

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2019

Adéla Alexová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY ROSTLIN A JEJICH VYUŽITÍ V PŘÍPRAVCÍCH PROTI AKNĚ

ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM PLANTS AND THEIR APPLICATION IN ACNE PREPARATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adéla Alexová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1367/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Adéla Alexová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Antimikrobiální látky rostlin a jejich využití v přípravcích proti akné

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše týkající se charakterizace rostlinných zdrojů přírodních látek, možnosti využití různých částí rostliny, obsahu vybraných aktivních látek a mechanismu antimikrobiálního účinku na mikroorganismy
- 2) stanovení a charakterizace aktivních látek z vybraných částí rostlin
- 3) návrh a testování kosmetického výrobku proti akné s obsahem aktivních látek

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Adéla Alexová
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je stanovení vybraných aktivních látek z různého rostlinného materiálu a možnost jejich aplikace do kosmetického výrobku určeného proti akné.

V teoretické části je vypracovaný přehled aktivních látek, včetně jejich účinků v kosmetických přípravcích. Dále je práce zaměřena na charakteristiku vybraných druhů rostlin, mechanismy antimikrobiálních účinků, vznik a léčbu akné.

V rámci experimentální části této práce jsou charakterizovány extrakty z vybraných druhů rostlin, konkrétně květy levandule lékařské, heřmánku pravého, měsíčku lékařského a hřebíčkovce kořeného, nat' šalvěje lékařské a listy rozmarýnu lékařského. Extrakty jsou testovány na obsah biologicky aktivních látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity. Rostlinné extrakty jsou také testovány v různých směsích. Extrakty a směsi jsou zapracovány do receptur kosmetických výrobků proti akné. Je sledován jejich inhibiční účinek proti *Propionibacterium acnes*, způsobující akné a také proti zástupcům G^+ , G^- a kvasince - *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že nevhodnější je používat micelární vodu, případně pleťová mléka. Kosmetické výrobky obsahující hřebíček, heřmánek a rozmarýn mají největší množství účinných látek. U kosmetických výrobků je celkový účinek aktivních látek nižší, než u 100% extraktů.

Abstract

The aim of the bachelor thesis is a determination of selected active substances of various plants and their possible application in cosmetic products for acne.

In the theoretical part, an inventory of active substances including their effects in cosmetic products has been developed. Furthermore, the work is focused on characteristics of certain types of plants, mechanisms of antimicrobial effects and the emergence and treatment of acne.

In the experimental part of this work the contents of biologically active substances, antioxidant and antimicrobial activity in extracts from selected plant species are characterized, namely from flowers of *Levandula angustifolia*, *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis*, *Syzygium aromaticum*, leaves of *Salvia officinalis* and leaves of *Rosmarinus officinalis*. The plant extracts are also tested in different mixtures. Plant extracts and mixtures are incorporated into a recipe of acne cosmetic products. Their inhibitory effect against *Propionibacterium acnes* which causes acne and against representatives G^+ , G^- and yeast - *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Candida glabrata* is observed.

From the results it is clear that the best products against acne are micellar water and possibly skin lotion. The biggest amount of active substances is in cosmetic products which contain *Matricaria*, *Syzygium* and *Rosmarinus*. Overall effect of active substances is lower in cosmetic products than in 100% extracts.

Klíčová slova

Antimikrobiální látky, aktivní látky, akné, kosmetika, *Propionibacterium acnes*

Key words

Antimicrobials substances, active substances, acne, cosmetics, *Propionibacterium acnes*

ALEXOVÁ, Adéla. Antimikrobiální látky rostlin a jejich využití v přípravcích proti akné [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-18]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113479>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Hároniková.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Andrei Háronikové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich trpělivost a podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Hlavní zdroje přírodních látek.....	6
2.1.1 Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	6
2.1.2 Levandule lékařská (<i>Levandula angustifolia</i>)	6
2.1.3 Měsíček lékařský (<i>Calendula officinalis</i>)	7
2.1.4 Rozmarýn lékařský (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	8
2.1.5 Heřmánek pravý (<i>Matricaria chamomilla</i>)	8
2.1.6 Šalvěj lékařská (<i>Salvia officinalis</i>)	9
2.2 Přírodní látky.....	10
2.2.1 Antioxidanty.....	10
2.2.2 Přírodní antioxidanty	10
2.2.3 Přírodní polyfenolické sloučeniny	10
2.3 Charakteristika vybraných skupin přírodních látek	11
2.3.1 Terpeny	11
2.3.2 Polyfenoly	11
2.3.3 Flavonoidy.....	11
2.3.4 Esenciální oleje.....	11
2.4 Charakteristika aktivních látek studovaných rostlinných druhů.....	12
2.4.1 Eugenol	12
2.4.2 Borneol.....	12
2.4.3 Limonen	12
2.4.4 Thujon	13
2.4.5 Azulen	13
2.4.6 Bisabolol.....	13
2.4.7 Chamazulen.....	13
2.4.8 Myrcen	14
2.4.9 Citronellol.....	14
2.4.10 Kafr	14
2.4.11 Kamfen	15
3 MECHANISMUS ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ NA MO	16
3.1 Použité mikroorganismy	16
3.1.1 <i>Propionibacterium acnes</i>	17
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	17
3.1.3 <i>Micrococcus luteus</i>	18
3.1.4 <i>Candida glabrata</i>	18

4	AKNÉ	19
4.1	Léčba akné	19
4.2	Léčivé přípravky proti akné.....	20
5	METODY	21
5.1	Extrakce	21
5.2	Spektrofotometrie.....	21
5.3	Jamkový diluční test.....	21
5.4	Emulze	22
5.4.1	Emulze typu O/V	22
5.5	Testace	22
5.6	INCI.....	23
6	CÍL PRÁCE	24
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
7.1	Chemikálie, použité přístroje a materiál.....	25
7.1.1	Chemikálie.....	25
7.1.2	Přístroje.....	26
7.1.3	Materiál.....	26
7.2	Charakterizace přírodních extraktů	27
7.2.1	Stanovení celkových polyfenolů	27
7.2.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	27
7.2.3	Stanovení antioxidační aktivity	28
7.2.4	Příprava kosmetických emulzí.....	28
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
8.1	Celkové polyfenoly a flavonoidy	31
8.2	Antioxidační aktivita.....	33
8.3	Vyhodnocení antimikrobiálních testů	34
8.4	Vyhodnocení antimikrobiálních účinků extraktů v hotových přípravcích.....	37
9	ZÁVĚR	39
10	LITERATURA	40
11	SEZNAM ZKRATEK	45

1 ÚVOD

K využívání rostlin pro jejich léčivé účinky docházelo již v prehistorických dobách. Používaly se různé druhy rostlin a preparátů, kterými se léčila různá onemocnění, a zároveň se začaly vytvářet základy kosmetiky spojené s hygienou. Díky zkušenostem děděným z generace na generaci postupně vznikaly léčebné systémy. První zmínky o používání léčebných rostlin sahají až do období pravěku. Mezi velmi komplexní systém využívající léčivé rostliny patří staroindická Ajurvéda a také tradiční čínská medicína. Využitím léčebných vlastností rostlin se zabývá fytotherapie. Při fytoterapii jsou k léčbě používány především bylinky, jako je heřmánek, bazalka a levandule. Dále se v omezené míře využívají i řasy a houby. Fytotherapie bývá označována jako druh alternativní medicíny a v porovnání s širokým spektrem syntetických léčiv si stále drží své místo v medicíně. Získání antimikrobiálních látek z rostlin může sloužit jako alternativa antibiotik a stát se řešením v boji proti rezistentním bakteriím. Předložená práce je zaměřena na aktivní látky ve vybraných druzích rostlin a následné aplikaci v kosmetických produktech proti akné. Podrobněji se zabývá vznikem a léčbou akné a s ním spojenou *Propionibacterium acnes*. Rostliny produkují široké spektrum sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Tyto látky různými mechanismy působí inhibičně na růst a reprodukci mikroorganismů a jsou důležitým prvkem ochrany rostlin vůči mikrobiálním infekcím. Některé rostliny a jejich produkty jsou pro silné antibakteriální účinky lidmi přímo využívány v medicíně a potravinářství. Mechanismus účinku těchto látek je odvozen od jejich chemické struktury. Obecně však mají vlastnosti, kterými narušují funkce buněčných struktur bakterií [1, 2, 3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hlavní zdroje přírodních látek

2.1.1 Hřebíčkovec kořený (*Syzygium aromaticum*)

Jedná se o sušená, nerozvinutá poupata stálezeleného stromu hřebíčkovce vonného, která tvoří známé koření, pocházejícího původně z Moluckých ostrovů v Indonésii a afrického Zanzibaru. Ve středověku bylo do Evropy dováženo arabskými obchodníky. Zelená či lehce načervenalá poupata obsahují nejvíce aromatických látek a sbírají se dvakrát ročně. Poté se několik dní suší na slunci až do zhnědnutí a do ztráty dvou třetin své váhy. Hřebíček je díky svému výraznému aroma přidáván do aromatických směsí. Hřebíčkové silice obsahují fenolickou sloučeninu eugenol, a to až z 90%. Eugenol má lokálně-anestetické a antiseptické účinky, používá se často v zubním lékařství a přidává se do ústních vod [4, 5, 6].

Hřebíček má nasládlou chuť, která často přechází do chutě hořké. Léčivé účinky éterických olejů hřebíčku působí antisepticky a analgeticky. Hřebíček pomáhá i při nachlazení, působí protizánětlivě a ničí choroboplodné zárodky. Používá se také do mastí proti revmatismu, kde tiší bolest. Nesmí se však nanášet na kůži v nezředěném stavu! Čím dál více nachází své uplatnění i jako odpuzovač hmyzu [4, 5, 6].



Obr. 1: Hřebíček [7]

2.1.2 Levandule lékařská (*Levandula angustifolia*)

Jedná se o aromatickou a léčivou rostlinu patřící do čeledi hluchavkovitých. Levanduli můžeme najít na suchých vápnitých nebo vysluněných svazích. Doba sběru květů se pohybuje v období od června do července. Původně jsme ji mohli najít jen v západním Středozeří, nyní se však pěstuje v mnoha zemích jižní Evropy. Největší rozšíření má v jihovýchodní Francii v oblasti Provence. Nacházejí se zde celé plantáže voňavé levandule. Pěstování levandule je zde spojené s kosmetickým průmyslem a cestovním ruchem. Vyrábí se z ní parfémy a mýdla. Místní muzea a továrny na zpracování levandule jsou oblíbenou destinací turistů [4, 8].

Velký význam má také jako tradiční léčivá a aromatická rostlina. Obsahuje třísloviny, kumarin, kyselinu ursolovou a rozmarýnovou a v neposlední řadě silice jako jsou geraniol, borneol, cineol, linaliacetát a linaol. Všechny tyto látky působí fytoncidně. Fytoncidy jsou fyziologicky velmi účinné látky v pletivech některých druhů rostlin (cibule, česnek, křen aj.), které jsou toxické pro bakterie, houby a prvoky. Levandule se dá pěstovat i v České republice, má ale slabší účinky. Nálev z květu zklidňuje nervový systém, navrácí rovnováhu při psychosomatických potížích a léčí migrénu. Levandule se přidávala do koupelí již od antiky, pomáhá zmírňovat revmatické bolesti a léčí nespavost. Květ levandule se pro své zklidňující

účinky přidává do směsí bylinek, které se používají při bolesti hlavy, nespavosti, nervozitě a závratích. Olej z levandule se používá při masážích, pomáhá tak zmírňovat revmatickou bolest a má povzbuzující účinek pro tělo. V kosmetice se přidává do parfémů a vonných olejů. Své uplatnění má však i v kuchyni. A to především ve Francii, Španělsku a Itálii, kde je jednou ze součástí provensálského koření. Podle některých studií vůně levandule v pracovních prostorách zvyšuje produktivitu práce [4, 8].



Obr. 2: *Levandule lékařská* [9]

2.1.3 Měsíček lékařský (*Calendula officinalis*)

Měsíček lékařský patří do čeledi hvězdčovitých. Doba sběru květů se pohybuje v rozmezí mezi květnem až červencem. Jedná se o léčivou rostlinu původem z jihu Evropy a Orientu, kde roste na loukách a štěrkošitích. Pěstuje se jako letnička používaná pro výsadbu na záhony a k řezu květů. Obsahuje karoteny, silice, slizové látky, saponiny, kalendulin (žluté barvivo), kyselinu oleanolovou a vitamin C [4, 10].

Měsíček pomáhá při nejrůznějších vnitřních zánětech: zánět jícnu, zánět střev, dvanácterníku, žaludku, včetně žaludečních vředů. Měsíček má též kancerostatické (protinádorové) působení, zvláště na žaludek a vnitřní orgány. Při vnějším použití se hodí zejména na záněty, špatně se hojící rány, křečové žíly, hemoroidy. Velmi účinný je měsíčkový olej. Z měsíčku se s oblibou dělá i měsíčková mast. Měsíček nemá žádné vedlejší účinky. Měsíček či olejové výtažky z něj se uplatňují v krémech na rozpraskané ruce i paty, na popáleniny a omrzliny. Krém z měsíčku působí proti vráskám. Využívá se hlavně jeho protizánětlivých a hojivých vlastností a je součástí mnoha antihistaminik [4, 10].



Obr. 3: *Měsíček lékařský* [11]

2.1.4 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)

Rozmarýn lékařský je známý také jako rozmarýna lékařská. Jedná se o stálezelenou léčivou rostlinu z čeledi hluchavkovitých, keřovitého vzrůstu. Jméno této silně aromatické rostliny pochází z latinského *ros* (rosa) a *mare* (moře) tedy „mořská rosa“. Rozmarýn je stálezelený až 2 m vysoký výrazně vonící keř vyskytující se na teplých a slunných místech. Doba sběru listů a kvetoucí natě je možná po celý rok. Původně se pěstoval především ve Středomoří. Nyní je však rozšířen také v Anglii, Mexiku, USA a téměř po celé střední a východní Evropě. V Evropě je možné ho pěstovat i doma, a to na slunném místě. Dováží se z Itálie, Španělska, Francie a Albánie. Obsahuje silice, flavonoidy a fenolové kyseliny, včetně kyseliny rozmarýnové. V kuchyni se využívá jako koření. Zpracovávají se jeho listy, které mají jehličkovitý vzhled. Používá se čerstvý, sušený, celý nebo drcený [4, 5, 12].

Rozmarýn má antiseptické, protikřečové, tonizační účinky a zklidňuje bolest. Dá se jím snížit krevní tlak, zmírňuje problémy s trávením a nadýmáním. Jako mast hojivě působí na kloubní revmatismus, podvrtnutí, zhmožděnin a kožní vyrážky. Jeho silice získané destilací se využívají v kosmetice a parfumerii jako přísady do mýdel, šamponů a vod po holení. Kontraindikací je fakt, že éterické oleje z rozmarýnu nesmějí používat těhotné ženy a osoby trpící epilepsií. Alergie na obsažené látky mohou způsobit vyrážku a zarudnutí pokožky. Rozmarýn je již od starověku symbolem manželství [4, 5, 12].



Obr. 4: Rozmarýn lékařský [13]

2.1.5 Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*)

Heřmánek pravý je léčivá rostlina z čeledi hvězdnicovitých. Doba sběru květů se pohybuje v rozmezí mezi červencem až srpnem. Je poměrně hojný na neobdělávaných suchých místech. Heřmánek je rozšířen v Severní Americe, Evropě i Asii. Obsahuje silice, azulen, apigeniny, hořčiny a slizové látky. Heřmánek se hojně využívá v kosmetice a léčitelství [4, 12].

Z heřmánku se dá udělat čaj, nálev, či obklad. Využívá se k léčbě zánětů a uvolnění křečí. Využívá se i v případě zánětu ústní dutiny, očních spojivek, střevních a žaludečních potíží a pomáhá při léčbě žaludečních vředů. Nevýhodou je, že může způsobovat alergické reakce. Jako čaj ho hojně využíváme při nachlazení a zánětu horních cest dýchacích. Je možné ho podávat i kojencům, proto jej dost často najdeme v dětských kapičkách. Nálev z heřmánku se využívá k omývání vlasů a obličeje, které získávají na vzdušnosti a lesku [4, 14].



Obr. 5: *Heřmánek pravý* [15]

2.1.6 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Šalvěj lékařská je léčivá rostlina patřící do čeledi hluchavkovitých. Vyskytuje se na slunných místech s dobře propustnou půdou. Sběr listů je možný po celý rok a sběr kvetoucí natě je omezen na období mezi květnem až červencem. Obsahuje silice, pryskyřice, taniny, estrogenní látky, flavonoidy, kafr, bakteriostatické látky a thujon. Právě díky thujonu, který je mírně jedovatý, se šalvěj nesmí používat vnitřně ve velkém množství [4, 16].

Šalvěj se používá v léčitelství pro své protizánětlivé, antivirotické a antimikrobiální účinky a mírní průjmy. Sáhnete pro ni při problémech se zažíváním a nadýmáním. Jako potravina či čaj snižuje problémy spojené s menopauzou, léčí úzkostné stavy, depresi a vyčerpání. Jako obklad působí proti bolákům, zhmožděninám a ránám po bodnutí hmyzem. Konzumace květu šalvěje je bohužel naivně využívána při alternativních léčbách různých druhů rakoviny. V případě požití vyšší dávky, případně pokud dojde ke kombinaci s alkoholem, může působit toxicky. Není však známo mnoho případů, kdy k otravě opravdu došlo. Avšak z pohledu využití šalvěje jako léčiva, potraviny nebo esenciálního oleje je třeba brát v potaz fakt, že při vysokých dávkách může dojít k poškození jater. V kosmetice se šalvěj využívá pro své dezinfekční a stahující účinky. Jako pleťová voda bojuje proti akné. Výtažek ze šalvěje je přidáván do zubních past. Při tření čerstvých listů o zuby má bělicí účinky [4, 16].



Obr. 6: *Šalvěj lékařská* [17]

2.2 Přírodní látky

2.2.1 Antioxidanty

Jedná se o molekuly, které v malých koncentracích chrání. Doplňky s antioxidačně působícími látkami se staly zájmem milionů lidí, a to především z obav před negativním působením volných radikálů kyslíku a dusíku. Zajišťují ochranu buněk a jejich struktur před nežádoucím působením těchto radikálů a podílejí se na eliminaci účinků tzv. oxidačního stresu v živočišných i rostlinných buňkách. Tělo se sice před volnými radikály dokáže bránit, ale pokud nastane nerovnováha mezi množstvím volných radikálů a antioxidační kapacitou, je potřeba využít právě pomoc antioxidantů. Tyto látky pak mohou být buď přímo syntetizovány v těle, nebo jsou přijímány v potravě [1, 2, 18].

2.2.2 Přírodní antioxidanty

Přírodní antioxidanty jsou syntetizovány v rostlinách a zastávají v nich celou řadu nezastupitelných funkcí, ať už se jedná o obranu před jinými živočichy (hořká chuť rostlin) nebo naopak o schopnost přilákat opylovače (pestrobarevnost některých antioxidantů) nebo ochranu před infekcí viry a bakteriemi (antimikrobiální a antivirové vlastnosti). Mnoho látek rostlinného původu má antioxidační vlastnosti, z nichž nejznámější je účinek kafru a thujonu. Právě pro tyto jejich vlastnosti jsou přírodní antioxidanty v dnešní době intenzivně zkoumány. Přírodní antioxidanty lidský organismus získává potravou hlavně z ovoce, zeleniny, obilovin, a léčivých rostlin [1, 18, 19, 20, 21].

V roce 2010 publikoval časopis Nutritional Journal přehlednou databázi o výskytu antioxidantů ve více jak 3000 druzích potravin, nápojů, bylin a koření. Nejvíce antioxidantů obsahují bylinky, koření a ořechy. V současnosti se do popředí zájmu mnoha odborníků, právě díky možné antioxidační terapii, dostávají hlavně rostlinné polyfenoly [21].

2.2.3 Přírodní polyfenolické sloučeniny

V rostlinách bylo doposud identifikováno několik tisíc látek fenolické povahy s ohromnou rozmanitostí struktur. Jedná se o nejrozšířenější třídu metabolitů v přírodě a jejich distribuce je tedy všudypřítomná. Tyto polyfenolické sloučeniny jsou v rostlině syntetizovány a dále modifikovány v jedné z větví fenyylpropanoidové dráhy. Tato dráha je klíčovou metabolickou drahou vedoucí k tvorbě důležitých metabolitů. Jsou to například flavonoidy, stilbeny, kumariny aj. Jejich klíčovou rolí je ochrana rostliny před ultrafialovým zářením a atakem agresivních patogenů [1, 18, 20, 21].

2.3 Charakteristika vybraných skupin přírodních látek

2.3.1 Terpeny

Jedná se o významnou a obsáhlou skupinu metabolitů vytvářených všemi vyššími rostlinami. Chemická struktura terpenů je odvozena od jejich základní jednotky – isoprenu. V organismech jsou syntetizovány postupnou kondenzací jejich prekurzorů, isopentenylu-PP a dimethylallylu-PP. Kyslíkaté a jiné deriváty terpenů jsou označovány jako terpenoidy či isoprenoidy. Terpeny a terpenoidy jsou hlavními složkami rostlinných pryskyřic a esenciálních olejů. Jejich antimikrobiální aktivita vychází z výrazně lipofilního charakteru těchto látek. Dochází k jejich difuzi v plasmatických membránách, následnému zvýšení jejich permeability a poté k narušení funkcí makromolekul vedoucím až k lýzi buněk [1, 2, 18].

2.3.2 Polyfenoly

Jako antioxidační látky se také významně uplatňují polyfenoly. Jedná o látky, které mají ve své molekule dvě nebo více -OH skupin, které jsou navázány na aromatické jádro. Polyfenoly se objevují u všech rostlin. U každé z rostlin mají však rozličné funkce, jako jsou například ochrana před UV zářením, patogeny, oxidačním stresem a dalšími. Příkladem mohou být taniny a lignany. Taniny chrání rostlinu před požíváním od býložravců. Lignany tvoří mechanické výztuhy těl rostlin. Polyfenoly v lidském organismu zastupují širokou škálu biologických účinků [18].

V současné době známe kolem 8 000 druhů polyfenolů, které dělíme na základě jejich chemické struktury. Ta je velmi různorodá. Jedná se o jednoduché sloučeniny, které jsou tvořeny jedním aromatickým kruhem nebo složité, které jsou vysoce polymerní. Takovou skupinou jsou již zmíněné taniny. Klasifikace polyfenolů je možná do deseti tříd. Nejzákladnější rozdělení je na nonflavonoidy a flavonoidy. Nejvyšší obsah polyfenolů je v černém rybízu, ječmeni, čiroku, ale také v červeném víně [18, 20].

2.3.3 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří širokou skupinu látek produkovaných rostlinami. Slouží především jako rostlinné pigmenty převážně žlutých, červených a modrých barev. Významné je i jejich antimikrobiální působení. Specifické flavonoidy mohou být rostlinou produkovány jako odpověď na infekci jako takzvané fytoalexiny. Fytoalexiny jsou nízkomolekulární antimikrobiální látky, které jsou syntetizovány a akumulovány v rostlinách po napadení mikroorganismy. Slouží rostlinám jako aktivní obranné látky, postinfekční metabolity rostliny. Strukturně jsou odvozeny od fenylypropanoidů. V molekule obsahují základní strukturu složenou z 2-fenyl- (flavony) či 3-fenyl 1,4-benzopyronu (isoflavony), často vícenásobně hydroxylovanou (např. 3-OH flavony se označují jako flavonoly). Mechanismus působení je obdobný jako u fenolických látek a chinonů. Flavonoidy se mohou vázat na povrchové proteiny mikroorganismů a narušit tím jejich funkce [1, 2, 18, 21].

2.3.4 Esenciální oleje

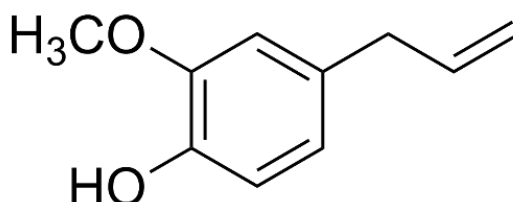
Pojem esenciální olej označuje směs hydrofobních látek oddělených z rostlinného materiálu pomocí parní destilace či extrakce. Mezi hlavní složky patří těkavé terpeny a terpenoidy s nižší molekulovou hmotností, které jsou zodpovědné za výrazné aroma rostlin. Kromě chemických a antibakteriálních vlastností terpenů mají některé látky klasifikované jako esenciální oleje také vlastnosti fenolů a to díky hydroxylovaným aromatickým kruhům. Takovými látkami jsou např.

thymol z esenciálních olejů hluchavkovitých rostlin či eugenol, který je hlavní složkou esenciálního oleje hřebíčku [1, 19, 22].

2.4 Charakteristika aktivních látek studovaných rostlinných druhů

2.4.1 Eugenol

Eugenol je organická sloučenina, derivát 2-methoxyfenolu s allylovým řetězcem místo jednoho z vodíků na benzenovém jádře. Jeho struktura je zobrazena na obr. 7. Eugenol se přirozeně vyskytuje v esenciálních olejích hřebíčku, kde tvoří až 90% zastoupení všech látek. Dále ho nalezneme v bazalce a skořici. A právě díky své výrazné hřebíčkové vůni a hojivým účinkům se přidává do kosmetických přípravků. Jedná se o výborný antioxidant a konzervant se silnými analgetickými schopnostmi, je antiseptický, antibakteriální a protizánětlivý. Eugenol se dá připravit i synteticky. Kontraindikací je, že se jedná o silný alergen, který může způsobit silnou vyrážku a podráždění, proto se musí podávat vždycky ředěný. Také se nedoporučuje užívat vnitřně, hrozí předávkování a poškození jater. Smrtelná dávka eugenolu je 1930 mg/kg, proto se ho rozhodně nedoporučuje užívat perorálně. Kromě parfémů ho můžeme najít také v repelentech proti hmyzu [23].



Obr. 7: Chemická struktura eugenolu [24]

2.4.2 Borneol

Borneol se nachází v šalvěji lékařské nebo rozmarýnu lékařském. Jedná se o bicyklickou organickou sloučeninu a derivát terpenů. Existují dva různé enantiomery s příměsí borneolu. Směsi + i – se nacházejí v přírodě. Borneol snadno oxiduje na keton (kafr). Borneol své uplatnění našel v čínské medicíně zvané Moxa. Moxa je tradiční čínská léčebná metoda, která za pomoci přehřívání akupunkturálních bodů stabilizuje vegetativní nervy a zvyšuje obranyschopnost organismu. Tato terapie probíhá za pomoci spalování sušených rostlin pelyňku černobílého. Borneol je součástí mnoha esenciálních olejů. Dále se nachází v přírodních repelentech. Jeho negativní vlastností je to, že dráždí oči, kůže a v případě požití je zdraví škodlivý [25, 26].

2.4.3 Limonen

Limonen se přirozeně vyskytuje v mnoha rostlinách a chemicky se jedná o látku podobnou alkoholu. Má dvě formy, L-Limonen a D-Limonen. L-Limonen se nachází v silicích u borovice nebo máty peprné. D-Limonen má sladší citronovou vůni, a proto se používá v parfémeh, lécích i ochucovadlech. Právě díky své vůni dokáže maskovat přirozený zápach neparfémovaných složek. Najdeme ho v růžích, levanduli či citronové kůře. A stejně jako eugenol se dá připravit i synteticky. Stále častěji se používá jako rozpouštědlo pro čištění či biopalivo. Přestože je limonen protizánětlivý a inhibuje růst hub a kvasinek, může dráždit kůži a dýchací cesty [27].

2.4.4 Thujon

Thujon je ve formě bezbarvého oleje neurotoxický jed. Má podobné aroma jako mentol. K oddělení aktivní látky od přírodních olejů může být využit hydrosíran nebo můžeme využít metody frakční destilace, krystalizace, popřípadě může být syntetizován. V přírodě se thujon vyskytuje ve dvou formách. Levotočivý alfa-thujon se vyskytuje v šalvěji a túji a pravotočivý beta-thujon v pelyňku [28].

Do našeho podvědomí se dostal především proto, že je aktivní látkou v pelyňku, který je jednou z bylin, ze kterých se vyrábí alkoholický nápoj absint. Jeho neurotoxické vlastnosti se mohou projevit otravou, křečemi, poškozením ledvin a jater. Thujon podaný ve vysoké dávce působí na tělo omamně. Při konzumaci velkého množství šalvěje může dojít k předávkování, které je doprovázeno zimnicí, návaly horka, třesem, nevolností a v extrémním případě ztrátou vědomí. Protože thujon se ve vodě neuvolňuje zdaleka tolik, jako v alkoholu, pak nálev a čaj při střizlivém dávkování a používání nemá tyto nežádoucí toxické účinky [28].

2.4.5 Azulen

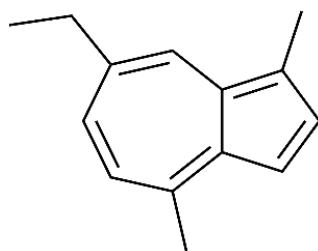
Je organická sloučenina, která je izomerem naftalenu. Svě jméno získal ze španělského slova azul, což znamená modrý. Na rozdíl od bezbarvého izomerního naftalenu je tmavě modrý. Chemická kostra azulenu je složena ze dvou terpenů. Tyto terpeny se nachází v přírodě jako součást barviv některých hub druhu *Lactarius indigo*, v olejích získávaných ze stromu guajakové dřevo, ale i v dalších rostlinách jako heřmánek pravý nebo hřebíček obecný. Azulen má protizánětlivé a zklidňující účinky a je hojně využíván ve farmacii. Je součástí mnoha mastí, gelů nebo krémů a využívá se i jako složka do výrobků šetrných k dětské pokožce [29].

2.4.6 Bisabolol

Bisabolol je hlavní složkou, kterou najdeme v esenciálním oleji heřmánku pravého. Jedná se o bezbarvou kapalínu, která má jemnou květinovou vůni. Je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v alkoholech. V kosmetice jej najdeme jako hlavní složku vonných silic, které napomáhají k lepšímu vstřebávání látek do pokožky. Na pokožku má blahodárné účinky, protože ji zjemňuje, zklidňuje, regeneruje a snižuje její citlivost. Jeho zjemňující a posilující účinky se využívají i v šamponech a vlasových kondicionérech. Bisabolol nezpůsobuje alergie a nemá žádný negativní vliv na zdraví člověka [30].

2.4.7 Chamazulen

Je intenzivně modrá látka obsažená v silicích heřmánku a pelyňku. První zmínka o modré látce z heřmánkového oleje pochází již z roku 1863 od anglického chemika Septima Piesse, ale jeho struktura byla objasněna až v roce 1953. Je znám pod chemickým vzorcem 7-ethyl-1,4-dimethylazulen (viz obr. 8). Modré zbarvení vzniká v průběhu extrakce a destilace, takže azulen není ve skutečnosti v heřmánku přítomen. Má protizánětlivé účinky na kůži a sliznici, a proto je vedle bisabololu a matricinu jednou z hlavních účinných látek v heřmánkových olejích. Heřmánkový olej je pravděpodobně jedním z nejčastějších přírodních prostředků. Patří mezi nejčastěji používané oleje. Jeho účinek je založen na směsi látek, jako jsou flavonoidy, terpeny nebo deriváty terpenů. Naneštěstí bylo u chamazulenu zjištěno, že při vysokých dávkách způsobuje respirační onemocnění [31].



Obr. 8: Chemická struktura chamazulenu [32]

2.4.8 Myrcen

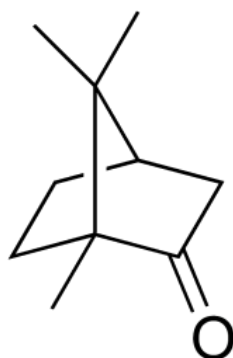
Myrcen se vyskytuje v borovici, jalovci, šalvěji, konopí nebo pelyňku. U myrcenu byly prokázány silné protizánětlivé účinky. Funguje také jako sedativum a svalový relaxant, což naznačuje, že by mohl být částečně zodpovědný za únavu a omámení způsobované odrůdami indica. Jeho chemická struktura je 7-methyl-3-methylen-1,6-oktadien. Jedná se o trojnásobně nenasycený acyklický monoterpénový uhlovodík, který je součástí mnoha silic. Myrcen je hojně využíván v parfumerii a farmaceutickém průmyslu [33].

2.4.9 Citronellol

Citronellol patří mezi přirozeně se vyskytující látky v mnoha rostlinách, jako jsou geranium, heřmánek, bazalka nebo levandule. Citronellol má sladkou dlouhotrvající vůni podobnou vůni růže. Je přirozenou součástí esenciálních olejů a pomáhá maskovat přirozený zápach neparfémovaných složek v kosmetických přípravcích. V přírodní kosmetice se vyskytuje jako součást esenciálních olejů. Je součástí repelentů a jedná se o výborný odpuzovač komárů. Americký úřad pro kontrolu léčiv sice považuje citronellol za bezpečný co se použití v potravinářství týká, ale je o něm známo, že může způsobovat alergie a zvyšovat citlivost pokožky. A právě z těchto důvodů je jeho používání v parfumerii a kosmetice částečně omezeno [34].

2.4.10 Kafr

Je přírodní látka získávána původně ze dřeva stromu kafrovníku. Kafrovník je druh skořicovníku původem z Číny, z jehož dřeva, kořenů, kůry a listů se destilací získávají obsažené silice a vzniká tak esenciální olej. Z chemického hlediska se jedná o 1,7,7-trimethylbicyklo [2.2.1] heptan-2-on (obr. 9). Využití nachází v aromaterapii, léčitelství a parfumerii. Má výraznou osvěžující vůni, inhalací se zlepšuje koncentrace, nálada i příznivě působí na dýchací cesty. Má silné prokrvující i dezinfekční účinky, posiluje imunitu a je protivirový. Díky tomu je vhodný na proleženiny, pomáhá hojit rány, léčí opary i střevní infekce a uvolňuje svalovou tenzi. Mimo jiné také funguje jako repelent. Na pokožku se nesmí používat neředěný, mohl by způsobit silné podráždění [35].



Obr. 9: Chemická struktura kafry [36]

2.4.11 Kamfen

Kamfen je přírodní uhlovodík nacházející se v mnoha esenciálních olejích. Jedná se o krystalickou pevnou látku s vůní kafry. Je prakticky nerozpustný ve vodě, ale snadno rozpustný v organických rozpouštědlech. Existují dva enantiomery, L a D. Při pokojové teplotě rychle sublimuje. Je přirozenou součástí mnoha esenciálních olejů. Krystalická forma byla izolována například ze silic smrku, některých druhů kopretin, zázvoru, pomeranče a citronu. Kamfen se používá jako vůně pro maskování zápachu. V polovině devatenáctého století se používal jak palivo pro lampy, jeho nevýhodou byla výbušnost. Kamfen se kromě parfumerie využívá i ve farmacii. Je součástí léků při onemocnění jater, ve kterých je prostředek uveden pod jeho latinským jménem camphenum [37].

Souhrn a stručný přehled předcházející kapitoly nalezneme v tab. 1: Významné rostliny produkující esenciální oleje.

Tab. 1: Významné rostliny produkující esenciální oleje

Čeľad'	Latinský název	Český název	Aktivní látky	Část rostliny
Lamiaceae	Levandula angustifolia	levandule lékařská	borneol, citronellol	květ
Lamiaceae	Salvia officinalis	šalvěj lékařská	borneol, thujon, salviol, kafr, cineol	nať
Lamiaceae	Rosmarinus officinalis	rozmarýn lékařský	borneol, citronellol, kafr, limonen, kamfen, cineol	list
Asteraceae	Matricaria chamomilla	heřmánek pravý	azulen, bisabolo, geraniol, thujon, chamazulen, myrcen,	květ
Asteraceae	Calendula officinalis	měsíček lékařský	kalendulosid, karotenoidy	květ
Myrtaceae	Syzygium aromaticum	hřebíčkovec kořený	eugenol	květ

3 MECHANISMUS ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ NA MO

Antimikrobiální látky neboli bakteriociny jsou látky peptidové povahy, které produkují G^+ i G^- bakterie. Primární efekt antimikrobiálních látek je bakteriostatický či baktericidní. U bakteriostatických tyto látky způsobí pouze zastavení množení bakterií. U baktericidních jsou bakteriální buňky usmrceny pomocí různých druhů mechanismů. Inhibice syntézy buněčné stěny probíhá například pomocí penicilínu, teikoplaninu nebo cykloserinu. Problém je v tom, že každá buněčná stěna má rozdílné složení. Liší se u stěn eukaryot, prokaryot, gram pozitivních i gram negativních bakterií [38, 39].

Druhým z mechanismů je poškození syntézy cytoplazmatické membrány. Dojde k narušení bariéry, narušení osmotické stability bakteriální buňky a ovlivňuje syntézu nukleových kyselin a buněčné stěny. Příkladem takto působící látky jsou například polypeptidy, které působí na fosfolipidickou část cytoplazmatické membrány a narušují její propustnost. Dojde tedy ke ztrátě selektivní permeability a integrity. Jejich účinek je však pouze na membrány G^- bakterií. Dalším příkladem látky je tyrotricin, který má účinek rozšířen i na G^+ bakterie a houby [38, 39].

Inhibice proteosyntézy je dalším z příkladů mechanismu působení látek. Zástupcem jsou aminoglykosidy. Aminoglykosidy jsou do těl bakterií přijímány prostřednictvím aktivního transportu. Atakují 30S ribozomální podjednotku, způsobují chybné čtení genetické informace, a tím vznik defektních proteinů. Na rozdíl od aminoglykosidů, amfenikoly působí na 50S podjednotku a mají účinek na enzym, který přenáší rostoucí řetězec AK a blokuje napojení komplexu $tRNA^+$ [38, 39].

Čtvrtým z mechanismů je porucha syntézy nukleových kyselin. Mezi takto působící látky patří chinolony, které účinkují prostřednictvím vazby na komplex DNA a DNA gyrázy. To vede k zábraně replikace bakteriálního chromozomu tím, že narušuje prostorovou strukturalizaci DNA. Dalším zástupcem je novobicin, který má úplně odlišný účinek než chinolony. Dochází zde ke kompetitivní inhibici ATP na ATP vazebném místě DNA GyrB a ParE [38, 39].

3.1 Použité mikroorganismy

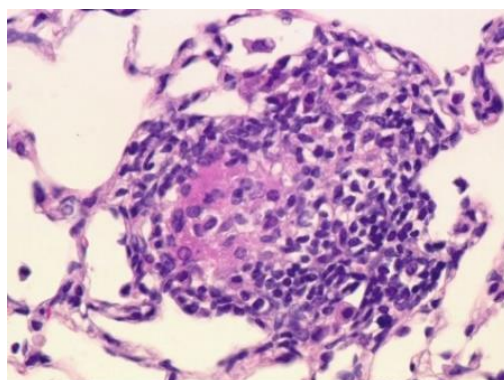
Antimikrobiální aktivita rostlin byla zkoumána na vybraných modelových bakteriích a kvasinkách. Výběr byl zvolen tak, aby se jednalo jak o gram negativní, tak o gram pozitivní zástupce. Bakterie jsou jednobuněčné, prokaryotické mikroorganismy s velice specifickým metabolismem. Právě díky němu se rychle rozmnožují a rostou. Velkou roli hraje jejich buněčná stěna, která tvoří ochranný obal před chemickým a mechanickým poškozením, udržuje stálý osmotický tlak, tvar a zabraňuje vysychání [40].

Podle struktury buněčné stěny dělíme bakterie podle Gramma na gram pozitivní (G^+) a gram negativní (G^-). U G^+ bakterií je buněčná stěna tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, jež je prostoupen kyselinou teichoovou. Buněčná stěna G^- bakterií je složitější a tenčí. Nad peptidoglykanem se nachází ještě dvojvrstva fosfolipidů a bílkovin. Vrstvy jsou vzájemně propojeny lipoproteiny a na horní straně membrány se nachází lipopolysacharidy [40].

Kvasinky patří mezi eukaryotní mikroorganismy. Často se využívají v potravinářství a biotechnologiích. Mají vejcovitý tvar a rozmnožují se buď vegetativně nebo pohlavně. Buňky kvasinek jsou tvořeny buněčnou stěnou, cytoplazmatickou membránou s cytoplazmou a dalšími buněčnými strukturami [40, 41].

3.1.1 *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes je bakterie, kterou běžně nalezneme v ústní dutině, na kůži i v tlustém střevě. Jedná se o pomalu rostoucí bakterii, která je typicky aerotolerantní, anaerobní a grampozitivní. Je spojena s výskytem akné, protože se vyskytuje převážně v mazových žlázách kůže. Tam produkuje vysoce aktivní lipázu, která hydrolyzuje triglyceridy v mazu. Vzniklé mastné kyseliny mohou lokálně dráždit. Může však způsobovat i další druhy infekcí. Své označení získala díky schopnosti produkovat kyselinu propinovou. *Propionibacterium acnes* patří mezi podmíněné patogeny s nízkou patogenitou jak pro člověka, tak i pro pokusná zvířata. Je možno rozlišit tři typy podle sérologických reakcí (typ I, II a III). Bakterii lze ničit pomocí antibiotik nebo antibakteriálními přípravky, například hřebíčkovým olejem. Další z možností je aplikace ultrafialového záření o vlnové délce 405–420 nm [41, 42, 43].



Obr. 10: *Propionibacterium acnes* [44]

3.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní, pohyblivá a nepigmentovaná bakterie. Má bičíky a fimbrie. Generační doba bakterie *Escherichia coli* žijící v intestinálním traktu zdravého jedince je 12 hodin, generační doba in vitro je asi 20 minut. *Escherichia coli* se nachází ve sliznici tlustého střeva a vyskytuje se tedy i ve stolici. Ve střevě pomáhá syntetizovat vitamín K, svojí přítomností zabraňuje ostatním patogenům v adherenci na povrch slizničního epitelu a inhibuje jejich růst syntézou kolicinů a mikrocinů. Slouží jako hlavní součást aerobní fyziologické střevní flory. Tyto bakterie mohou disponovat mnohými geny kódujícími faktory virulence. *Escherichia coli* je nejčastějším původcem primárních močových infekcí. Některé kmeny způsobují průjemová onemocnění [45, 46, 47, 48].



Obr. 11: *Escherichia coli* [49]

3.1.3 *Micrococcus luteus*

Jedná se o kulovitou, chemoorganotrofní grampozitivní kvasinku, obligátně s aerobním metabolismem. Vyskytuje se jako saprofyt v půdě, prachu či vodě. Je tolerantní vůči vyschnutí a vysokým koncentracím solí. U lidí napadá kůži, ústní dutinu, hltan a horní cesty dýchací. Objevuje se u lidí s oslabeným imunitním systémem [50].



Obr. 12: *Micrococcus luteus* [51]

3.1.4 *Candida glabrata*

Jedná se o haploidní kvasinku z rodu *Candida*. Do nedávna byla však považována za nepatogenní. Nyní představuje druhý nejčastější patogen v krevním oběhu v Severní Americe a je vysoce oportunní, což znamená, že za normálních okolností není pro člověka nijak nebezpečná. Ale pokud dojde k napadení imunitního systému nějakou nemocí např. AIDS, pak je schopná onemocnění vyvolat [52, 53, 54].



Obr. 13: *Candida glabrata* [55]

4 AKNÉ

Akné je zánětlivé chronické onemocnění mazových žláz a je jednou z nejčastěji se vyskytujících dermatologických poruch, se kterou se během života setká téměř každý. Nejčastěji se akné vyskytuje u dospívajících jedinců, zejména chlapců. Není výjimkou, že jím trpí i dospělí. Mezi nejvíce postižená místa patří obličej, ramena a záda. Nejčastějším projevem je tvorba vráždů a pupínků. Dále se však mohou objevit i cysty nebo neštovičky. Vznik těchto vráždů je způsoben zánětem vývodů mazových žláz a nahromaděním odumřelých buněk kůže, které ucpávají póry. Je to způsobeno tím, že rohové buňky mají zvýšenou přilnavost, což stěžuje jejich odlučování a blokuje uvolňování mazu na povrch kůže. A právě tato pevnost způsobuje tvorbu komedonu. Komendony vznikají při poruše vyzrání buněk vystylajících stěnu vývodu folikulu mazové žlázy na normální zrohovatělé buňky [45, 56, 57].

Opačným problémem je zvýšená tvorba mazu. Vzniká na základě zvýšené činnosti mazových žláz. Zde hrají svoji roli další negativní faktory, jako jsou dědičnost či hormonální aktivita. Ta je spojována s menstruačním cyklem a pubertou. Dalším důležitým faktorem je stres a psychická pohoda. V horších případech u těžkých zánětů mohou vznikat i jizvy, a to v důsledku poškození mazové žlázy. Mnohé studie prokázaly, že velký vliv na tvorbu akné má i strava. Mezi potraviny, které mohou podporovat tvorbu komedonů, patří sladkosti, kakao, mléčné výrobky, uzeniny, chipsy či koření [45, 56, 57].

Co se bakteriální flóry týká, hlavním protagonistou je bakterie *Propionibacterium acnes*. Velké množství mazu se pro ni stává ideálním prostředím pro množení. Díky tomu zvyšují množství jimi produkovaných biologicky aktivních látek a přispívají tak ke vzniku komedonu a následnému zánětu [45, 56, 57, 58].

4.1 Léčba akné

Problematikou léčby akné se zabývají vědci na celém světě. Dá se říct, že za posledních 20 let došlo k velkým pokrokům ve strategii léčby. Jsou objevovány další mechanismy, které způsobují hyperkeratinizaci, mezi které patří růstové hormony, cytokiny nebo enzymy. Právě tyto objevy a pochopení mechanismu pomáhají k vývoji nových léčebných postupů a tvorby léčiv. Léčba akné není krátkodobá záležitost. Délka terapie trvá v průměru 3-4 roky. Jsou však případy u kterých terapie trvá i 12 let. V Evropě se léčba akné řídí podle pravidel European Evidence – based (S3) Guidelines for the Treatment of Acne“. Tento přehled pomáhá lékařům a pacientům zvolit správný typ léčby. Ve většině případů je preferovaná kombinovaná terapie. Ke zlepšení stavu pleti při úspěšné léčbě dochází až po několika týdnech. Léčba akné může být místní nebo celková a zaměřuje se na léčbu již existujících projevů akné. Případně se snaží zabránit dalším komplikacím nebo opětovnému zánětu. Příkladem léčiv akné pro místní terapii je benzoylperoxid, kyselina salicylová nebo lokální antibiotikum. Pro celkovou léčbu jsou používány antibiotika, vakcíny a hormonální antikoncepce. Právě tyto typy terapie jsou dnes podporovány doplňkovými metodami, mezi které patří léčba laserem, fototerapie a v neposlední řadě využití léčebné kosmetiky s přísadami přírodních léčiv s obsahem aktivních látek rostlin [58].

Bylinná léčba akné má výhody v dobré toleranci, minima vedlejších účinků a rozhodně v ceně. Používají se jako antioxidanty, obsahují aktivní látky, polyfenoly, fenoly a flavonoidy. Mohou se využívat samostatně, ale není problém ani při kombinaci s klasickými léčivy. S léčbou akné jsou často spojovány i mnou vybrané byliny heřmáněk pravý, levandule lékařská či měsíček lékařský. Nejsou však jediné, ze kterých je možno přípravky proti akné připravit. Mezi další rostliny můžeme zařadit aloe vera, zelený čaj nebo konopí seté [58].

4.2 Léčivé přípravky proti akné

Jedná se o produkty, které jsou určeny k odstraňování kožního mazu, mikroorganismů a nečistot. Většina výrobců kosmetiky má ve své nabídce spousty přípravků. Patří mezi ně krémy, micelární vody, tonika, nebo třeba čistící gely. Léčebná kosmetika obsahuje aktivní látku, která zajišťuje terapeutický účinek. Mezi tyto aktivní látky patří konopí seté, šalvěj, levandule či australský čajovník. Konopí obsahuje látky, které mají pozitivní účinky na lidský organismus. Mezi nejvýznamnější látky patří kanabinoidy (THC, CBD, CBN a CBC), polyfenoly, terpeny, vitamíny (A, E) a další antioxidanty. Podle zjištěných informací má konopí své místo v kosmetickém průmyslu oprávněně. Výhodnější je využívat sušenou rostlinu (květ), která obsahuje více biologicky aktivních látek [59].

Další často využívaná látka je kyselina salicylová. Používá se jako peelingové činidlo a pro omlazování pokožky. Jedná se o povrchové činidlo vykazující vynikající desmolytické (štěpení uhlíkatých vazeb ve sloučeninách) a komedolytické (rozkládá komedony) vlastnosti. Koncentrace v kosmetických produktech je však pod 3 %, protože bylo zjištěno riziko salicylismu u lidí s tmavou pokožkou [60].

V kosmetických produktech se často používá allantoin. Jedná se o organickou látku na bázi močoviny. Je to zásobní a přenosná forma dusíku v některých rostlinách, která vzniká degradací purinů. Používá se na hojení popálenin, vředů a k léčbě lupénky. Povolena koncentrace se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 2 %. Allantoin se přidává do krémů, micelárních vod, balzámů na rty atd [61].

Piroctone olamine (obchodním názvem Octopirox) je ethanolaminová sůl derivátu hydroxamové kyseliny – piroctonu. Tato sloučenina byla poprvé syntetizována roku 1979 firmou Schwarzkopf-Henkel (Německo). Piroctone olamine najdeme v šamponech proti lupům a v přípravcích na podrážděnou pokožku. Má schopnost pronikat buněčnými membránami a tvořit komplexy s ionty železa a inhibovat tak energetický metabolismus v mitochondriích patogenních hub. Jeho mechanismus působení je složitý a zatím není zcela pochopen [62].

Důležitou věcí v přípravcích jsou hydratační a zvlhčující prvky. Mezi které patří např. zinečnatá sůl kyseliny L-pyrrolidon karboxylové obchodním názvem Zincidone. Díky obsahu zinku může regulovat aktivitu mazových žláz, snížit hladinu kožního mazu a působit na *Propionibacterium acnes* [63].

O revoluci v kosmetice se postaralo nano-stříbro. Působí antimikrobiálně, antimykoticky a protivirově. Je tedy ideální pro citlivou pokožku. Jeho účinnost je 99,9% a poskytuje tedy maximální ochranu. Stříbro může uvolňovat ionty stříbra z částice a vázat se na membránu bakteriální buněčné stěny. To vede k inaktivaci enzymů. Nicméně, to že je stříbro těžký kov, může způsobit vysokou toxicitu a následnou denaturaci bílkovin a enzymů v lidském těle. Je třeba na tento fakt brát zřetel [64].

5 METODY

K získání účinných látek z jednotlivých rostlin bylo zapotřebí využít různých laboratorních metod a technik. Mezi které patří extrakce, spektrofotometrie, kapalinová chromatografie, ELISA a v neposlední řadě antimikrobiální a antioxidační testy na agarových miskách.

5.1 Extrakce

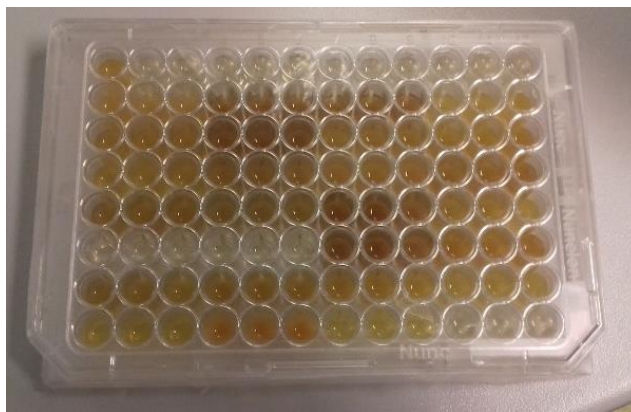
Extrakce je separační proces založený na rozdílné rozpustnosti. Rozpouštědla se používají k rozpuštění a oddělení látky od materiálu, který má v rozpouštědle nižší rozpustnost. Existují dva druhy extrakce. První je extrakce pevných látek kapalinou neboli loužení. Druhým druhem je extrakce kapalina – kapalina. V mém případě se jedná o extrakci pevné látky kapalinou. Mechanismus extrakce pevných látek zahrnuje namáčení pevného povrchu rozpouštědlem, penetraci rozpouštědla do pevné látky, rozpouštění extrahovatelných látek, transport rozpuštěných látek z vnitřku pevných částic na jejich povrch a rozptyl rozpuštěných látek uvnitř množství rozpouštědla obklopujícího pevné částice difúzí a mícháním [65].

5.2 Spektrofotometrie

Metody kvantitativní analýzy se často zakládají na určení absorpce elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové ($\lambda < 380$ nm) nebo viditelné části spektra ($\lambda = 380 - 780$ nm) stanovovanou látkou. Molekuly absorbují elektromagnetické záření pouze takové energie, která je přivede do vyššího excitovaného energetického stavu. Veškeré spektroskopické stanovení bylo prováděno na přístroji značky Helios. Roztok je měřen v křemenné kyvetě, kde je ozařován monochromatickým světlem a světelné záření je analytem absorbováno. Detektor měří intenzitu dopadajícího světla neabsorbovaného roztokem. Množství absorbovaného záření je pak úměrné koncentraci látky ve studovaném roztoku [65, 66, 67].

5.3 Jamkový diluční test

Jamkový diluční test je základní mikrobiologickou zkouškou na citlivost bakterií. Jedná se o přímou metodu, která probíhá na polyvinylových mikrotitračních destičkách různých objemů s 96 jamkami (viz obr. 14). Do těchto jamek se pipetuje vzorek antimikrobiální látky a vhodně naředěná kultura. Inkubace trvá 24 h při teplotě 37 °C. Měření probíhá v čase 0 h a po uplynutí 24 hodin. Jamkové diluční testy se dají vyhodnotit dvěma způsoby. První je vizuální. Vizuálně se sleduje stupeň barvy vzorků, který se pohybuje mezi barevnou a bezbarvou. Druhý způsob využívá měření absorbancí s následným vyhodnocením na ELISA reader Elx808 [68, 69].



Obr. 14: Diluční jamkový test na neředěných vzorcích v čase 0 h

5.4 Emulze

Forma emulze je v kosmetice nejpoužívanější substancí. Jedná se o soustavu dvou nemísitelných kapalin obvykle tukového základu a vody, v níž jedna je jemně rozptýlena ve druhé. Udrží se pomocí přidaných emulgátorů, což jsou látky schopné snižovat povrchové napětí. Pro lipofilní složku se užívá označení „O,„. Pro vodu a v ní rozpuštěné látky označení „V,„. Mezi druhy emulze patří: Emulze typu O/V (olej ve vodě), emulze typu V/O (voda v oleji), emulze smíšeného typu nebo mikroemulze. V mém případě byla tvořena pouze emulze typu O/V [70].

5.4.1 Emulze typu O/V

Jedná se o přímou emulzi prvního druhu tvořenou organickou nepolární látkou (olejem), která je rozptýlena v polárním rozpouštědle (vodě). Tyto emulze jsou základem hydrofilních krémů, které působí lehce, chladivě a nemastně. Aktivní látky, které jsou rozpuštěné ve vodní fázi, se zde velmi dobře uvolňují. Nevýhodou je možnost vysychání vodné fáze, a proto se do této emulze přidávají humektanty (látky schopné vázat vodu) a je nutné věnovat větší pozornost konzervaci přípravků [70].

5.5 Testace

Aby se mohl přípravek objevit na trhu, musí urazit dlouhou cestu. Je podroben testům a musí splňovat limity a kritéria. Musí splňovat nařízení článku 13 vydaného Evropským parlamentem a Evropskou radou (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. Stanovuje se jím povinnost o notifikaci kosmetických přípravků, které jsou uváděny na trh v EU. Pro tyto účely byl spuštěn Evropský portál notifikace kosmetických přípravků [71, 72, 73, 74].

Spolu se zvýšeným zájmem o ochranu přírody a zdraví vzrostl zájem a poptávka po šetrných kosmetických produktech. Toho využilo mnoho výrobců šetrné kosmetiky a drogerie. Jelikož ne v každé zemi je zákonem určeno, co se považuje za přírodní, začaly se objevovat speciální certifikační a kontrolní společnosti. Tyto společnosti zajišťují vysokou kvalitu přírodních produktů. Příkladem takových certifikátů jsou: Agriculture Biologique, Cosmos Natural a Cosmos Organic nebo certifikát RSPO, který označuje palmový olej, který pochází z udržitelných zdrojů a splňuje kritéria pro ochranu životního prostředí. Jejich loga jsou na obr. 15 a 16. Díky těmto organizacím je přísně hlídáno nejen složení, ale také výrobní postupy. Mezi tyto postupy patří ekologická výroba, šetrné zacházení s ingrediencemi a další kritéria. Ingrediencie musí být přírodního původu a pocházet z kontrolovaného ekologického zemědělství. Tyto společnosti nepodporují testování na zvířatech (organizace PETA) ani kácení tropických lesů [71, 72, 73, 74].



Obr. 15: Logo AGRICULTURE BIOLOGIQUE [75]



Obr. 16: Loga COSMOS NATURAL a ORGANIC [76]

5.6 INCI

Jedná se o zkratku International Nomenclature of Cosmetic Ingredients, v překladu mezinárodní názvosloví kosmetických ingrediencí. Podle nařízení EU 1223/2009 musí každý výrobek obsahovat na vnějším obalu seznam použitých ingrediencí. Ingredience jsou uvedeny v sestupném pořadí podle hmotnosti. Látky, jejichž obsah ve výrobku je nižší než 1 procento, jsou uvedeny na konci. Tento ústupek některé firmy využívají k tomu, že na první místo dají látku, která může být obsažena například z 0,01 % a na konec látku obsaženou z 0,95 %. Platí tedy, že pokud má výrobek složení popsané v systému INCI, pak je jedno, v jaké zemi se zrovna nacházíme, protože ingredience budou pojmenovány vždy stejně. Názvy vycházejí buď z latiny nebo angličtiny. Častý je i mix obou jazyků v názvu jedné ingredience, např. rosa damascena flower water – květová voda z damašské růže. Jsou tedy velmi dobře mezinárodně srozumitelné. Na obalu každého kosmetického výrobku musí být obchodní jméno výrobce, obsah výrobku v době balení a nesmí chybět ani datum minimální trvanlivosti [77, 78].

6 CÍL PRÁCE

Cílem práce je stanovení vybraných aktivních látek z různého rostlinného materiálu a možnost jejich aplikace do kosmetického výrobku určeného proti akné.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Charakterizace rostlinných zdrojů přírodních látek – možnosti využití různých částí rostlin, obsahu vybraných aktivních látek a mechanismus antibakteriálního účinku na mikroorganismy
- Stanovení a charakterizace aktivních látek z vybraných částí rostlin
- Návrh a testování kosmetického výrobku proti akné s obsahem aktivních látek

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Chemikálie, použité přístroje a materiál

7.1.1 Chemikálie

ABTS - 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina), Sigma Aldrich (SRN)
Agar Powder, Himedia (India)
Allantoin, Acetrade (ČR)
Bambucké máslo, Aromaterapeutická KH a.s. (ČR)
BHI médium, Himedia (IND)
Cetearylalkohol, Cetylalkohol Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)
Dimetikon 350 cs – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)
Enzymatic Yeast β -Glucan Assay Kit - Megazyme (Ireland)
Ercawax MB1 – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, ČR)
Etanol, p.a., LachNer (ČR)
Etanol pro UV-VIS, Lachema (ČR)
Euxyl® PE 9010, Schülke & Mayr GmbH (SRN)
Fenoxyetanol, Acetrade (ČR)
Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)
Glycerin bezvodý, p.a., LachNer (ČR)
Hexakynoželesnatán draselný, Penta (ČR)
Hydroxid draselný, p.a., LachNer (ČR)
Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)
Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)
Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)
Katechin, Sigma Aldrich (SRN)
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)
Kyselina chlorovodíková (35%), LachNer (ČR)
Kyselina sírová (96%), LachNer
LB Broth, Sigma (SRN)
Nikotinamid, Acetrade (ČR)
Nutrient Broth (NB), Himedia (India)
Parafinový olej (Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Pepton, Himedia (IND)
Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma Aldrich (SRN)
Polysorbát 80, Dr. Kulich Pharma, s. r. o. (ČR)
Saboderm TCC, Acetrade (ČR)
Sabonal C1618 50/50, Acetrade (ČR)
Sabowax GMS, Acetrade (ČR)
Sabowax HCO, Acetrade (ČR) Trietanolamin 99%, Acetrade (ČR)
Trolox, Sigma Aldrich (SRN)
Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)
Vazelína bílá – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Yeast Extract Powder, Himedia (India)

7.1.2 Přístroje

Analytické váhy, Boeco (SRN)

Automatické pipety o různém rozsahu objemu - Discovery (SRN) a Biohit (Německo)

Biohazard box, model Airstream, třída II - ESCO, Biotech (Německo)

ELISA reader BioTek Elx808, BioTek (Německo)

Mikrovlnný rozkladný systém Milestone 1200 s karuselem na 6 vzorků (USA)

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (Německo)

Třepačka IKA Yellow Line (SRN)

Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Vortex, TK35, Kartell spa (USA)

7.1.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy použité v bakalářské práci byly získané z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM), Brno.

- *Candida glabrata* CCM 8270
- *Escherichia coli* CCM 7395
- *Malassezia furfur* CCY 85-2-1
- *Micrococcus luteus* CCM 1569

7.1.2 Materiál

7.1.2.1 Příprava vzorků

Všechny použité rostliny byly zakoupeny sušené v papírových sáčkích. Roztoky rostliny, jejichž názvy obsahují *, byly připraveny ve vyšší koncentraci v poměru 3:20 s 60% ethanolem. Roztoky rostlin bez znaménka, byly připraveny v poměru 1:10 s 60% ethanolem.



Obr. 17: Příprava vzorků pro extrakci s 60% ethanolem (1. den)



Obr.18: Vzorky po 7 denní extrakci v 60% ethanolu

7.2 Charakterizace přírodních extraktů

Stanovované vzorky byly nejprve naváženy. Pro vzorky o nižší koncentraci se jednalo o 1 g a pro vzorky o vyšší koncentraci se jednalo o 3 g rostlin. Poté bylo k naváženému množství vzorku přidáno příslušné množství 60% roztoku ethanolu (100 ml a 200 ml), který je po vodě druhým nejčastěji používaným rozpouštědlem. Jednalo se tedy o poměry 1:10 a 3:20. Všechny vzorky byly týden extrahovány (obr. 17 a obr. 18). Poté byla pomocí gázy provedena extrakce a vzorky byly uchovávány v tmavých prachovnicích na místě bez přístupu světla. A to z důvodu, že obsah polyfenolů klesá v čase, po který byl vzorek ponechán na světle.

Vyextrahované vzorky byly pak před samotnými stanoveními ředěny dle potřeby, a to buď 10× nebo 100×. Při dilučních testech byly vzorky nejprve testovány nezředěné, výsledné hodnoty jsou uvedeny v tab. 10 a zředěné na 3 %, ve kterých by se měly vyskytovat v kosmetických přípravcích. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tab. 11 a v tab. 12.

7.2.1 Stanovení celkových polyfenolů

Spektrofotometrická metoda s využitím Folin-Ciocalteuova činidla je založena na reakci, kdy dochází k redukci činidla za vzniku modrého zbarvení. Reakci tak lze pozorovat spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm, kdy je intenzita zbarvení závislá na koncentraci polyfenolů přítomných ve vzorku. Výsledná hodnota je uváděna v ekvivalentech kyseliny gallové. Do zkumavky byl napipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9 a 1 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 50 µl připraveného vzorku, směs byla promíchána a ponechána 5 min. stát. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 (29,5 g Na_2CO_3 v 95 ml destilované vody), zkumavka byla promíchána a ponechána 15 min. stát. Obsah přítomných polyfenolů byl poté změřen spektrofotometricky, kdy byla zaznamenávána absorbance při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, přičemž byla použita destilovaná voda místo vzorku. Pro kalibraci byla jako standard použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0–0,6 mg/ml. Přesná navážka kyseliny gallové byla 0,0503 g ve 100 ml.

7.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Tato kolorimetrická metoda využívá změnu zbarvení roztoku s hlinitou solí, která je vyvolána přítomností flavonoidů. Spektrofotometrická detekce se uskutečňuje při vlnové délce 510 nm.

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml připraveného vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5 % NaNO₂ (5 g NaNO₂ do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou). Směs byla promíchána a ponechána 5 min. stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10 % AlCl₃ (10 g AlCl₃ do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou), promícháno a ponecháno 5 min. stát. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml 1M NaOH (4 g NaOH do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou) a 1 ml destilované vody. Tato směs byla ještě jednou promíchána a ponechána 15 min. stát. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, přičemž byla použita destilovaná voda místo vzorku. Jako standard byl použit katechin v koncentračním rozmezí 0–0,3 mg/ml.

7.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity lze využít metodu TEAC, která hodnotí schopnost vzorku zhaset ABTS^{•+} spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Sleduje se úbytek absorbance v čase. Výsledné množství se udává v ekvivalentech syntetického derivátu Troloxu. Nejdříve byl připraven kationt-radikál ABTS^{•+} přímo v 10ml odměrné baňce tak, že ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM, byl přidán peroxidisíran draselný o koncentraci 2,45 mM a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Odměrná baňka byla obalena alobalem a ponechána stát ve tmě při pokojové teplotě 12 h. Před analýzou byl ABTS^{•+} zředěn etanolem pro UV-VIS na absorbanci 0,700 (±0,02) při vlnové délce 734 nm (proti etanolu). Pro zjištění antioxidační aktivity vzorku byl do zúžené kyvety napipetován 1 ml naředěného ABTS^{•+} a 10 μl připraveného vzorku. Po promíchání byl měřen pokles absorbance po uplynutí 10 min → A1. Substrát byl připraven smísením 1 ml upraveného ABTS^{•+} a 10 μl destilované vody. Ihned po promíchání byla zaznamenána absorbance → A0. Absorbance byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm, přičemž výsledná absorbance byla vypočítána pomocí vztahu: $A = A0 - A1$. Pro proměření kalibrace byl připraven zásobní roztok Troloxu o koncentraci 400 μg/ml tak, že navážka 40 mg byla rozpuštěna ve 100ml odměrné baňce pomocí 60% roztoku etanolu pro UV-VIS (koncentrační rozmezí standardu Troloxu 0–400 μg/ml). Absorbance dané koncentrační řady byla získána obdobně jako vzorek, kdy místo vzorku byl použit roztok standardu Troloxu a místo destilované vody při měření substrátu a slepého vzorku byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS.

7.2.4 Příprava kosmetických emulzí

7.2.4.1 Příprava emulze O/V

Příprava emulzního základu O/V se řídí principem vytvoření stálé homogenní směsi vodné a tukové fáze. Příprava emulzních základů byla prováděna v laboratoři při laboratorní teplotě. Nejprve byla připravena vodní fáze a poté olejová fáze. Následující postup odpovídá množství 100 ml vzniklé emulze.

Při přípravě vodní fáze bylo do kádinky odměřeno 84,0 ml destilované vody a 3,0 ml 86,5 % glycerolu (2,6 ml 100 % glycerolu a 0,4 ml destilované vody). Celá směs byla zahřívána na teplotu 75 °C. Pro přípravu olejové fáze bylo do kádinky naváženo 2,5 g Ercawax BM1, 3,0 g cetylalkoholu, 1,5 g bílé vazelíny a napipetováno 4,0 ml parafínového oleje a 1,5 ml dimethikonu. Vzniklá směs byla za stálého míchání zahřívána na teplotu 75 °C. Jakmile měly obě fáze teplotu 75 °C, byla do vodné fáze za stálého míchání postupně přidána fáze olejová. Po emulgaci byla vzniklá směs intenzivně míchána až do vychladnutí na 20 °C. K základu byly přidány extrakty v takovém množství, aby jejich koncentrace v emulzi odpovídala 3% (viz. obr. 19).



Obr. 19: Ukázka připravené emulze O/V po přidání extraktů (směsi)

7.2.4.2 Příprava pleťového mléka

Nejdříve byly do kádinky naváženy suroviny olejové fáze. Ve druhé kádince byla připravena fáze vodná. Stejně jako v případě přípravy emulze O/V byl použit 86,5 % glycerol v množství 1,65 ml (1,43 ml 100 % glycerolu a 0,22 ml destilované vody). Poté byly obě kádinky umístěny do vodní lázně vyhřáté na 75 °C. Po zahřátí a rozpuštění obou fází byla pomalu za stálého míchání přidávána olejová fáze do fáze vodné. Poté byla emulze míchána až do zchladnutí, přičemž byla průběžně měněna rychlost otáček míchadla i jeho pozice. Hmotnost jednoho vzorku pleťového mléka byla 50 g, takže konkrétní hmotnosti jednotlivých surovin obou fází byly přepočítány podle procentuálního obsahu uvedeného v tab. 2. Stejně jako k emulzi V/O byly i do pleťového mléka přidány vybrané extrakty (viz. obr. 20).



Obr. 20: Pleťová mléka po přidavku extraktů 3% extraktů

Tab. 2: Receptura pleťového mléka

Vodná fáze		Olejová fáze	
Surovin	Obsah [%]	Surovina	Obsah [%]
Destilovaná voda	84 (40 ml)	Sabowax HCO	1 (0,5 ml)
Glycerol	3,3 (1,65 ml)	Bambucké máslo	5 (2,5 ml)
Fenoxyetanol	0,5 (0,25 ml)	Saboderm TCC	1 (0,5 ml)
Trietanolamin	0,2 (0,1 ml)	Cetearyl alkohol	3 (1,5 ml)
		Sabonal C1618 50/50	1 (0,5 ml)
		Sabowax GMS	1 (0,5 ml)

7.2.4.3 Příprava micelární vody

Do kádinky byl navážen allantoin a nikotinamid, poté destilovaná voda s glycerolem. Nakonec byl přidán euxyl® PE 9010 a polysorbát 80, poté byla směs promíchána. Hmotnost jednoho vzorku micelární vody byla 100 g. Procentuální zastoupení surovin je uvedeno v tab. 3. Na obr. 21 je ukázka micelární vody po přidání 3 % extraktů v porovnání s čistou směsí.

Tab. 3: Receptura micelární vody

Surovina	Obsah [%]
Allantoin	0,1
Nikotinamid	0,9
Destilovaná voda	96
Glycerol	1
Euxyl® PE 9010	1
Polysorbát 80	1

**Obr. 21:** Připravená micelární voda (čistý základ + přidání 3% extrakty)

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

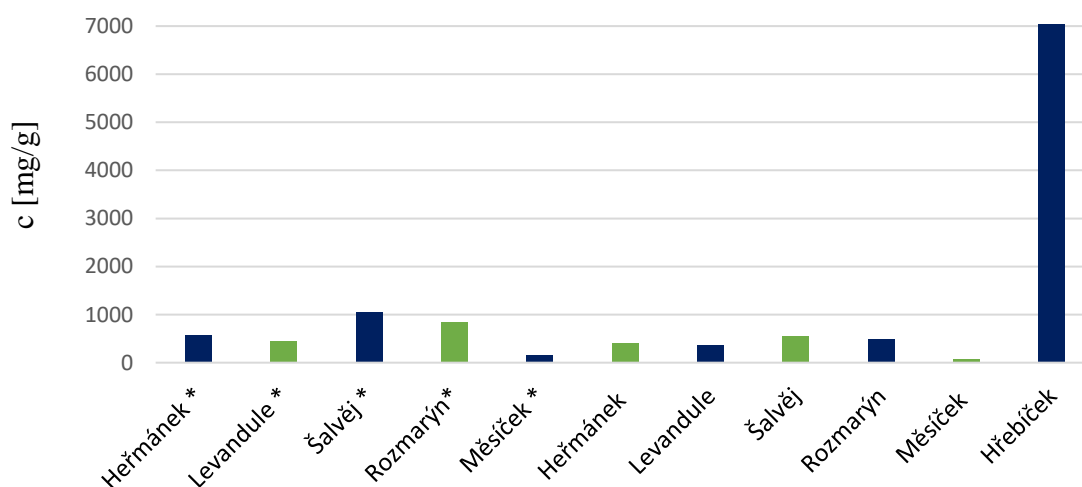
8.1 Celkové polyfenoly a flavonoidy

U vzorků byl spektrofotometricky podle postupů v kapitolách 7.2.1 a 7.2.2 stanoven obsah celkových polyfenolů a flavonoidů. Měření bylo opakováno vždy třikrát, přičemž výsledná absorbance byla získána jako jejich aritmetický průměr. Pokud se jedna hodnota výrazně lišila, byla vynechána a do výsledného průměru se nezapočítala. Koncentrace celkových polyfenolů i flavonoidů byla poté získána pomocí kalibrační křivky, kdy byla průměrná absorbance dosazena do rovnice přímky kalibrace. Všechny hodnoty jsou uvedeny v tab. 4 a tab. 5. V tabulkách jsou uváděny rostliny o dvou koncentracích. Vyšší koncentrace (3:20) je vždy označena hvězdičkou (*).

V tab. 4 jsou uvedené hodnoty celkových polyfenolů, přičemž je patrné, že nejvyšší zastoupení polyfenolů je u hřebíčku. Rozdíl 60 mg/ml je pak u druhé šalvěje lékařské * a třetího rozmarýnu lékařského *. Nejnižší obsah polyfenolů má měsíček lékařský. Z tab. 4 je patrné, že veškeré rostliny, které byly extrahovány ve vyšší koncentraci, obsahují více polyfenolů než extrakty o koncentraci nižší. Hřebíček byl jako jediný zředěný 100× a i přes tuto skutečnost obsahoval větší množství polyfenolů než ostatní bylinné extrakty (obr. 22).

Tab. 4: Naměřené hodnoty absorbancí a výpočet koncentrace pro stanovení polyfenolů

	ředění	c [mg/g]
<i>Hřebíček</i>	100	7039,96
<i>Šalvěj *</i>	10	105,90
<i>Šalvěj</i>	10	54,43
<i>Rozmarýn *</i>	10	84,88
<i>Rozmarýn</i>	10	48,31
<i>Heřmánek *</i>	10	57,83
<i>Heřmánek</i>	10	39,70
<i>Levandule *</i>	10	44,46
<i>Levandule</i>	10	36,96
<i>Měsíček *</i>	10	15,50
<i>Měsíček</i>	10	7,49

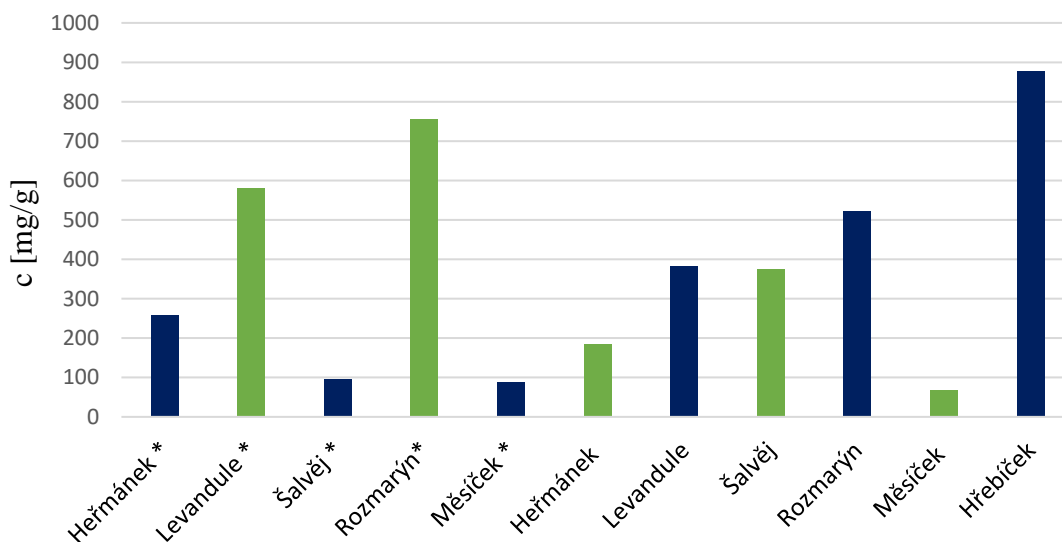


Obr. 22: Grafické znázornění vypočítaných koncentrací

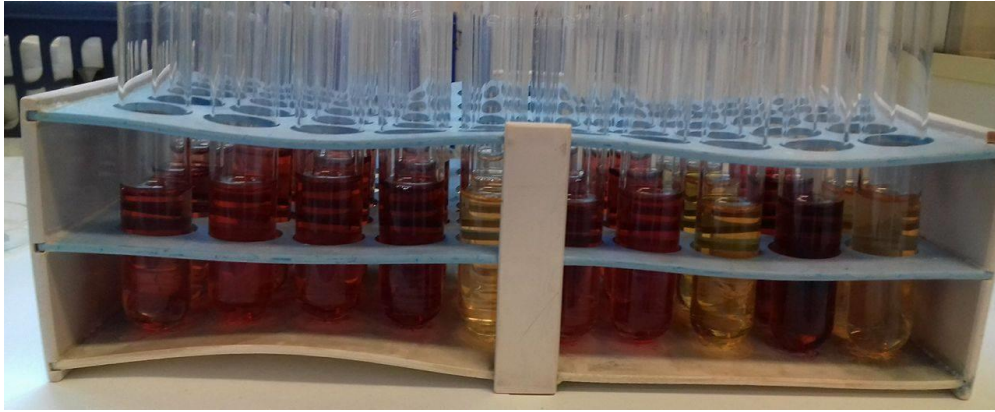
V tab. 5 jsou uvedeny hodnoty celkových flavonoidů, přičemž je patrné, že nejvyšší obsah flavonoidů opět najdeme u hřebíčku, rozmarýnu *. Výjimkou je levandule *. Všechny tyto extrakty byly ředěny 100× a jednalo se o vzorky o vyšší koncentraci. Na rozdíl od polyfenolů zde nenajdeme tak velké rozdíly v obsahu. Nejnižší obsah flavonoidů je u šalvěje a měsíčku. Přitom jak z tab. 4 vyplývá, tak obsah polyfenolů v šalvěji se výrazně liší. Veškeré rostliny, které byly extrahovány ve vyšší koncentraci, obsahují více flavonoidů než extrakty o koncentraci nižší. Grafické znázornění výsledků je na obr. 23.

Tab. 5: Naměřené hodnoty absorbancí a výpočet koncentrace pro stanovení flavonoidů

	ředění	c[mg/g]
<i>Hřebíček</i>	100	876,65
<i>Šalvěj *</i>	100	93,96
<i>Šalvěj</i>	100	37,34
<i>Rozmarýn *</i>	100	754,61
<i>Rozmarýn</i>	100	521,84
<i>Heřmánek *</i>	10	257,65
<i>Heřmánek</i>	10	183,41
<i>Levandule *</i>	10	580,97
<i>Levandule</i>	10	382,18
<i>Měsíček *</i>	10	88,04
<i>Měsíček</i>	10	66,78



Obr. 23: Grafické znázornění naměřených hodnot flavonoidů



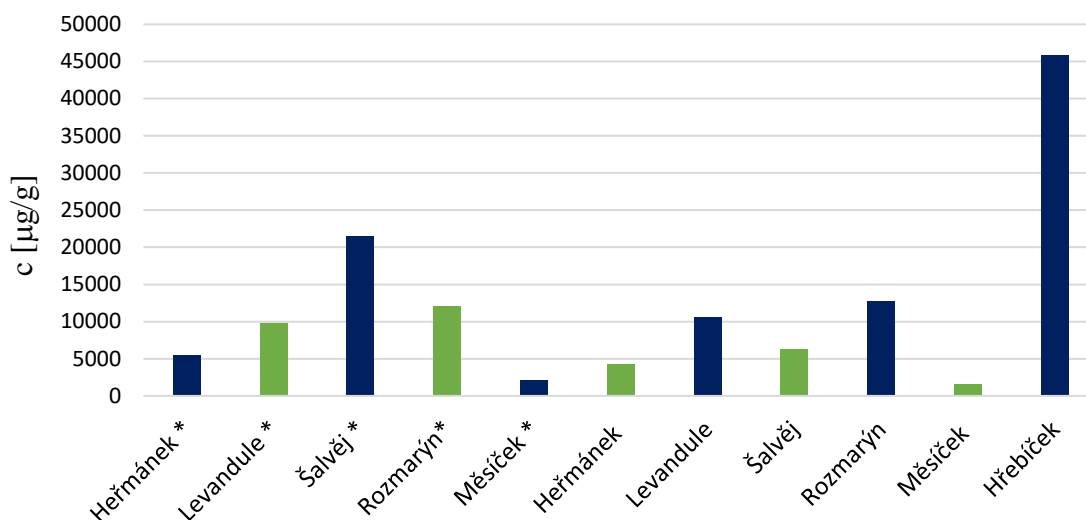
Obr. 24: Připravené vzorky pro stanovení flavonoidů

8.2 Antioxidační aktivita

Podle postupu uvedeného v kapitole 7.2.3 byla stanovena antioxidační aktivita u vyextrahovaných extraktů. Měření bylo opakováno vždy třikrát a výsledná absorbance pak byla získána jako jejich průměr. Koncentrace byla získána z kalibrační křivky, do jejíž rovnice regrese byla dosazena průměrná absorbance. Výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena v ekvivalentech Troloxu, který byl použit jako standard. Jak vyplývá z tab. č. 6, tak nejvyšší antioxidační aktivitu má opět hřebíček a šalvěj *. Zajímavostí je, že vzorek levandule o nižší koncentraci má vyšší antioxidační aktivitu než levandule namíchaná o vyšší koncentraci. Kdežto antioxidační aktivita rozmarýnu je u obou dvou koncentrací téměř stejná. Hodnoty jsou znázorněny v grafu na obr. 25.

Tab. 6: Výsledné hodnoty absorbancí pro stanovení ABTS

	σA	ředění	c [ug/g]
<i>Hřebíček</i>	0,52	100	45779,55
<i>Šalvěj *</i>	0,24	100	21417,36
<i>Šalvěj</i>	0,07	100	6286,85
<i>Rozmarýn *</i>	0,13	100	12067,71
<i>Rozmarýn</i>	0,14	100	12775,57
<i>Heřmánek *</i>	0,62	10	5498,17
<i>Heřmánek</i>	0,48	10	4237,30
<i>Levandule *</i>	0,11	100	9767,16
<i>Levandule</i>	0,12	100	10593
<i>Měsíček *</i>	0,24	10	2131,41
<i>Měsíček</i>	0,18	10	1590,20



Obr. 25: Grafické znázornění koncentrací antioxidační aktivity vzorků

8.3 Vyhodnocení antimikrobiálních testů

Vybrané rostlinné extrakty byly nanášeny na připravené misky s agarem, na kterých byly naočkované modelové bakterie a kvasinky (obr. 26). Byli zvoleni zástupci G^+ i G^- bakterií a kvasinka. Zástupci jsou popsáni v kapitole 4.2. Bakterie i kvasinka byly kultivovány v tekutém médiu při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ za neustálého třepání. Sterilizace médií proběhla v tlakovém hrnci při teplotě $120\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 40 minut. Kontrola velikosti inhibičního účinku byla provedena po 24 h. V tab. 7 jsou uvedeny velikosti inhibičních zón u jednotlivých extraktů. Z tab. 7 je patrné, že nejvyššího inhibičního účinku dosáhl hřebíček, a to proti všem testovaným organismům. Za hřebíčkem měl velký účinek také heřmánek * a šalvěj *. Obecně lze říct, že největší účinnost měly extrakty testované proti *Micrococcus luteus*.

Stejně jako samotné extrakty byly kontrole podrobeny i vytvořené směsi. Výsledné hodnoty jsou zapsány v tab. 8. Pro větší přehlednost je v příloze uveden přehled kombinací směsí v tab. 9. Největší účinek měla směs tvořená hřebíčkem a měsíčkem (směs 1), kde zajisté velkou roli hrál právě hřebíček, dále pak směs levandule a rozmarýnu * (směs 3). Jednou z možností, jak se dá zvýšit antimikrobiální efekt, je zkombinovat jednotlivé látky. Musí se však dodržet podmínka, aby na sebe látky nepůsobily antagonisticky. Synergické kombinace by měly způsobit, že účinek antimikrobiálních látek v kombinaci je větší, než součet účinků každé látky zvlášť.

Tab. 7: Přehled velikostí inhibičních zón proti zkoumaným organismům

	YPD [cm]	NB [cm]	LB [cm]
<i>Heřmánek *</i>	0,15	0,30	0,30
<i>Levandule *</i>	0,10	0,30	0,10
<i>Šalvěj *</i>	0,10	0,50	0,60
<i>Rozmarýn*</i>	0,05	0,20	0,25
<i>Měsíček *</i>	0,00	0,30	0,03
<i>Heřmánek</i>	0,03	0,20	0,00
<i>Levandule</i>	0,03	0,15	0,00
<i>Šalvěj</i>	0,10	0,60	0,15
<i>Rozmarýn</i>	0,10	0,60	0,10
<i>Měsíček</i>	0,10	0,60	0,00
<i>Hřebíček</i>	0,50	0,30	1,00

Tab. 8: Přehled inhibičních zón směsí

Směs	YPD [cm]	NB [cm]	LB [cm]
1	0,30	0,30	0,10
2	0,10	0,10	0,45
3	0,00	0,00	0,10
4	0,60	0,03	0,03
5	0,03	0,00	0,03
6	0,10	0,025	0,20

Tab. 9: Přehled vytvořených směsí extraktů

Číslo směsi:	Složení směsi:
1	Hřebíček + Měsíček
2	Šalvěj * + Rozmarýn
3	Levandule * + Měsíček
4	Levandule + Rozmarýn *
5	Heřmánek * + Měsíček *
6	Levandule * + Šalvěj * + Měsíček

**Obr. 26:** Antimikrobiální test na agaru; směs 1 (hřebíček + měsíček) a směs 2 (šalvěj * + rozmarýn) proti *Escherichia coli*

Na všech vzorcích byl proveden diluční test spektrofotometricky na ELISA readru Elx. Měření proběhlo v čase 0 h a 24 h. Výsledkem testu je hodnota absorbance, která odpovídá životaschopnosti buněk. Při vyhodnocování pak byly získané absorbance od sebe odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Tyto hodnoty pak byly porovnány s nárůstem čisté kultury, přičemž byl vždy od jednotlivých vzorků odečten účinek příslušného základu (60% etanol v případě extraktů, kosmetický základ a allantoin u kosmetických přípravků).

Všechny získané hodnoty, které byly přepočteny na nárůst kultury (inhibiční účinek) v procentech, jsou uvedeny v následujících tabulkách. Jedná se o tab. 10, tab. 11 a tab. 12. Tím byla získána absorbance, která byla nižší než absorbance čisté kultury, což značí inhibici nárůstu této kultury. V případě, že by absorbance vzrostla, vzorek by obsahoval nějakou složku,

kteřá podporuje růst této bakterie. Výsledky pak byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kde 100 % značí čistou kulturu. Z uvedeného způsobu vyhodnocování vyplývá, že čím nižší procento, tím nižší nárůst kultury, tedy lepší inhibiční účinek vzorku.

Diluční jamkovou metodou byl zjišťován antimikrobiální účinek kosmetických přípravků proti *Propionibacterium acnes*. Ve všech případech připravených kosmetických přípravků byl nárůst kultury nižší než 100 %, tudíž všechny vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Jejich inhibiční účinek však není tak vysoký jako u samotných extraktů. Nejlepších výsledků dosáhlo pleťové mléko, které ve svém složení obsahovalo více konzervantů, než emulze O/V.

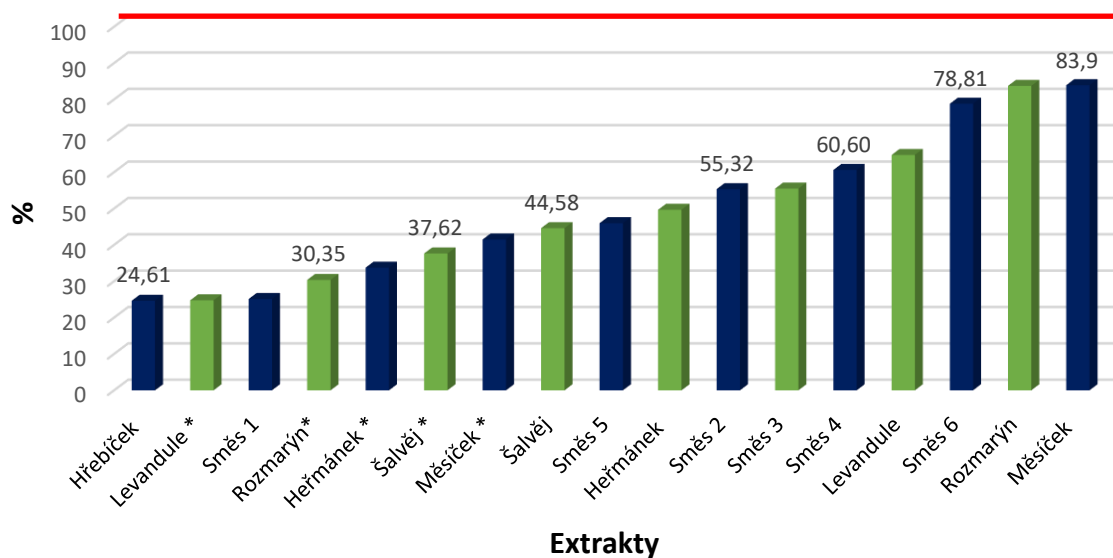
V tab. 12 jsou zapsané pouze extrakty jednotlivých kosmetických výrobků, které měly inhibiční účinek. Podle hodnot je patrné, že velkou roli hraje i druh zvoleného kosmetického výrobku. Při porovnání výsledků samostatných 3% extraktů a 3% extraktů obsažených v kosmetických přípravcích je patrné, že na antimikrobiální účinek mají patrný vliv i konzervanty obsažené v základech kosmetických přípravků. Grafické znázornění je na obr. 27 a obr. 28. Na obou grafech je červeně zvýrazněna hodnota 100%, tj. hodnota, čisté kultury. Celkově nejučinnější je micelární voda a pleťové mléko. Co se týká hotových výrobků jako celku, nejlepší účinek proti *Propionibacterium acnes* má směs 5 (MV), hřebíček (PM), směs 1 (PM), hřebíček (MV) rozmarýn * (O/V) a hřebíček (O/V).

Tab. 10: Diluční jamkový test na nezředěných vzorcích

Extrakty	%	Extrakty	%
<i>Směs 1</i>	7,53	<i>Směs 4</i>	10,51
<i>Hřebíček</i>	10,76	<i>Šalvěj</i>	10,57
<i>Šalvěj *</i>	8,26	<i>Směs 2</i>	10,76
<i>Levandule</i>	8,44	<i>Měsíček *</i>	10,96
<i>Heřmánek *</i>	9,67	<i>Rozmarýn</i>	13,71
<i>Směs 5</i>	10,26	<i>Heřmánek</i>	13,86
<i>Rozmarýn</i>	10,28	<i>Měsíček</i>	14,94
<i>Směs 3</i>	10,33	<i>Směs 6</i>	15,77
<i>Levandule *</i>	10,43		

Tab. 11: Diluční jamkový test na vzorcích zředěných na 3 %

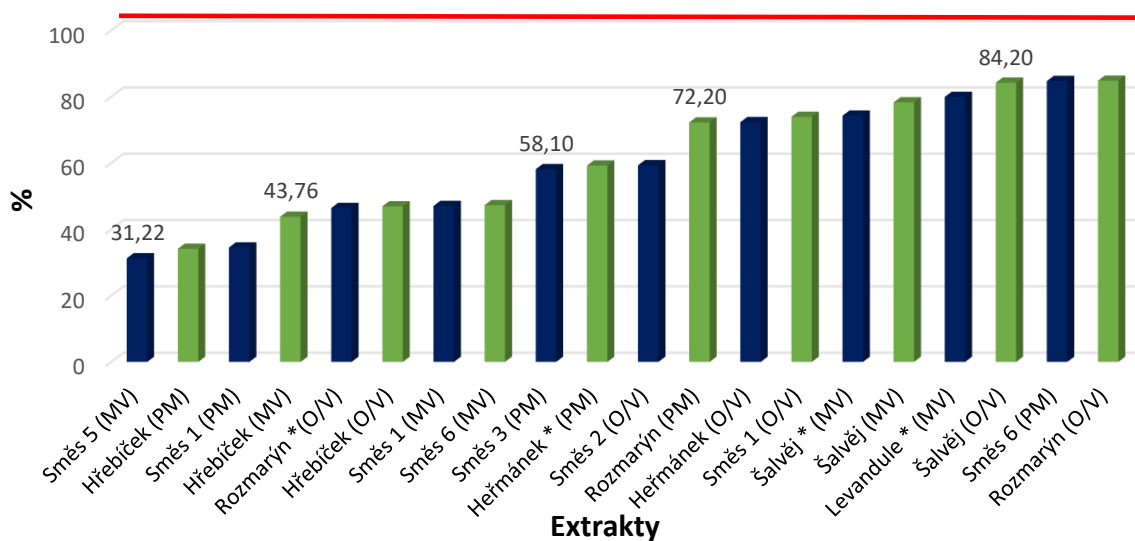
Extrakty	%	Extrakty	%
<i>Hřebíček</i>	24,61	<i>Heřmánek</i>	49,64
<i>Levandule *</i>	24,75	<i>Směs 2</i>	55,32
<i>Směs 1</i>	25,12	<i>Směs 3</i>	55,47
<i>Rozmarýn*</i>	30,35	<i>Směs 4</i>	60,60
<i>Heřmánek *</i>	33,73	<i>Levandule</i>	64,72
<i>Šalvěj *</i>	37,62	<i>Směs 6</i>	78,81
<i>Měsíček *</i>	41,48	<i>Rozmarýn</i>	83,72
<i>Šalvěj</i>	44,58	<i>Měsíček</i>	83,90
<i>Směs 5</i>	45,96		



Obr. 27: Účinnost extraktů zředěných na 3% v porovnání s čistou kulturou

Tab. 12: Diluční jamkový test na vytvořených kosmetických výrobcích (3%)

Extrakt	%	Extrakt	%
Směs 5 (MV)	31,22	Směs 2 (O/V)	59,3
Hřebíček (PM)	34,1	Rozmarýn (PM)	72,2
Směs 1 (PM)	34,5	Heřmánek (O/V)	72,3
Hřebíček (MV)	43,76	Směs 1 (O/V)	73,9
Rozmarýn *(O/V)	46,4	Šalvěj *(MV)	74,26
Hřebíček (O/V)	46,9	Šalvěj (MV)	78,27
Směs 1 (MV)	47,0	Levandule *(MV)	79,89
Směs 6 (MV)	47,26	Šalvěj (O/V)	84,2
Směs 3 (PM)	58,1	Směs 6 (PM)	84,7
Heřmánek *(PM)	59,2	Rozmarýn (O/V)	84,8



Obr. 28: Účinnost vytvořených kosmetických výrobků v porovnání s čistou kulturou

8.4 Vyhodnocení antimikrobiálních účinků extraktů v hotových přípravcích

Stejně jako samotné extrakty a jejich směsi byly otestovány i vytvořené emulze O/V, pleťová mléka a micelární voda. Postup výroby základů kosmetických přípravků jsou uvedeny v kapitole 7.2.4. Do hotových přípravků proti akné byly přidány extrakty, aby celková koncentrace odpovídala 3 % aktivních látek extraktů. Tyto přípravky byly naneseny do jamky na připravených agarových miskách, na kterých byla naočkovaná modelová bakterie a kvasinka. Byl zvolen modelový zástupce G⁺ bakterie (*Escherichia coli*) a kvasinky (*Candida glabrata*). Ukázka z přípravy agarových misek je na obr. 29. Vizuální kontrolou agarových misek bylo zjištěno, že 3% přípravky nemají téměř žádný účinek proti kvasince ani proti G⁺ bakterii. Zmínit lze pouze krátkodobý účinek u přípravků, které jsou zapsány v tab. 13. V tab. 13 jsou tyto extrakty označeny fajfkou (✓) a extrakty bez účinku křížkem (×). Po kontrole, která proběhla po 24 h bylo patrné, že vzniklé inhibiční zóny začínaly opět porůstat kvasinkou/bakterií.

Tab. 13: Přehled vzniku inhibičních zón přípravků s 3 % extrakty

	PM [YPD]	O/V [YPD]	PM [LB]	O/V [LB]
<i>Směs 1</i>	×	×	✓	✓
<i>Směs 4</i>	✓	×	✓	×
<i>Rozmarýn</i>	×	×	✓	✓
<i>Hřebíček</i>	✓	✓	✓	✓



Obr. 29: Ukázka z očkovacího boxu před nanesením 3% extraktů na agarové misky

9 ZÁVĚR

V teoretické části byla po důkladném průzkumu trhu mnoha kosmetických firem vypracována rešerše o nejčastěji se vyskytujících antibakteriálních látkách v kosmetických přípravcích proti akné. Jedná se o antibakteriální látky rostlin levandule lékařské, hřebíčku, šalvěje lékařské, měsíčku lékařského, heřmánku pravého a rozmarýnu lékařského. Z chemického hlediska odpovídají terpenům a flavonoidům. Mezi nejčastěji se vyskytující účinné látky patří borneol a eugenol. V bakalářské práci se nachází stručný přehled a popis těchto účinných látek. Aktivní látky se využívají ve farmaceutickém průmyslu a farmacii, ale také jako repelenty či fungicidy. Jistá nevýhoda přírodních látek spočívá v jejich toxicitě či dráždivosti. Tato skutečnost by se mohla stát limitujícím faktorem pro jejich další využití. Tento problém by měl být však ošetřen důkladnou testací výrobků na jejich obsah, a tedy i na účinné látky v nich. V závěru teoretické části jsou uvedeny způsoby testace a značení jednotlivých látek a ingrediencí v přípravcích.

V experimentální části byly nejprve připraveny extrakty z vybraných rostlin a následně charakterizovány. Při charakterizaci extraktů byl stanoven obsah fenolických látek, polyfenolů a flavonoidů. Byly provedeny testy na antimikrobiální aktivity proti zvoleným bakteriím a kvasince. Vzorke byly podrobeny dilučnímu testu proti *Propionibacterium acnes*. Z praktické a experimentální části je patrné, že nejvyšší antioxidační a antimikrobiální aktivity dosahují hřebíček, rozmarýn, heřmánek. Tyto rostliny vynikaly nejen při stanovování flavonoidů, polyfenolů, ale také při antimikrobiálních testech proti vybraným druhům bakterií a kvasinky. Poté byly vzorky namíchány do směsí, aby mohlo dojít k zvýšení jejich účinku. Snaha o prokázání synergického účinku ovšem nebyla tak velká, jak bylo původně očekáváno. Synergické kombinace by měly způsobit, že účinek antimikrobiálních látek v kombinaci je větší, než součet účinků každé látky zvlášť. Za úspěšnou kombinaci se dá považovat směs 1 (hřebíček + měsíček) a směs 5 (heřmánek *+ měsíček *).

Dále byly vytvořeny přípravky proti akné. Byla zvolena emulze O/V (O/V), pleťové mléko (PM) a micelární voda (MV). Do těchto přípravků byly přidány extrakty vybraných rostlin, aby koncentrace odpovídala 3 %, stejně jako v běžných kosmetických přípravcích. Po antimikrobiálním testu na agarových miskách bylo zjištěno, že proti kvasince (*Candida glabrata*) ani proti G⁺ bakterii (*Escherichia coli*) nemají téměř žádný účinek. Pouze u směsi 1, směsi 4, hřebíčku a rozmarýnu bylo vizuálně pozorováno, že došlo ke zpětnému porostení a jejich účinek je tedy krátkodobý. Musel by se tedy přípravek s těmito extrakty používat 2× denně.

Připravené přípravky s extrakty byly podrobeny dilučnímu testu proti *Propionibacterium acnes*. Opět se jednalo o vzorky obsahující 3% extrakt vybraných rostlin. Z výsledků je patrné, že vliv mají i konzervanty obsažené v základech kosmetických výrobků. Celkově nejúčinnější je micelární voda a pleťové mléko. A právě micelární voda obsahuje allantoin, který hraje důležitou roli. Co se týká hotových výrobků, nejlepší účinek proti *Propionibacterium acnes* má směs 5 (heřmánek *+ měsíček *) (MV), hřebíček (PM), směs 1 (hřebíček + měsíček) (PM), hřebíček (MV) rozmarýn * (O/V) a hřebíček (O/V).

10 LITERATURA

- [1] COWMAN, M. M. (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564–582
- [2] RYTÍŘ, Vladislav. Antimikrobiální látky rostlin [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/lfn2o4/00131984-408349944.pdf>. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [3] MÄRTL, Radek. Fytoterapie - uzdravující bylinky. CELOSTNÍ MEDICÍNA [online]. 2006 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/fytoterapie-uzdravujici-bylinky.htm>
- [4] TEDESCHI, Giulia a Ulrike RAISER. Herbář: přírodní lékárna : bylinky z klášterní zahrady. Praha: Euromedia Group, 2017. Esence. ISBN 978-80-7549-296-8.
- [5] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. Herbář léčivých rostlin. Praha: Eminent, 1995. ISBN 80-858-7604-3.
- [6] Léčivé rostliny. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.
- [7] Hřebíček lékařský. In: Abeceda zahrady [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: Abecedazahrady.cz
- [8] SCHÖNFELDER, Peter a Ingrid SCHÖNFELDER. Léčivé rostliny. Praha: NS Svoboda, 2001. Příroda do kapsy (NS Svoboda). ISBN 80-205-1017-6.
- [9] Levandule. In: SRecepty [online]. General Recipe, 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://srecepty.cz/ingredience/levandule>
- [10] KYBAL, Jan a Jiřina KAPLICKÁ-FLOROVÁ. Naše a cizí koření. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1981. ISBN 07-027-88.
- [11] Měsíček lékařský. In: Abeceda zahrady [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: Abecedazahrady.cz
- [12] ZENTRICH, Josef Antonín. Zentricova encyklopedie fytoterapie: Aencyclopaedia phytotherapeutica Centriciana. Olomouc: Fontána, 2014. ISBN 978-80-7336-389-5. S. 284-286
- [13] Rozmarýn lékařský. In: Dobré rady a nápady [online]. DG PRO, 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://dran.webnoviny.sk/rozmarinovy-caj-lieci-cisti-aj-povzbudzuje/>
- [14] SLAVÍK, Bohumil a Jitka ŠTĚPÁNKOVÁ, ed. Květena České republiky. Praha: Academia, 2011. ISBN 80-200-1161-7. S. 245-246
- [15] Heřmáněk pravý. In: Esenciální olejíčky [online]. Brno [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.esencialniolejicky.cz/Hermanek-pravy-5-ml-d145.htm>
- [16] GRYGÁRKOVÁ, Simona. Šalvěj lékařská. CELOSTNÍ MEDICÍNA [online]. 2007 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/salvej-lekarska-salvia-officinalis.htm>
- [17] Šalvěj lékařská. In: Zdraví - nemoc [online]. PROMOPRODUKCE CZ, 2015 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.zdravi-nemoc.cz/salvej-lekarska-krasa-ktera-pomaha>
- [18] OPLETAL, Lubomír a Věra SKŘIVANOVÁ, ed. Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-802-4618-012.

- [19] BURT, S. A., REINDERS, R. D. (2003): Antibacterial activity of selected plant essential oil against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3): 162–167
- [20] ŠTÍTEK A KOL.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 8071697044.
- [21] HALLIWELL, Barry. How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications*. 1990, (9), 1-32.
- [22] The volatile oils. By E. Gildemeister and Fr. Hoffmann. Second Edition by E. Gildemeister. Authorised translation by Edward Kremers. Second Volume. Pp. xx. 686. (London: Longmans, Green and Co., 1920.) Price 32s. net. *Journal of the Society of Chemical Industry*. 1921, 40(1), R20-R20. DOI: 10.1002/jctb.5000400115. ISSN 03684075. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5000400115>
- [23] Eugenol. BIOOO.cz [online]. Praha, 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/eugenol/>
- [24] CALVERO. Chemická struktura eugenolu. In: Wikipedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eugenol_acsv.svg
- [25] Moxa. Tradiční čínská medicína [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/11-1-Moxa>
- [26] Borneol. PubChem [online]. 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Borneol#section=Top>
- [27] Limonene. BIOOO.cz [online]. Praha, 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/limonene/>
- [28] Thujon. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-. Dostupné také z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Thujon>
- [29] MILOŠ, Suchý, Herout VLASTIMIL a Šorm FRANTIŠEK. Způsob výroby guajazulenu. Česká republika.
- [30] Bisabolol. BIOOO.cz [online]. Praha, 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/bisabolol/>
- [31] Chamazulen. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chamuzulan>
- [32] , Edgar181. 2011. [Chamazulene]. In: <https://en.wikipedia.org> [online]. -: -. Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chamazulene#/media/File:Chamazulene.svg>
- [33] Myrcen [online]. Cannapedia, 2017 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.cannapedia.cz/cs/obsahove-latky-v-konopi/myrcen>
- [34] Citronellol. BIOOO.cz [online]. Praha, 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/citronellol/>
- [35] MARTIN, Debra, Jennifer VALDEZ, James BOREN a Michael MAYERSOHN. Dermal Absorption of Camphor, Menthol, and Methyl Salicylate in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2004, 44(10), 1151-1157. DOI: 10.1177/0091270004268409. ISSN 00912700. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1177/0091270004268409>

- [36] Edgar181. Chemická struktura kafru. In: Wikipedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kafr#/media/File:Camphor_structure.png
- [37] HYNIE, Sixtus. Základy farmakologie. Praha: Triton, 1999. Levou zadní. ISBN 80-725-4048-3.
- [38] ZAHRADNÍČEK, Ondřej. Přehled antimikrobiálních látek. Brno, 2012. Dostupné také z: https://is.muni.cz/auth/el/1411/podzim2014/VLLM0522c/um/35388114/Prehled_anti_mikrobiálních_látek.pdf
- [39] ZEMANOVÁ, Jana. Kosmetická chemie - přednášky. Brno, 2015.
- [40] Kultivace bakterií: Půdy, podmínky a metody. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. Fakulta veterinárního lékařství: Mikrobiologie pro farmaceuty. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [41] BAŠKA, Roman. Analýza genů kódujících lytické enzymy účinné proti *Propionibacterium acnes* [online]. Brno, 2016 [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/422936/prif_b/RB-BP-pre-verejnost.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie.
- [42] FU, Yujie, Yuangang ZU, Liyan CHEN, Thomas EFFERTH, Huili LIANG, Zhiguo LIU a Wei LIU. Investigation of Antibacterial Activity of Rosemary Essential Oil against *Propionibacterium acnes* with Atomic Force Microscopy. *Planta Medica*. 2007, 73(12), 1275-1280. DOI: 10.1055/s-2007-981614. ISSN 0032-0943. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-981614>
- [43] CAPOOR, Manu N., Filip RUZICKA, Tana MACHACKOVA, et al. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in Intervertebral Discs of Patients Undergoing Lumbar Microdiscectomy: A Prospective Cross-Sectional Study. *PLOS ONE*. 2016, 11(8), e0161676-. DOI: 10.1371/journal.pone.0161676. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0161676>
- [44] EISHI, Yoshinobu. 2013. *Propionibacterium acnes* as a Cause of Sarcoidosis. *Sarcoidosis*. InTech, (-), 1-33.
- [45] VOHRADNÍKOVÁ, Olga. *Acne vulgaris*. *Dermatologie pro praxi*. 2010, 4(1), 51-54.
- [46] JABORNÍKOVÁ, Iva. Charakteristika kmenů *Escherichia coli* izolovaných od pacientů se zánětlivým onemocněním střev [online]. Brno, 2015 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/375825/prif_m/Charakteristika_kmenu_Escherichia_coli_izolovaných_od_pacientu_se_zánětlivým_onemocněním_střev.pdf. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [47] MICENKOVÁ, Lenka. Bacteriocinogeny in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains [online]. Brno, 2016 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/229962/lf_d/dizertacna_praca_Micenková.pdf](https://is.muni.cz/th/229962/lf_d/dizertacna_praca_Micenкова.pdf). Disertační práce v oboru Lékařská biologie. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- [48] *E. Coli Bacterium Under Microscope*. 2017. In: ArtsOnEarth: Best Cool Pictures! [online]. -: -. Available at: <http://artsonearth.com/2011/05/e-coli-bacterium-under-microscope.html>
- [49] NASRI, Hamid et al. 2015. Medicinal Plants for the Treatment of *Acne Vulgaris*: A Review of Recent Evidences. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(11), -. DOI: 10.5812/jjm.25580. ISSN 2008-3645.

- [50] Fact Sheet: *Micrococcus luteus*. 2017. In: WickhamLaboratories [online]. United Kingdom. Available at: <https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-micrococcus-luteus/>
- [51] *Micrococcus luteus*. 2014. In: WIKIMEDIA COMMONS [online]. Available at: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Micrococcus_luteus_Standard_I_13-Strich_47.jpg
- [52] BETHEA, E. K., B. J. CARVER, A. E. MONTEDONICO a T. B. REYNOLDS. The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. ISBN 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.030072-0>
- [53] Oportunní. Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/oportunni>
- [54] Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(1):80-96.
- [55] *Candida galbrata*. In: [Http://www.jcm.riken.jp](http://www.jcm.riken.jp) [online]. Japan. Available at: http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_keyword?AN=Torulopsis&BN=glabrata&CN=&DN=
- [56] STAUFČÍKOVÁ, Tereza. *Acne vulgaris a výživa* [online]. Brno, 2016 [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/fln1m/Bakalarska-prace.pdf>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- [57] JULÁK, Jaroslav. Úvod do lékařské bakteriologie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.
- [58] RULCOVÁ, Jarmila. 2007. ACNE VULGARIS - OD ETIOPATOGENEZE PO TERAPII. *Pediatr pro Praxi*. 2007(1), 1-2.
- [59] ŽÁČKOVÁ, K. Využití technického konopí do kosmetiky proti akné. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
- [60] ZHAO, Qingliang, Cuixia DAI, Shanhui FAN, Jing LV a Liming NIE. Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by OCT and diffuse reflectance spectroscopy. DOI: 10.1038/srep34954. ISBN 10.1038/srep34954. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep34954>].
- [61] CASTRO, Ana H. F., et al. Influence of Photoperiod on the Accunulation of Allantoin in Comfrey Plants. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 2001, 13(1): 49-54. Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/rbfv/v13n1/9272.pdf> [62] SAQIB, Muhammad, Baohua LOU, Mohamed Ibrahim HALAWA, et al. Chemiluminescence of Lucigenin–Allantoin and Its Application for the Detection of Allantoin. *Analytical Chemistry*. 2017, 89: 1863-1869. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04271. ISBN 10.1021/acs.analchem.6b04271. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04271>.
- [62] DO COUTO, Fabíola Maria Marques, Silene Carneiro DO NASCIMENTO, Silvio Francisco Pereira JÚNIOR, Vanessa Karina Alves DA SILVA, André Ferraz Goiana LEAL, Rejane Pereira NEVES a Kyu Joong AHN. Antifungal activity of the piroctone olamine in experimental intra-abdominal candidiasis: A Single-Center, Open-Label Split-Face Clinical Study. DOI: 10.1186/s40064-016-2130-8. ISBN 10.1186/s40064-016-2130-8. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2130-8>

- [63] Problem-solving regulation.(shampoos from Goldwell Cosmetics USA Inc.)(Brief Article). Global Cosmetic Industry [online]. Allured Publishing, 2005, 173(9), 10 [cit. 2019-04-29]. ISSN 1523-9470.
- [64] Effect of stable antimicrobial nano-silver packaging on inhibiting mildew and in storage of rice. 2017. Food Chemistry. -(215), 477-482.
- [65] BERK, Zeki. Extraction. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-415923-5.00011-3. ISBN 10.1016/B978-0-12-415923-5.00011-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124159235000113>
- [66] Masarykova Univerzita. Spektrofotometrie, Extrakce [online]., 8 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BLKBC0211p/um/Spektrofotometrie_a_pipetovani.pdf?lang=cs, http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtechohold/soubory/operace/separacni_metody/extrakce.pdf
- [67] Separáční metody [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: read: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>
- [68] RAPLEY, Ralph. a John M. WALKER. Molecular biomethods handbook. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, c2008. ISBN 978-1-60327-370-1.
- [69] OBRUČA, Stanislav. Metody analýzy biologických systému - přednášky. Brno, 2016.
- [70] JAKUBEC, Martin and Jitka ČEJKOV . -. Emulze: P rprava a stabilizace. Praha. Návod p rce. Vysok  škola chemicko-technologick  v Praze.
- [71] Feřtekov , V. a kol. Kosmetika v teorii a praxi. 4. vyd. Praha: Maxdorf, 2005, 341 s. ISBN 80-7345-046-1
- [72] Testace a certifikáty. BIOOO.CZ [online]. Praha [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/certifikaty>
- [73] Notifikace kosmetických p rpravk : Evropsk  portál (CPNP). Ministerstvo zdravotnictví České republiky [online]. Praha, 2010 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/notifikace-kosmetickych-pripravku-evropsky-portalcnpn-_12884_1096_5.html
- [74] Kosmetick  p rpravky. Ekotox [online]. Brno, 2011 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://cz.ekotox.eu/kosmeticke-pipravky>
- [75] AGRICULTURE BIOLOGIQUE. In: BIOOO.CZ [online]. Praha, 2014 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/certifikaty/agriculture-biologique/>
- [76] COSMOS. In: BIOOO.CZ [online]. Praha, 2014 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/certifikaty/cosmos/>
- [77] Encyklopedie INCI. In: Biooo.cz [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/inci>
- [78] SYROV , V t. [2015]. Tajemství kosmetiky. 1. Praha: V t Syrov .

11 SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
λ	vlnová délka
m	hmotnost
V	objem
t	teplota
ABTS•+	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
nm	nanometr
MO	mikroorganismus
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
SDS	dodecylsírán sodný
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
PM	pleťové mléko
O/V	emulze O/V
YPD	Yeast Extract–Pepton–Dextrose
NB	Nutrient Broth
LB	Lysogeny broth
BHI	Bujón Brain–Heart–Infusion