoby konzervace. Využívají ke konzervaci přírodní konzervační látky získané z rostlinného materiálu. Další zkoumanou možností je využití esenciálních olejů jako konzervačních látek. Esenciální oleje vykazují velmi dobrou antimikrobiální aktivitu proti konkrétním mikroorganismům. Problém je, že daný esenciální olej může inhibovat jeden mikroorganismus ale druhý ne. Je proto potřeba jako konzervační systém použít kombinaci esenciálních olejů. Esenciální oleje však způsobují často alergické kožní reakce, proto je důležité definovat bezpečné množství a koncentraci, ve které mohou být použity.

V experimentální části byla testována antimikrobiální aktivita vybraných přírodních extraktů. Bylo vybráno dohromady 7 extraktů, z toho 4 komerční (levandulová silice FRANCE, meduňka citronelová indická silice, echinaceové bylinné kapky a extrakt echinacey se zázvorem) a 3 vyrobené (extrakt z květu echinacey 40%, extrakt z květu echinacey 20% a extrakt z kořene echinacey 20%). Antimikrobiální aktivita extraktů byla testována proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, grampozitivní bakterii *Bacillus cereus* a kvasince *Candida glabrata*.

Z porovnání inhibičních zón je patrné, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala meduňka citronelová indická silice, která obsahuje značné množství geraniolu a citronellolu. Antimikrobiální aktivita pro neředěný extrakt byla příliš velká, a došlo tak k úplnému usmrcení mikroorganismů. V případě 50% roztoku extraktu taktéž. Pro další stanovení antimikrobiální aktivity byl použit 25% roztok extraktu, který v případě jamkové difúzní metody opět usmrtil všechny zkoumané mikroorganismy. U diskové difúzní metody byly pozorovány inhibiční zóny inhibující kvasinku *Candida glabrata*. U *Escherichia coli* a *Bacillus cereus* nebyly pozorovány inhibiční zóny pro 25% roztok extraktu. Meduňková citronelová indická silice je velmi účinnou antimikrobiální látkou, která prokázala největší inhibiční účinek proti *Escherichia coli* a *Bacillus cereus*.

Vysokou antimikrobiální aktivitu prokázala i levandulová silice FRANCE, která obsahovala značné množství linaloolu. Antimikrobiální aktivita byla stanovena pouze pro neředěný extrakt. U jamkové metody měl extrakt nejmenší inhibiční zóny proti *Bacillus cereus*. Proti *Escherichia coli* a *Candida glabrata* prokázal extrakt významně větší antimikrobiální aktivitu. U diskové metody, kde bylo využito menší množství extraktu, byly pozorovány inhibiční zóny u všech mikroorganismů. Největší inhibiční zóny byly změřeny u *Escherichia coli*. Levandulová silice

FRANCE je účinnou antimikrobiální látkou, která prokázala největší inhibiční účinek proti *Escherichia coli*.

Zkoumané extrakty z echinacey jak komerční (echinaceové bylinné kapky, extrakt echinacey se zázvorem), tak vyrobené (extrakt z květu echinacey 40%, extrakt z květu echinacey 20% a extrakt z kořene echinacey 20%) neprokázaly žádnou antimikrobiální aktivitu proti vybraným mikroorganismům.

Meduňka citronelová indická silice a levandulová silice FRANCE jsou účinnými antimikrobiálními látkami, které by mohly být využity jako konzervační látky pro kosmetické produkty i v potravinářství proti *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* a *Candida glabrata*. Tyto extrakty musí být hlouběji prozkoumány dle produktu, ve kterém budou využívány. Jelikož se jedná o silice, je zde vysoká pravděpodobnost, že budou tyto silice způsobovat kožní alergické reakce. Proto bude nutné v následujících experimentech přesněji stanovit koncentraci a množství extraktu pro bezpečné použití v kosmetických produktech s ohledem na jejich předpokládanou expozici za běžných a rozumně předvídatelných podmínek, v souladu s Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) 1223/2009 v aktuálním znění.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Clinical Microbiology: Open Access [online], [cit. 2020-03-02]. ISSN 2327-5073. Dostupné z: <https://www.longdom.org/scholarly/antimicrobial-activity-journals-articles-ppts-list-3252.html>
- [2] Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Evaluations as R&D Tools [online], [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <https://www.qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc-evaluations-as-rd-tools/>
- [3] WIŃSKA, Katarzyna, Wanda MAĆZKA, Jacek ŁYCZKO, Małgorzata GRABARCZYK, Anna CZUBASZEK a Antoni SZUMNY, 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* [online]. 24(11) [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.3390/molecules24112130. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/11/2130>
- [4] CHRISTAKI, Efterpi, Eleftherios BONOS, Ilias GIANNENAS a Panagiota FLOROU-PANERI, 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* [online]. 2(3), 228-243 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.3390/agriculture2030228. ISSN 2077-0472. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2077-0472/2/3/228>
- [5] COWAN, Marjorie Murphy, Plant Products as Antimicrobial Agents [online]. 1999 Oct. [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/>
- [6] GONZÁLEZ-LAMOTHE, Rocío, Gabriel MITCHELL, Mariza GATTUSO, Moussa DIARRA, François MALOUIN a Kamal BOUARAB, 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 10(8), 3400-3419 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.3390/ijms10083400. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/8/3400>
- [7] COMPEAN, K.L. a R.A. YNALVEZ, 2014. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant* [online]. 8(5), 204-213 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.3923/rjmp.2014.204.213. ISSN 18193455. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2014.204.213>
- [8] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [9] Fenol  $\geq 99,5$  %, p.a., detached crystals [online], In: . [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/nl/fenol-995-pa-detached-crystals.html>
- [10] OTHMAN, Leen, Ahmad SLEIMAN, Roula M. ABDEL-MASSIH a Panagiota FLOROU-PANERI, 2019. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in Microbiology* [online]. 10(3), 228-243 [cit. 2020-

- 04-02]. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00911. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00911/full>
- [11] Terpen [online]. In: . [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Terpen>
- [12] Linalool, PubChem [online]. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>
- [13] Linalyl acetate, PubChem [online]. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8294>
- [14] Citral, PubChem [online]. [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citral>
- [15] Citronellal, PubChem [online]. [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citronellal>
- [16] Borneol, PubChem [online]. [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Borneol>
- [17] Bornyl acetate, PubChem [online]. [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bornyl-acetate>
- [18] (-)-Germacrene D, PubChem [online]. [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Germacrene-D>
- [19] Levandule lékařská – aromatická léčivka, vhodná i na okrasu. Mojemedicina.cz [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pruvodce-pacienta/zivotni-styl/bylinky-ve-vasi-lekarnicce/levandule-lekarska-aromaticka-lecivka-vhodna-i-na-okrasu.html>
- [20] Levandule lékařská. Bylinkový ráj [online]. [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://bylinkovyraj.net/levandule-lekarska/>
- [21] Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*). CelostniMedicina.cz [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/medunka-lekarska-melissa-officinalis.htm>
- [22] Meduňka lékařská - pomůže při nespavosti. Mojemedicina.cz [online]. [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pruvodce-pacienta/zivotni-styl/bylinky-ve-vasi-lekarnicce/medunka-lekarska-pomuze-pri-nespavosti.html>
- [23] Třapatka nachová. CelostniMedicina.cz [online]. [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/trapatka-nachova-echinacea-purpurea.htm>
- [24] Třapatka nachová, Třapatkovka nachová - (*Echinacea Purpurea* L.). TOPVET [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.topvet.cz/herbar/trapatka-nachova-trapatkovka-echinacea-purpurea>

- [25] Berkem: PLANT EXTRACTION: the heart of Berkem's trade [online], [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <http://www.berkem.com/en/expertise-en/plant-extraction>
- [26] ZHANG, Qing-Wen, Li-Gen LIN a Wen-Cai YE, 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine [online]. 13(1) [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x. ISSN 1749-8546. Dostupné z: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>
- [27] LUCERA, Annalisa, Cristina COSTA, Amalia CONTE a Matteo A. DEL NOBILE, 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds: LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Frontiers in Microbiology [online]. InTech, 2017-09-06, 3 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00287. ISBN 978-953-51-3489-3. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00287/abstract>
- [28] ARSHAD, Muhammad Sajid a Syeda Ayesha BATOOL, 2017. Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety: LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Food Additives [online]. InTech, 2017-09-06 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.5772/intechopen.70197. ISBN 978-953-51-3489-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/food-additives/natural-antimicrobials-their-sources-and-food-safety>
- [29] HALLA, Nouredine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO, et al., 2018. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. Molecules [online]. 23(7) [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.3390/molecules23071571. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1571>
- [30] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009: o kosmetických přípravcích [online], 30. listopadu 2009 [cit. 2019-11-10]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- [31] NEZA, Edlira a Marisanna CENTINI, 2016. Microbiologically Contaminated and Over-Preserved Cosmetic Products According Rapex 2008–2014. Cosmetics [online]. 3(1) [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.3390/cosmetics3010003. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/3/1/3>
- [32] BRANNAN, Daniel K., 1997. COSMETIC MICROBIOLOGY: A Practical Handbook. Boca Raton: CRC PRESS. ISBN 0-8493-3713-5.
- [33] Five Most Common Types of Preservatives Used in Cosmetics [online]. [cit. 2019-11-10]. Dostupné z: <http://microchemlab.com/information/five-most-common-types-preservatives-used-cosmetics>
- [34] A Guide to Cosmetic Product Preservatives. The Eco Well [online]. May 11, 2019 [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://www.theecowell.com/blog/preservatives1>

- [35] MICHALKIEWICZ, Sławomir, 2013. Anodic oxidation of parabens in acetic acid–acetonitrile solutions. *Journal of Applied Electrochemistry* [online]. 10 November 2012, 43(1), 85-97 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1007/s10800-012-0502-5. ISSN 0021-891X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10800-012-0502-5>
- [36] DMDM hydantoin. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/DMDM\\_hydantoin](https://en.wikipedia.org/wiki/DMDM_hydantoin)
- [37] SALVADEO, Elena a Jean-Christophe M. MONBALIU, 2020. Development of a sustainable continuous flow approach toward allantoin. *Journal of Flow Chemistry* [online]. 10(1), 251-257 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1007/s41981-019-00056-7. ISSN 2062-249X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s41981-019-00056-7>
- [38] Methylchlorisothiazolinon. In: WIKIPEDIE: Otevřená encyklopedie [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Methylchlorisothiazolinon>
- [39] Methylisothiazolinone. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Methylisothiazolinone>
- [40] Phenoxyethanol. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phenoxyethanol>
- [41] Ethylhexylglycerin. Ethylhexylglycerin: by schülke [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <http://www.ethylhexylglycerin.com/ethylhexylglycerin/>
- [42] Ethylhexylglycerin. In: Ingredient Database [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <http://thetoxicfreefoundation.com/database/ingredient/ethylhexylglycerin>
- [43] Benzoic acid. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Benzoic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Benzoic_acid)
- [44] Sorbic acid. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Sorbic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Sorbic_acid)
- [45] Levulinic acid. In: WIKIPEDIA: The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Levulinic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Levulinic_acid)
- [46] Define Natural Cosmetics. JOAN MORAIS: COSMETICS SCHOOL [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://joanmorais.com/blog/define-natural-cosmetics/>
- [47] What Are 'Natural' Skin-Care Products, and Are They Actually Better for You? EVERYDAY HEALTH [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.everydayhealth.com/skin-beauty/what-are-natural-skin-care-products-are-they-better-you/>
- [48] What is a natural cosmetic?, CHEMISTS CORNER [online]. [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://chemistscorner.com/what-is-a-natural-cosmetic/>

- [49] [List] Natural Preservatives for cosmetics. LUISA FANZANI: THE SCIENCE AND BUSINESS OF COSMETICS [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.luisafanzani.com/natural-preservatives-for-cosmetics/>
- [50] KUNICKA-STYCZYŃSKA, A., M. SIKORA a D. KALEMBA, 2009. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 107(6), 1903-1911 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x>
- [51] JIANU, Călin, Georgeta POP, Alexandra T. GRUIA a Florin George HORHAT. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: [https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/36105\\_..pdf](https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/36105_..pdf)
- [52] HERMAN, Anna, Andrzej Przemysław HERMAN, Beata Wanda DOMAGALSKA a Andrzej MŁYNARCZYK, 2013. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 53(2), 232-237 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-012-0329-0>
- [53] ABDELLATIF, Fahima, Hadjira BOUDJELLA, Abdelghani ZITOUNI a Aicha HASSANI. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. [online]. 2014 Jul 17 [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464394/>
- [54] EHSANI, Ali, Omar ALIZADEH, Mohammad HASHEMI, Asma AFSHARI a Majid AMINZARE. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oil [online]. 2017 Sep 15 [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5653886/>
- [55] HUDSON, James B., 2012. Applications of the Phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2012, 1-16 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1155/2012/769896. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/769896/>
- [56] RADY, Mohamed Ramadan, Ahmed M. ABOUL-ENEIN a Mona Mohamed IBRAHIM, 2018. Active compounds and biological activity of in vitro cultures of some *Echinacea purpurea* varieties. *Bulletin of the National Research Centre* [online]. 42(1) [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1186/s42269-018-0018-1. ISSN 2522-8307. Dostupné z: <https://BNRC.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-018-0018-1>
- [57] MOSTAFA, Ashraf A., Abdulaziz A. AL-ASKAR, Khalid S. ALMAARY, Turki M. DAWOUD, Essam N. SHOLKAMY a Marwah M. BAKRI, 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning

- diseases. Saudi Journal of Biological Sciences [online]. 25(2), 361-366 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.02.004. ISSN 1319562X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X17300773>
- [58] Zázvorník lékařský (*Zingiber officinale*). CELOSTNIMEDICINA.CZ [online]. 01.06.2016 [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/zazvornik-lekarsky-zingiber-officinale.htm>
- [59] MAN, Adrian, Luigi SANTACROCE, Romeo IACOB, Anca MARE a Lidia MAN, 2019. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. Pathogens [online]. 8(1) [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.3390/pathogens8010015. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/1/15>
- [60] *Cinnamomi ceylanici corticis etheroleum*. Český lékopis 1997 [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_6\\_1\\_Cinnamomi\\_etheroleum.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Cinnamomi_etheroleum.htm)
- [61] Heřmáněk pravý (*Matricaria chamomilla*). ELANATURA: blog [online]. 18.3.2016 [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <http://www.blog.elanatura.cz/hermanek-pravy-matricaria-chamomilla/>
- [62] RIBEIRO, Ana Sofia, Marilene ESTANQUEIRO, M. Beatriz OLIVEIRA a José Manuel Sousa LOBO, Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products [online]. [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.3390/cosmetics2020048. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-9284/2/2/48>
- [63] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA, 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis [online]. 6(2), 71-79 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
- [64] GUIDELINE 2.1.: LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING [online], [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/GUIDE\\_2.1\\_ANTIMICROBIAL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf)
- [65] E-TEST ( Epsilometer test): Principle, purpose, procedure, results and interpretations. The Eco Well: MEDICAL MICROBIOLOGY GUIDE [online]. January 9, 2015 [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/e-test-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-results-and-interpretations/>
- [66] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologu. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-1024-6.



- [67] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK, 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami. Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967-0649-7.
- [68] Bakterie a E. Coli. In: PitnáVoda.cz [online]. [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <https://www.pitnavoda.cz/bakterie-a-e-coli/>
- [69] MCDOWELL, Rachel H., Evan M. SANDS a Harvey FRIEDMAN, Bacillus Cereus [online]. July 5, 2019 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>
- [70] FDA and CDC helping with Ugandan outbreak investigation. In: Food Safety News [online]. June 5, 2019 [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <https://www.foodsafetynews.com/2019/06/fda-and-cdc-helping-with-ugandan-outbreak-investigation/>
- [71] FIDEL, JR., Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL, Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans [online]. 1999 Jan [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88907/>
- [72] Microscopic Morphologic Features of Yeast. In: MEDICAL LABS: MEDICAL LABORATORIES PORTAL [online]. [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <http://www.medical-labs.net/microscopic-morphologic-features-of-yeast-2838/>

## **8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

MIB – minimální baktericidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MPA – masopeptonový agar

PC – papírová chromatografie

SD – směrodatná odchylka

TLC – tenkovrstvá chromatografie

ÚCHPBT – ústav chemie potravin a biotechnologií