

Modifikace antimikrobní složky kosmetických gelů

Bc. Eliška Bochňáková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Bochňáková**
Osobní číslo: **T12401**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**
Téma práce: **Modifikace antimikrobní složky kosmetických gelů**

Zásady pro vypracování:

- 1. Provedte literární rešerši zaměřenou na gelotvorné látky, jejich vlastnosti, způsoby přípravy gelů a možnosti jejich využití v průmyslu, především kosmetickém. Dále se věnujte přehledu antimikrobních látek, které se v kosmetických přípravcích využívají. Získané poznatky kriticky zhodnoťte.**
- 2. V praktické části se věnujte optimalizaci přídavku a druhu antimikrobní složky gelu, s ohledem na mikrobiologickou účinnost přípravku.**
- 3. Dosažené výsledky diskutujte.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

SCHLOSSMAN M. L.: The Chemistry and Manufacture of Cosmetics Volume I.-III. ? Science. Allured Publishing Corporation, 2009.

ROMANOWSKI, P., SCHUELLER, R.: Practical knowledge for the cosmetic industry, 3rd. ed., Carol Stream, Alluredbooks, 2009

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

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavlína Egner, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

POUNAVSKA ERISKA

Obor:

UTP-20

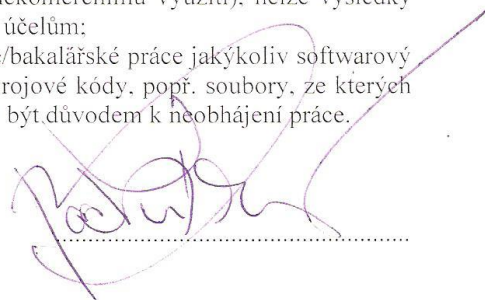
PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

12.5.2014



²¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Práce se zabývá přípravou antimikrobiálních gelů tvořených alternativními antimikrobiálními složkami (kyselina mandlová, esenciální oleje). K vlastní přípravě gelů byla použita gelotvorná látka na bázi syntetických pryskyřic. Testování antimikrobiálního účinku vytvořených gelů probíhalo vůči vybraným fyziologicky významným gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím a kvasinkám. Výsledky ukazují, že kyselina mandlová a vybrané esenciální oleje jsou v synergickém vztahu a v gelové kompozici jeví vysoké inhibiční účinky, a to jak na vybrané mikroorganismy, tak na samotné pokožce rukou. Po sensorické stránce byly gely s přídavkem kyseliny mandlové, esenciálních olejů z tymiánu, hřebíčku, skořice a citrónu lépe hodnoceny než komerční antimikrobiální gel s přídavkem ethanolu.

Klíčová slova: antimikrobiální gel, ethanol, kyselina mandlová, esenciální olej

ABSTRACT

This work deals with a preparation of antimicrobial gels composed of alternative antimicrobial components (mandelic acid, essential oils). The gel-creative substance based on synthetic resins was used for actual preparation of gels. Antimicrobial effect of created gels was tested towards selected gram-positive, gram-negative bacteria and yeasts, which are physiologically relevant. Results show that a mandelic acid and selected essential oils are related synergetically, and moreover in a gel composition they inflict extensive inhibition effects, both on selected microorganisms and so on hand skin. From the sensory perspective the gels with mandelic acid, thyme, clove, cinnamon and lemon essential oils addition were evaluated better than commercial antimicrobial gel with ethanol addition.

Keywords: Antimicrobial Gel, Ethanol, Mandelic Acid, Essentials Oil

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Pavlíně Egner Ph.D. za její trpělivost, vstřícnost, cenné rady, poskytnuté materiály a zejména za inspirativní a obětavé vedení, které mi při tvorbě této práce velmi pomohly.

V neposlední řadě také děkuji laborantkám za praktické rady a dále všem probandům, kteří se podíleli na praktické části diplomové práce.

Rovněž děkuji své rodině za morální i finanční podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOŽNÍ MIKROFLÓRA	12
1.1 BAKTERIÁLNÍ MIKROFLÓRA RUKOU	13
1.2 REZIDENTNÍ MIKROFLÓRA	14
1.3 TRANSIENTNÍ MIKROFLÓRA.....	15
1.4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÁLNÍCH DRUHŮ KOLONIZUJÍCÍCH NA KŮŽI ČLOVĚKA	16
1.4.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	16
1.4.1.1 Plasmakoaguláza negativní stafylokoky	16
1.4.1.2 Plasmakoaguláza pozitivní stafylokoky.....	16
1.4.2 Rod <i>Micrococcus</i>	16
1.4.3 Rod <i>Propionibacterium</i>	17
1.4.4 Rod <i>Pseudomonas</i> a další gram-negativní bakterie	17
1.5 REDUKCE TRANSIENTNÍ MIKROFLÓRY NA RUKOU	17
1.5.1 Hygienická dezinfekce rukou.....	19
2 GELOVÉ DEZINFEKČNÍ PŘÍPRAVKY	20
2.1 DEFINICE GELŮ.....	20
2.2 KLASIFIKACE GELŮ	21
2.2.1 Hydrogely.....	21
2.2.2 Lipogely	22
2.3 CHARAKTERIZACE SÍŤOVÁNÍ POLYMERNÍCH GELŮ	22
2.4 GELOTVORNÁ ČINIDLA	23
2.4.1 Carbomer.....	23
2.4.1.1 Tvorba syntetického polymerního gelu	24
2.4.2 Karboxymethylcelulóza	26
2.4.3 Methylcelulóza.....	27
2.5 REOLOGICKÉ VLASTNOSTI GELŮ.....	28
3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY V DEZINFEKČNÍCH PŘÍPRAVCÍCH	30
3.1 ALKOHOLY.....	30
3.1.1 Ethanol	32
3.2 NETRADIČNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	32
3.2.1 Hydroxykyseliny	33
3.2.1.1 Kyselina mandlová	34
3.2.2 Esenciální oleje	35
3.2.2.1 Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů	36
3.2.2.2 Skořicový olej	38
3.2.2.3 Tymiánový olej	39
3.2.2.4 Hřebíčkový olej.....	40
3.2.2.5 Citrónový olej	41
4 CÍLE PRÁCE	43
II PRAKTICKÁ ČÁST	44
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45

5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ	45
5.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	47
5.3	PŘÍPRAVA GELŮ.....	47
5.3.1	Měření viskozity.....	48
5.3.2	Měření pH	48
5.3.3	Potenciometrická titrace.....	49
5.3.3.1	Potenciometrická titrace roztoku kyseliny mléčné	49
5.3.3.2	Potenciometrická titrace roztoku carbomeru	50
5.3.4	Příprava gelů s etanolem	50
5.3.5	Příprava gelů s esenciálními oleji	51
5.3.6	Příprava gelů s kyselinou mandlovou	52
5.3.7	Příprava směsných gelů.....	52
5.3.8	Příprava živných médií	54
5.3.8.1	Nutrient agar	54
5.3.8.2	Sabouraud Chloramphenicol agar.....	54
5.3.8.3	Nutrient broth.....	55
5.3.8.4	Müller-Hinton agar	55
5.3.8.5	Tryptonový sójový bujón.....	56
5.3.8.6	Tryptonový sójový agar	56
5.3.9	Disková difúzní metoda	57
5.3.10	Jamková difúzní metoda	58
5.3.11	Doplňková metoda	59
5.3.12	Zkušební metoda dle ČSN EN 1500	59
5.3.12.1	Příprava neutralizátoru	60
5.3.12.2	Příprava pro hygienickou dezinfekci rukou	60
5.3.12.3	Hygienická dezinfekce rukou se zkoušeným gelem	60
5.3.12.4	Hodnoty mikroorganismů po hygienické dezinfekci rukou.....	61
5.3.13	Senzorická analýza antibakteriálních gelů	61
5.3.13.1	Senzorické hodnocení s použitím stupnic	61
5.3.13.2	Pořadová zkouška.....	62
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	63
6.1	VLIV VYBRANÝCH ANTIMIKROBNÍCH LÁTEK NA INHIBICI MIKROORGANIZMŮ	65
6.2	VLIV PŘÍDAVKU ANTIMIKROBNÍCH LÁTEK.....	66
6.3	VLIV JEDNOTLIVÝCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V GELOVÉ KOMPOZICI NA ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST	71
6.4	VLIV SMÍSENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V GELOVÉ KOMPOZICI NA ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST	74
6.5	SROVNÁNÍ ÚČINNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK	77
6.6	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST GELŮ ZA PRAKTICKÝCH PODMÍNEK.....	81
6.7	VYHODNOCENÍ SENZORICKÝCH ZNAKŮ ANTIMIKROBIÁLNÍCH GELŮ	86
	ZÁVĚR	92
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	101
	SEZNAM OBRÁZKŮ	102
	SEZNAM TABULEK.....	104
	SEZNAM PŘÍLOH.....	107

ÚVOD

Je známo, že žijeme ve světě plném mikroorganismů, které osídlují téměř vše, s čím přichází člověk do kontaktu, tzn. nejen okolní materiální svět, který nás obklopuje a působí na nás, ale také bez výjimky pokožku člověka.

Na povrchu kůže zdravých jedinců se nachází různé mikroorganismy, tzn. rezidentní bakterie. Kontaktem pokožky s okolním prostředím dochází k přichycení dalších mikroorganismů na rohovou vrstvu kůže. Tyto mikroorganismy jsou označovány jako transientní bakterie, čili jako transientní mikroflóra. Tato mikroflóra je schopná vyvolat infekci nebo dokonce vyvolat vážné zdravotní onemocnění.

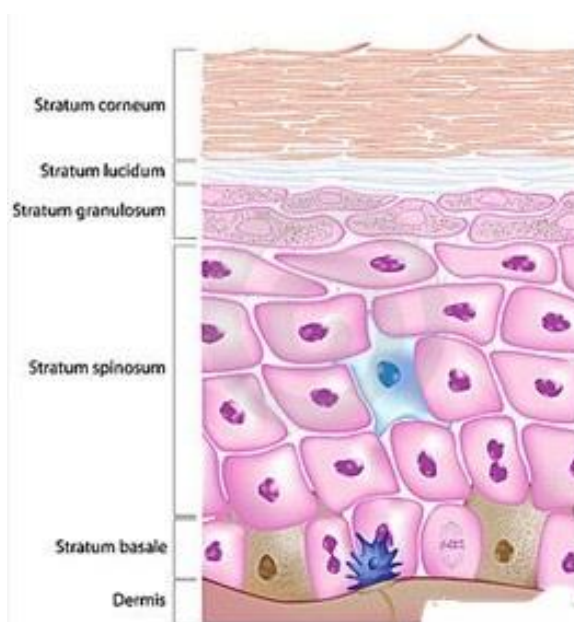
Transientní mikroflóra, resp. její jednotliví zástupci se vyskytují nejen v hromadné dopravě, ale i na klávesnicích počítačů, na telefonech, na nápojových automatech, na madlech (např. ve fitness centrech), a ideálním prostředím pro bakterie transientní mikroflóry jsou také kliky. Se všemi těmito potenciálními přenašeči přicházíme i několikrát denně do kontaktu. Proto je doporučeno po styku s těmito, ale i mnoha dalšími potenciálními přenašeči, mytí rukou vodou a mýdlem. V případech, kdy nemáme k dispozici vodu a mýdlo, by měl být primárně užít ruční sanitizér.

V současné době trh disponuje širokou škálou těchto produktů. Je ale potřeba podotknout, že téměř všechny jsou obdobného složení. Jedná se především o dezinfekční gely na bázi ethanolu, případně ethanolu s přídatnými látkami. Obsah ethanolu v dezinfekčních gelech bývá v rozmezí od 45 – 80 %. Při těchto koncentracích dochází k potlačení, příp. usmrcení mikroorganismů osídlujících pokožku rukou, ale také dochází k její dehydrataci. Při časté aplikaci gelů s touto antimikrobiální látkou může docházet k vysušení a následnému popraskání rohové vrstvy kůže. Což je jednak bolestivé, a jednak tím může docházet k rozvoji infekce, protože v prasklinách se usídlují mikroorganismy, které lze jen velmi obtížně odstranit.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOŽNÍ MIKROFLÓRA

Lidská kůže se skládá ze tří částí. První je pokožka (*epidermis*), druhá vrstva je škára (*dermis*) a poslední, třetí vrstvou je podkožní tkáň. *Epidermis* je vnější vrstva kůže, která tvoří ochrannou bariéru proti vlivům vnějšího prostředí (např. toxinům a bakteriím) a brání nadměrné ztrátě vody z kůže. *Epidermis* je tvořena převážně keratinocyty, které jsou produkovány bazální, nejspodnější vrstvou *epidermis* a postupně se posouvají směrem ke kožnímu povrchu. Mezitím procházejí řadou změn a vytvářejí pět odlišných vrstev: rohová vrstva (*stratum corneum*), vrstva jasná (*stratum lucidum*), vrstva zrnitá (*stratum granulosum*), vrstva ostnitá (*stratum spinosum*) a vrstva bazální (*stratum basale*). Jednotlivé vrstvy jsou znázorněny na Obr. 1 [1].



Obr. 1. Struktura epidermis [1]

Zevní vrstva *epidermis* (*stratum corneum*) je složená z přibližně dvaceti vrstviček oploštěných odumřelých buněk, tzv. korneocytů, které jsou připojeny k sobě a vytváří tak tvrdou rohovou vrstvu keratinu ve směsi s kožními lipidy. Ve chvíli, kdy se buňky dostávají do této vrstvy, jsou již zcela deskvamovány a nejsvrchněji uložené buňky se rovnoměrně odlupují. Tento proces se nazývá deskvamace. Těsně naskládané buňky spodních partií rohové vrstvy tvoří prostupnou bariéru, která chrání kůži před vlivy vnějšího prostředí. Nové vrstvy pokožky jsou tvořeny přibližně denně a zcela se obmění za 3 – 4 týdny [1].

Rozhodující význam pro soudržnost *stratum corneum*, antimikrobiální funkci, udržení integrity a v neposlední řadě epidermální permeabilitu má kyselý plášť na povrchu pokožky. pH kožního povrchu se pohybuje v rozmezí od 4,5 – 5,5. Ve srovnání s normálním fyziologickým pH je tedy mírně kyselé. Podílí se na tom pot, který obsahuje některé organické kyseliny [2].

1.1 Bakteriální mikroflóra rukou

Mikroflóra osídlující zdravého jedince se vyvíjí v průběhu celé evoluce člověka a mění se v průběhu jeho života. Mění se nejen množství, ale i zastoupení jednotlivých mikroorganismů. Mění se v závislosti na věku, pohlaví, výživě a zdravotnímu stavu, podnebí, geografické lokalitě, osobní hygieně, ale i na bydlení, pracovním prostředí, životním stylu a na celé řadě dalších vlivů. Mikroflóra zdravého jedince bývá označována jako vlastní nebo vrozená, což je poněkud nepřesné, neboť člověk se rodí sterilní a je teprve postupně zvenčí osídlován mikroorganismy. Často je též používán termín normální flóra, který je ovšem definován poněkud neurčitě, vzhledem k výše zmíněné proměnlivosti a nemožnosti stanovení jakési normy jejího složení u různých jedinců [3, s. 124].

Celkový počet mikroorganismů na kůži se mění v závislosti na konkrétním místě. Zastoupení mikroorganismů na rukou a pažích se může pohybovat od cca 100 CFU/cm² do 1 x 10⁶ a více CFU/cm² v závislosti na tom, čeho se dotkneme. Například celkové počty bakterií na rukou zdravotnického personálu jsou v rozmezí od 3,9 x 10⁴ až 4,6 x 10⁶ CFU. Tvář má často vyšší počet mikrobiálních kolonií než mnoho jiných kožních míst, a to proto, že je více vlhká (zejména T-zóna kolem očí, nosu a úst) a zahrnuje oblasti bohaté na maz (např. čelo, nos a nosoretní rýhy), kde počet stafylokoků a *Propionibacterium* může být vyšší než 10⁶ CFU/cm². Dále lze uvést, že v axilách se nachází přibližně 5 x 10⁵ CFU/cm² aerobních bakterií a 1 x 10⁴ CFU/cm² na předloktí [4, s. 212], [5, s. 10].

Na kůži jsou přítomny jak nepatogenní, tak patogenní mikroorganismy, které udržují nízké pH. Při poranění kůže mohou do podkoží pronikat mikrobi a může docházet ke vzniku zánětu kůže. Příslušníci mikroflóry rukou člověka mohou být rozděleni na trvale osídlující (rezidentní) mikroflóru, která je tvořena mikroorganismy, které se pravidelně v dané oblasti a věku vyskytují. Jestliže je tato mikroflóra porušená, rychle se obnovuje. Dále se na pokožce vyskytuje přechodná mikroflóra (transientní), která pochází z vnějšího

prostředí. Tato mikroflóra představuje mikroflóru kontaminující, která může po krátkou dobu na pokožce přežívat, může se jednat o hodiny, dny a dokonce i týdny. Například počet kontaminujících mikroorganismů na špičce prstu se pohybuje v rozmezí od 0 do 300 CFU/cm². Počet transientní a rezidentní mikroflóry se mezi jednotlivci značně liší, je však často relativně konstantní pro daného jedince [5, s. 10], [6, s. 76], [7, s. 196].

Rezidentní bakterie jsou na neporušené kůži oproti gram-negativním transientním druhům schopny přežít delší dobu. Významnou vlastností rezidentní mikroflóry je její ochranné působení vůči patogenním mikroorganismům, vůči kterým je v antagonistickém postavení. Mikroflóra zabraňuje kolonizaci patogeny tím, že navazuje na receptory buněk kůže pomocí tzv. adhezínů a vytváří na nich biofilm. Na takto chráněných místech se patogeny usazují jen obtížně. Některé bakterie mohou produkovat inhibiční látky, zejména specifické antimikrobní látky (bakteriociny, antibiotika) [4, s. 211], [8, s. 113].

1.2 Rezidentní mikroflóra

Převážná většina rezidentní mikroflóry se nachází v povrchových vrstvách *epidermis*, a to konkrétně ve *stratum corneum*. Menší část rezidentní mikroflóry osídluje vývody potních a tukových žláz, vlasové folikuly a nehtová lůžka. Tato menší část mikroflóry je umístěna hlouběji v kůži tak, aby bylo zamezeno přístupu dezinfekčních látek. Tato nepřístupná flóra slouží jako rezervoár pro mikroorganismy, které byly odstraněny dezinfekčními prostředky. Mikroorganismy se vyskytují na kůži ve formě malých mikrokolonií, které bývají zapouzdřeny extracelulárními polymery. Jednotlivé bakterie nebo jejich shluky se mohou z mikrokolonií uvolňovat vlastním pohybem nebo proudem okolní kapaliny. Tyto mikrokolonie se nacházejí nejvíce v povrchových vrstvách rohoviny nebo v mazových žlázách napojených na vlasový kanálek v tzv. pilosebaceózních folikulech, jak je tomu i v případě *Propionibacterium*. Tyto mikrokolonie nelze z povrchu kůže odstranit, lze pouze snížit jejich počet, a to pouze v případě užití těch nejsilnějších hygienických dezinfekčních přípravků. Proto se uvádí, že až 20 % této mikroflóry nelze odstranit ani chirurgickým mytím rukou [1], [6, s. 76], [7, s. 196], [9, s. 34], [10, s. 295].

Do rezidentní mikroflóry jsou započítávány mikroorganismy, které žijí s lidským organismem v komenzálním nebo mutualistickém vztahu, což znamená, že nezpůsobují žádnou škodu, příp. s mikroorganismem kooperují. Dominantním druhem, který je zastoupen v rezidentní flóře je *Staphylococcus epidermidis*. Mezi další bakterie se řadí *Staphylococcus homidis* a jiné koaguláza-negativní stafylokoky, koryneformní bakterie

(*Propionibacterium*, *Corynebacterium*, dermobakterie) a mikrokoci. Mezi nejčastější druh plísni, který se vyskytuje u rezidentní mikroflóry pokožky, patří *Malassezia spp.* Dále jsou na kůži zastoupeny kvasinky rodu *Candida* [5, s. 10], [11, s. 222].

Mikroorganismy, které zastupují rezidentní mikroflóru kůže, jsou také závislé na ročním období. V zimě je vyšší zastoupení mikrokoků, oproti tomu v létě je více koliformních bakterií. U této mikroflóry je menší pravděpodobnost vzniku infekce. Infekci tedy mohou způsobit pouze ve sterilních tělních dutinách, očích, příp. může dojít k infekci v situaci, kdy byla snížena imunita jedinců (např. po chirurgickém zákroku, popáleninách, aj.) [5, s. 10], [12, s. 112 - 113].

1.3 Transientní mikroflóra

K transientní mikroflóře patří mikroorganismy, které se dostávají na kůži náhodně z vnějšího prostředí a ulpívají na ní poměrně krátkou dobu. Jedná se především o nepatogenní nebo potenciálně patogenní mikroorganismy, které obývají kůži celé hodiny, dny nebo týdny. Tato doba závisí na činnosti mikroorganismů, podmínkách prostředí, aj. Mikroorganismy transientní flóry jsou obecně málo významné, pokud zástupci rezidentní flóry zůstávají beze změny. Nicméně v případě, že rezidentní flóra je narušena, přechodná flóra může kolonizovat, proliferovat a vytvářet onemocnění. Tito mikrobi osídlují povrchové vrstvy kůže, a proto lze jejich počet redukovat i běžnou hygienou. Transientní mikroorganismy přežívají na povrchu kůže a velmi ojediněle se na ní množí. Tato mikroflóra se často získává během přímého kontaktu s lidmi, pacienty nebo z kontaminovaných povrchů. Přenosnost transientní mikroflóry závisí na přítomnosti daného druhu a počtu mikroorganismů na povrchu kůže a také na její vlhkosti [4, s. 212], [13, s. 337].

Mezi typické zástupce transientní mikroflóry se řadí nejen gram-negativní rody, ale také gram-pozitivní rody. Předpokládá se, že transientní bakterie osídlují kožní povrch z přírodních zdrojů nebo z jiných rezervoárů lidského těla, např. z gastrointestinálního traktu. Tyto mikroorganismy jsou schopné se množit ve formě mikrokolonií na zdravé kůži a ty pak způsobují kožní infekce. Jedná se např. o bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Další potenciálně patogenní transientní bakterie vyskytující se na pokožce rukou jsou patogenní kmeny *E. coli*, *Salmonella spp.* a *Listeria monocytogenes* [13, s. 337].

1.4 Charakteristika vybraných bakteriálních druhů kolonizujících na kůži člověka

Mikroorganismy, které osídlují pokožku rukou, mohou být gram-pozitivní (G^+) bakterie rodu *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* a gram-negativní (G^-) bakterie.

1.4.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram-pozitivní bakterie, přičemž většina z nich je aerobních. V prostředí stafylokoky primárně osídlují povrch těla člověka i zvířat. Rod *Staphylococcus* v sobě zahrnuje mnoho druhů, které se rozdělují dle produkce plasmakoagulázy na druhy plasmakoaguláza pozitivní a negativní. Většina virulentních kmenů plasmakoagulázu vytváří, proto se jedná o rozhodující znak při jejich určování [14, s. 22 – 23].

1.4.1.1 Plasmakoaguláza negativní stafylokoky

Bylo identifikováno více než 30 druhů těchto stafylokoků. Jedná se o typické potenciální patogeny. U slabého organismu mohou způsobovat těžké až smrtelné infekce. Také tvoří řadu enzymů a toxinů, pomocí nichž mohou vyvolat i toxický šok. Mezi nejčastější původce se řadí *S. epidermidis* a *S. saprophyticus* [14, s. 26 – 27].

1.4.1.2 Plasmakoaguláza pozitivní stafylokoky

Typickým zástupcem je *Staphylococcus aureus*, který je považován za striktního patogena. *Staphylococcus aureus* se vyskytuje převážně v oblasti nosních dírek (až z 30 %), ale může se také vyskytovat i v jiných oblastech pokožky zdravého jedince. Bylo prokázáno, že *Staphylococcus aureus* se vyskytuje trvale pouze u 20 – 40 % zdravých osob, u jiných osob byla zjištěna jeho absence. U těchto osob může způsobovat kožní infekce, zvláště při poškození pokožky. Proto se *Staphylococcus aureus* řadí do transientní mikroflóry. Může způsobovat různé hnisavé záněty, případně díky produkci toxinů až smrt [14, s. 23 – 24], [15, s. 24 – 25].

1.4.2 Rod *Micrococcus*

Na zdravé kůži jsou tyto bakterie méně zastoupené než bakterie druhu *Staphylococcus*. Mikrokoky se vyskytují v sušších oblastech pokožky a jsou hojně zastoupeny u dětí. Existuje sedm druhů těchto gram-pozitivních koků. Dominantními druhy jsou *Micrococcus luteus*, *Micrococcus variants*, ale také *Micrococcus kristinae* a *Micrococcus sedentarius*

jsou řazeny mezi rezidentní mikroflóru. Mikrokoci způsobují nemoci jen velmi vzácně [10, s. 297].

1.4.3 Rod *Propionibacterium*

Propionibacterium jsou anaerobní, gram-pozitivní, tyčinkovité bakterie, které se nacházejí převážně v mazových žlázách anebo také v hlubších částech vlasových folikulů. V těchto oblastech jsou zejména rozšířeny *Propionibacterium acnes* a *Propionibacterium granulosum*. Hlavní patogenní proces, se kterým je obvykle *P. acnes* spojen je *acne vulgaris*. *Propionibacterium avidum* se nachází ve vlhkých místech pokožky, zejména v podpaží a tříslech [10, s. 297].

1.4.4 Rod *Pseudomonas* a další gram-negativní bakterie

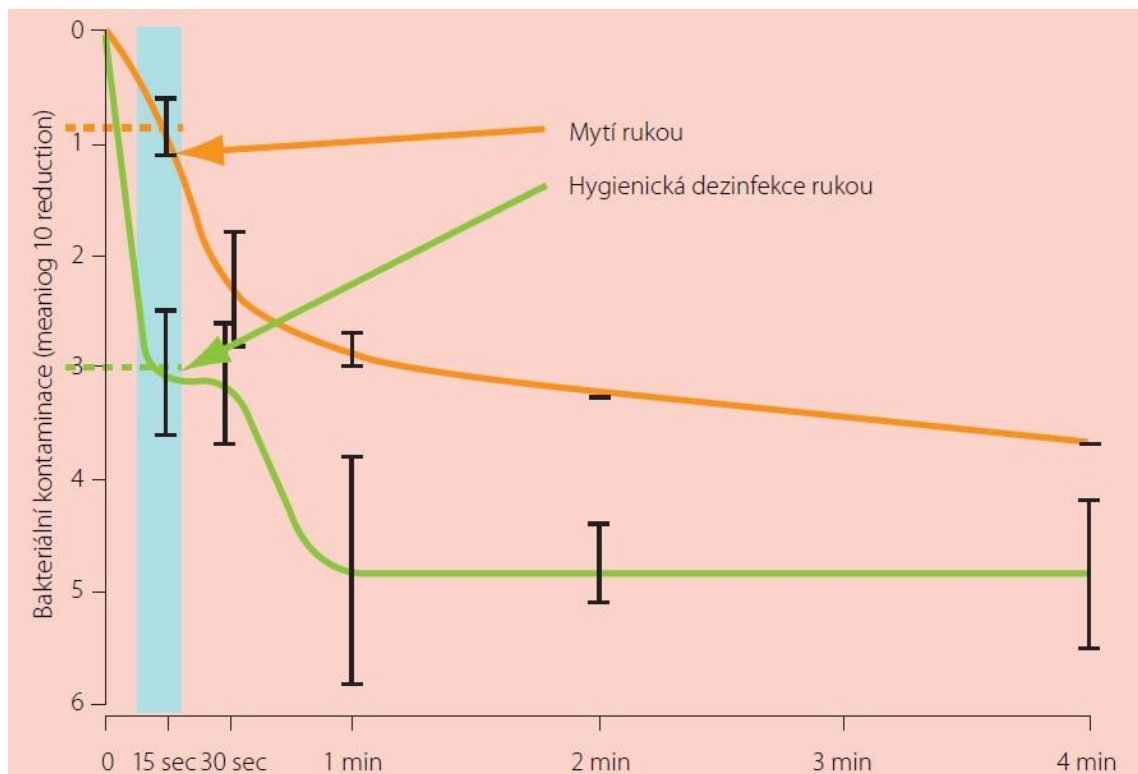
Pseudomonády zahrnují gram-negativní, striktně aerobní tyčky. Běžně se vyskytují ve volné přírodě, v odpadních vodách, ve střevním traktu zvířat i člověka. Z hlediska lékařské mikrobiologie je nejdůležitějším druhem *Pseudomonas aeruginosa*, který patří mezi původce nosokomiálních infekcí. *P. aeruginosa* může způsobit různorůzné hnisavé léze, zvláště kožní a ranné infekce. Může se vyskytovat při infekcích očí, kloubů, dýchacích cest, aj. [14, s. 70].

Další gram-negativní bakterie tvoří u zdravých jedinců poměrně malý podíl kožní mikroflóry. *Acinetobacter*, který je původně známý jako *Mima* a *Herellea*, zastupuje přibližně 25 % mikroflóry pokožky, zejména se nachází ve vlhkých místech, tj. podpaží, třísla, na ploskách nohou, v loketních jamkách, aj. *Acinetobacter* způsobuje infekce pouze ve vzácných případech. Další gram-negativní mikroorganismy se na kůži nacházejí velmi zřídka, jedná se především o bakterie vyskytující se na ruce, tj. *Protheus*, *Enterobacter* a *Krebsiella* [10, s. 298].

1.5 Redukce transientní mikroflóry na rukou

Hygienická dezinfekce kůže, zejména rukou, je považována za jeden z hlavních mechanismů ke snížení rizika přenosu infekčních agens získaných jak přímým kontaktem, tak fekálně – orální cestou. Dle evropské normy ČSN EN 1500 je hygienická dezinfekce rukou postup po předchozí kontaminaci, která zahrnuje vtírání baktericidního přípravku určeného proti transientním mikroorganismům na povrch rukou bez použití vody s cílem zabránit jejich přenosu bez ohledu na rezidentní mikroflóru kůže. Transientní bakterie

Staphylococcus aureus, včetně gram-negativních mikroorganismů, jsou obvykle přítomny na kůži v malých množstvích a mohou často být odstraněny nebo sníženy na velmi malé množství mýdlem a vodou. Nicméně v některých případech je nutná vyšší míra bezpečnosti a je potřeba užít dezinfekční přípravky pro spolehlivé usmrcení přechodné mikroflóry. Srovnání účinnosti hygienické dezinfekce a mytí rukou znázorňuje Obr. 2 [16, s. 1287], [17], [18, s. 923], [19, s. 234 – 235].



Obr. 2. Závislost redukce bakteriální kontaminace na čase [20, s. 308]

Ruční sanitizéry patří k nejdůležitějším opatřením proti přenosu infekčních nákaz. Jsou snadno použitelné, zejména jako účinný nástroj pro kontrolu infekce, a také přispívají k podstatnému snížení nemocnosti a úmrtnosti. Ve srovnání s užitím obyčejného mýdla s vodou lze fyzicky odstranit určitou úroveň mikroorganismů, oproti tomu antimikrobiální látky jsou schopné usmrtit mikroorganismy. Antimikrobiální přípravky jsou navrženy tak, aby rychle eliminovaly většinu přechodné flóry pomocí jejich mechanicky-detergentního účinku a vyvinuly trvalou antimikrobiální aktivitu na ostatní mikroflóry, přičemž dojde ke zpomalení množení rezidentní flóry [21, s. 365 – 366], [22, s. 120].

V rámci dezinfekce rukou je potřeba, aby kůže rukou byla zdravá. Neboť opakovaným a častým mytím rukou může docházet k narušení hydrolipidního povlaku, čímž je vlastní

tuk z kůže je rozpouštěn a odplavován, dochází tedy k jejímu odmaštění. Důsledkem tohoto je kůže hrubá, vysušená a je náchylná k podráždění. Popraskaná a narušená kůže poskytuje ideální úkryt pro mikroorganismy, a dezinfekční přípravky se k nim nedostanou a tím pádem není dezinfekce účinná. Proto je potřeba porušenou kůži promašťovat mastnými krémy a trhlinky a drobné ranky ihned ošetřit [23, s. 60], [24, s. 8].

1.5.1 Hygienická dezinfekce rukou

Hygienická dezinfekce rukou se provádí standardní vtírací technikou. Tato technika je v souladu s normou ČSN EN 1500 pro hygienickou dezinfekci rukou. Nalije se přiměřené množství výrobku do spojených suchých dlaní a přípravek se vtírá po dobu 30 s v souladu se standardním postupem zobrazeným níže tak, aby se jím ruce úplně pokryly (viz Obr. 3). Pohyby se v každém kroku opakují 5 krát, než se přistoupí k dalšímu kroku. Po ukončení posledního kroku se začne celá série opakovat a pokračuje se do vypršení doby specifikující v příbalovém letáku výrobce dezinfekčního přípravku [5, s. 10], [17].



Obr. 3. Návod na správnou hygienickou dezinfekci rukou [24]

2 GELOVÉ DEZINFEKČNÍ PŘÍPRAVKY

Hygienické dezinfekční přípravky na bázi gelových forem nacházejí v současné době široké uplatnění. Jedná se především o to, že gel je považován za kosmetické vehikulum, což znamená, že je nosičem aktivních látek do míst, pro která jsou určena (pleť, kůže, aj.). Dalším velkým pozitivem gelu je, že existuje mnoho jeho forem, které mají celou řadu podobných vlastností a charakteristik (včetně tokových vlastností). Jejich viskozita se může pohybovat od kapalných, tekutých, až po vysoce viskózní gely. Také se mohou vyskytovat ve formě měkkých, pevných tyčinek. Konzistence gelu je modifikovatelná i pro různé formy použití, např. spreje, aj. [25, s. 5 – 6], [26, s. 1], [27, s. 251].

Výhodou gelů pro hygienickou dezinfekci rukou je především jejich schopnost se při kontaktu s kožním povrchem se rychle transformovat do tekuté konzistence a rychle se vstřebávat. Na povrchu kůže se tedy dobře roztírají, stejnoměrně se rozpouštějí, dobře se aplikují na všechna místa pokožky rukou a snižují možnost stékání, zajišťují nižší spotřebu, a tím jsou také z ekonomického hlediska výhodnější [28], [29, s. 130].

2.1 Definice gelů

Gel je v širším slova smyslu přípravek na bázi vody, který je zahuštěný polymery či jinými látkami o vysoké molekulové hmotnosti. V užším slova smyslu jsou gely disperzní systémy (původně roztoky), v nichž jsou disperzní částice spojeny do trojrozměrné sítě, které prostupují disperzním prostředím. Spojité je zde nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. Po spojení do síťovité struktury se disperzní částice nemohou nezávisle pohybovat disperzním prostředím. I když je disperzní prostředí kapalné, mají gely v důsledku tohoto uspořádání mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav (např. některé gely, i když obsahují až 99,9 hm. % kapaliny, se chovají jako tuhé látky). Síly, které působí adhezi disperzních částic, mohou být jak chemického, tak fyzikálního charakteru. Odstraněním disperzního prostředí (např. vysušením gelu) vzniká systém, který obsahuje pouze disperzní podíl a nazývá se xerogel (původně rosolovitý gel se označuje jako lyogel). Disperzní částice, jejichž spojováním vzniká síťovitá struktura gelu, bývají koloidní velikosti [25, s. 5 – 6], [30, s. 4], [31, s. 216 – 220], [32, s. 551 – 554].

Čisté gely jsou opalescentní nebo transparentní a jasné. Transparentnost gelů je dosažena pouze v případech, že všechny složky jsou rozpuštěny nebo se vyskytují alespoň v koloidní

formě, tj. velikost částice je v submikronové oblasti. Transparentnost se řadí k jedné z velkých výhod gelů [33, s. 160].

2.2 Klasifikace gelů

Gely lze klasifikovat dle řady hledisek, počínaje jejich chemickým složením, až po jejich chování ve vysušeném stavu. Nejčastěji bývají gely klasifikovány podle chování ve vysušeném stavu, a to na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní gely (též elastické) při vysoušení zmenšují svůj objem a přecházejí na kompaktní xerogely. Při styku s disperzním prostředím přecházejí zpět do původního stavu tzv. botnáním, tj. schopností přijímat molekuly disperzního prostředí. Prostorová struktura reverzibilního gelu je tvořena sítí makromolekulárních řetězců spojených v místech, které se nazývají uzly, uzlové body nebo uzlové oblasti. Reverzibilní gely mohou vznikat buď z roztoků vysokomolekulárních látek gelací nebo z xerogelů botnáním. Příkladem těchto gelů jsou kopolymery styrenu a divinylbenzenu, agarosy, polyakrylamidu apod. Ireverzibilní gely (neelastické) při vysoušení takřka nezmenšují svůj objem, jsou však vysoce porézní. Při styku s disperzním prostředím jsou sice schopny absorbovat značné množství kapaliny, ale do rosolovitého stavu původního gelu se nevrátí. Ireverzibilní gely vznikají želatinizací lyofobních solů [31, s. 216 – 220], [32, s. 551 – 554], [34, s. 37], [35, s. 30].

Gely také mohou být děleny na základě chemického složení disperzního podílu, a to na anorganické a organické gely. Dále mohou být děleny na základě disperzního prostředí na hydrogely s vodným disperzním prostředím a na lipogely, jejichž disperzní prostředí tvoří látky tukové povahy [31, s. 216 – 220], [35, s. 30].

2.2.1 Hydrogely

Jedná se o systém hydrofilní povahy. Konkrétně se jedná o průhledné rosolovité substance, jejichž základ tvoří značné množství vody (85 – 95 %), nebo jej tvoří vodně alkoholové prostředí spolu s gelotvornými látkami. Ty obvykle tvoří organické polymerní sloučeniny, jako např. polyakrylické kyseliny, methylcelulózy nebo neionické celulózové ethery [35, s. 30].

Jejich použití na kůži závisí na konkrétním složení. Po aplikaci mají většinou mírný ochlazující účinek, a to v důsledku odpařování rozpouštědla (vody, alkoholu, popř. jejich směsi) z povrchu. Při delším nebo opakovaném nanášení může dojít k mírné dehydrataci

kůže, zejména její povrchové vrstvy (*stratum corneum*). Z tohoto důvodů mohou být do hydrogelů přidávány humektanty, jako např. glycerol [30, s. 6 – 7], [35, s. 30].

2.2.2 Lipogely

Základ lipogelů neboli oleogelů je tvořen velkým množstvím tukových látek a dále gelotvornými látkami (např. koloidním oxidem křemičitým) [35, s. 30].

2.3 Charakterizace síťování polymerních gelů

Na základě síťování mohou být reverzibilní gely rozděleny na ty, které vznikají pomocí chemických reakcí (tzv. chemické gely), a na ty, které vznikají agregací za pomoci fyzikálních sil, především díky vodíkovým nebo iontovým vazbám. Takto vzniklé gely se nazývají gely fyzikální [30, s. 14 – 15].

Struktura gelů s chemickými vazbami je velmi pevná. Chemické gely jsou charakteristické nekonečnou trojrozměrnou síťovitou strukturou, která je tvořená chemickými vazbami. Tyto vazby tvořené kovalentní vazbou se tvoří dvěma možnými způsoby:

1. zesíťením ve stejnou dobu jako polymerace (tzv. kopolymerace);
2. síťováním lineárního polymeru chemickou reakcí po syntetizaci (tj. za přítomnosti vhodného síťovacího činidla) [30, s. 16].

Prostorová struktura fyzikálně síťovaných gelů je tvořená sítí makromolekulárních řetězců spojených působením sil fyzikální povahy v místech nazývaných jako uzly. Tyto uzly se netvoří na koncích řetězců, ale libovolně mezi makromolekulami. K asociaci mezi jednotlivými řetězci dochází při snížení afinity vysokomolekulárních látek k rozpouštědлу, jedná se např. o snížení teploty, zvýšení koncentrace aj. [30, s. 20 – 21], [31, s. 216 – 220], [36, s. 18 – 19].

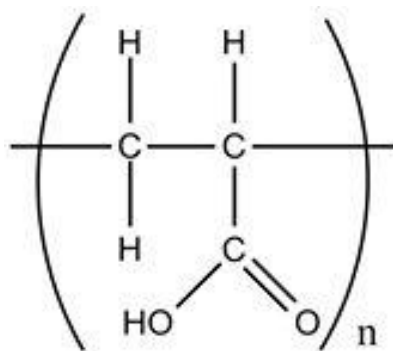
Vznik těchto typů gelů zahrnuje celou řadu mechanismů a metod síťování. Do kategorie fyzikálních gelů spadá mnoho gelů na bázi syntetických polymerů [30, s. 20 – 21].

2.4 Gelotvorná činidla

Existuje celá řada gelotvorných látek. Mezi nejčastěji užívané se řadí kyselina alginová, bentonit, carbomery, želatina, křemičitan hořečnato-hlinitý, poloxamer, polyvinilalkohol, alginát sodný, tragant a xantanová guma. Mezi další významné gelotvorné látky patří deriváty celulózy, tj. methylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, karboxymethylcelulóza, atd. Mezi těmito všemi sloučeninami se nachází společné znaky, ale každá z těchto sloučenin má své jedinečné vlastnosti. Za jedny z nejpoužívanějších gelotvorných látek v kosmetickém průmyslu jsou považovány carbomery (tj. obchodní název pro polyakrylové kyseliny) [37], [38].

2.4.1 Carbomer

Jedná se o polymery na bázi syntetických pryskyřic, které tvoří suché, bílé prášky. Carbomery se skládají z velkých molekul, které jsou tvořeny relativně malými chemickými sloučeninami zvanými monomery. Monomerem určeným k výrobě těchto syntetických pryskyřic je kyselina akrylová, která je zesíťovaná nebo spojená s polyalkenylovými polyethery. Karboxylové skupiny, které poskytuje kyselina akrylová, jsou zodpovědné za výhody konečného produktu, tj. gelu. Carbomerové pryskyřice jsou vhodné pro přípravu čistících gelů. Nejčastěji se používají v 0,1 – 0,5% koncentraci v závislosti na typu přípravku a požadované výsledné viskozitě. Mimo jiné se také využívají jako zahušťovadla a jsou velmi citlivé na pH. Obecná struktura carbomeru je uvedena na Obr. 4 [26, s. 5 – 6], [38], [39], [40, s. 43 – 44].



Obr. 4. Struktura carbomeru

[38]

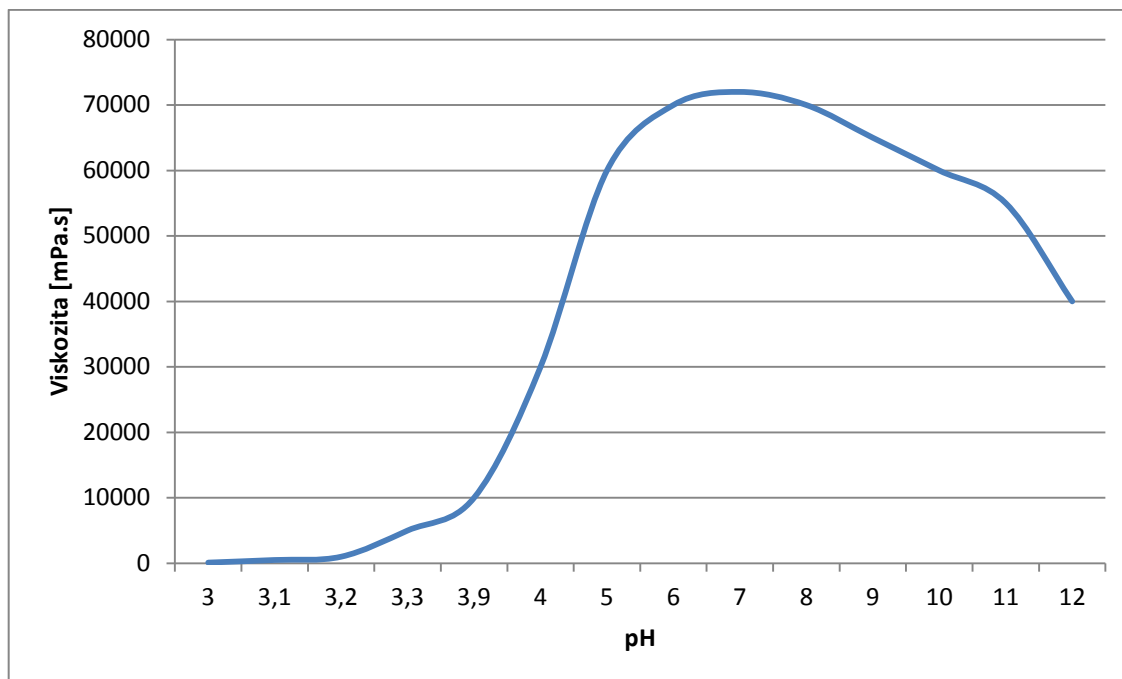
Carbomerové pryskyřice jsou rozpustné jak ve vodě, tak i v alkoholu, a mají velmi dobré sorpční vlastnosti. Snadno absorbují vodu a botnají. Botnají až do tisícinásobku původního objemu a desetinásobku jejich původního množství k vytvoření gelu [39].

2.4.1.1 Tvorba syntetického polymerního gelu

Vznik gelu založeného na carbomerových pryskyřicích probíhá hydratací a samovolným botnáním polymerní sítě carbomeru ve vhodném rozpouštědle. Jestliže je rozpouštědlem voda, vzniká polymerní hydrogel. Během tvorby gelu se jeho objem zvětšuje, což je doprovázeno natahováním elasticky aktivních řetězců polymerní sítě [41].

V suchém práškovém stavu je molekula těchto polymerů pevně stočená do tvaru spirály. Po rozpuštění ve vodě se molekula hydratuje a pomalu odvíjí, čímž dochází ke zvyšování viskozity. Maximální viskózní efekt zajišťují polymerní molekuly, které se pro dosažení tohoto efektu musí úplně uvolnit. Existují dva mechanismy, kterými se molekula pryskyřice zcela uvolní. Nejběžnější mechanismus zahrnuje neutralizaci polymeru s vhodnou bází. Neutralizace způsobuje ionizaci pryskyřice s negativními náboji podél polymerního řetězce. Odpor mezi těmito náboji postupně přispívá k rozvinutí struktury, zatímco propletené řetězce poskytují trojrozměrné matice 3D. Výsledkem je okamžitý vznik vysoce viskózního gelu. Druhý mechanismus se skládá z přidavku hydroxylových donorů k pryskyřici. Kombinací karboxylové skupiny s jednou nebo více hydroxylovými skupinami dochází k tvorbě vodíkových vazeb, a tím k zesílení struktury gelu. Může se jednat o časově náročný mechanismus, přičemž k maximální tvorbě může dojít během 5 minut až několika hodin. V případě tvorby gelu tímto způsobem systém udržuje kyselé pH [40, s. 43 – 44].

Carbomery vytváří ve vodném roztoku mírně kyselé prostředí ($\text{pH} = 2,8 - 3,2$), jelikož karboxylové skupiny ve vodném prostředí částečně disociují. Vzhledem k tomu, že disociační konstanta (pK_a) těchto polymerů je $6,0 \pm 0,5$, dochází k ionizaci karboxylových skupin na hlavním řetězci, což vede k odporu mezi přirozenými náboji, a to podporuje botnání polymeru. Při zvyšujícím se pH (3,5 - 8,0) je roztok neutralizován a dochází k tvorbě gelu (Obr. 5). Neutralizace se může provádět anorganickými bázemi, jako jsou NaOH, KOH, NH_4OH , nebo organickými aminy (např. TEA – triethanolamin). Tímto způsobem dochází ke vzniku spletené sítě polymerů v celém roztoku, což má za následek tvorbu charakteristické viskozity [39], [42].



Obr. 5. Závislost viskozity carbomerového gelu na pH [43]

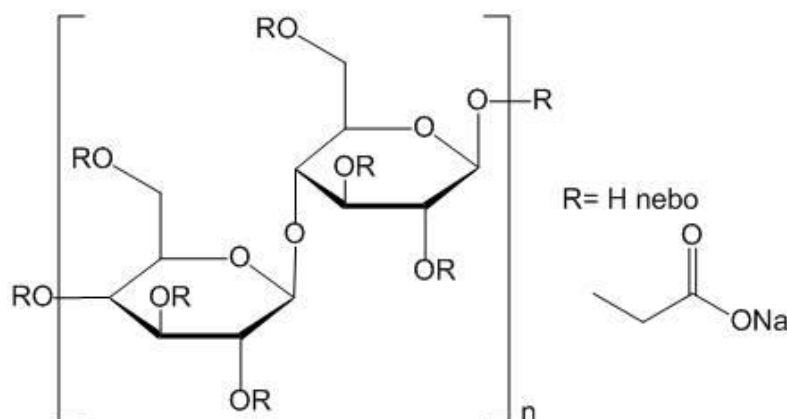
K zesítnění polymerů dochází pomocí molekulárních sil nebo pomocí sekundárních sil včetně iontových a kovalentních vazeb či silnými dipóly postranních skupin makromolekul. Dochází ke vzniku hydrogelu, který může být chemicky stabilní, nebo se může při nesprávných fyzikálních podmínkách rozpadat a rozpouštět. Takovéto hydrogely jsou označovány jako reverzibilní nebo fyzikální [36, s. 18 – 19].

Pro přípravu gelů musí být pečlivě zvolen druh carbomeru, a to i přes to, že se jedná o látky chemicky téměř podobné. Existuje mnoho druhů carbomerových pryskyřic, které mají specifickou tvorbu viskozity, molekulovou hmotnost a další charakteristické vlastnosti. Carbomer může být uváděn např. číslem 910, 934, 940, 941 a 934P. Tato čísla udávají molekulovou hmotnost a specifické složky polymeru. Mezi jedinečné vlastnosti těchto polymerů patří biologická inertnost, která se u jiných lineárních polymerů nevyskytuje [25, s. 5 – 6], [38].

Z kosmetologického hlediska mají carbomery velmi nízký potenciál k podráždění kůže, senzibilizaci, a to i při vysokých koncentracích. Dále mají také prokázán nízký potenciál pro fototoxicitu a fotokontaktní alergie. Carbomer, jakožto výchozí substance pro výrobu kosmetických výrobků a výrobků pro osobní hygienu, musí být uveden na trh v Evropě v souladu s obecnými ustanoveními. Jedná se o nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích [38].

2.4.2 Karboxymethylcelulóza

Karboxymethylcelulóza (CMC) je derivát celulózy s karboxylovými skupinami ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) navázanými na některé z hydroxylových skupin glukopyranózových monomerů. Struktura CMC je tedy založená na β -(14)-D-glukopyranózových polymerech celulózy. Karboxymethylcelulóza je hlavním produktem chemické reakce celulózy a zásady a dále reakce alkalického éteru celulózy s kyselinou. Jako zásada se v této reakci využívá hydroxid sodný a kyselina chloroctová jako kyselá látka. Po prvotní reakci se získává tzv. technická karboxymethylcelulóza, která obsahuje přibližně 60 % CMC a 40 % soli. Dalším procesem se odstraňují soli a získává se čistá CMC. Mezi všemi polysacharidy je CMC velmi levnou a dostupnou látkou [44], [45]. Struktura CMC je znázorněná na Obr. 6.



Obr. 6. Struktura karboxymethylcelulózy [46]

Významné faktory v rámci funkčních vlastností CMC závisí na stupni substituce ve struktuře celulózy, tzn. jaká část hydroxylových skupin se substituce zúčastnila. Dále závisí na průměrné délce polymerních řetězců a na stupni shlukování karboxymethylových substituentů. Hydrofóbnější málo substituované CMC se chovají thixotropně, zatímco rozvětvenější více substituované CMC jsou pseudoplastické. Při nízkém pH CMC může tvořit příčné vazby, a to laktonizací prostřednictvím karboxylových skupin a volnými hydroxylovými skupinami. Díky polárnímu charakteru karboxylových skupin je CMC rozpustná ve vodě [47].

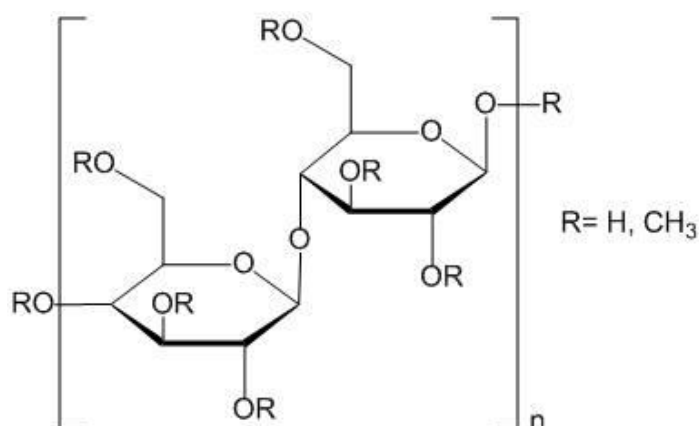
Nejdůležitější vlastností CMC je, že může tvořit vysoce viskózní koloidní roztoky, které mají neutrální nebo zásadité pH. Většina CMC se rychle rozpouští ve studené vodě a využívají se zejména pro kontrolu viskozity bez gelovatění. Je to proto, že CMC

při určitých koncentracích netvoří gel. Viskozita CMC klesá v průběhu zahřívání roztoku. Molekuly CMC jsou nejvíce rozšířené při nízkých koncentracích látky, ale při vyšších koncentracích se molekuly překrývají a svinují se. Při vysokých koncentracích se molekuly zamotávají a dochází ke vzniku termoreverzibilního gelu. Zvýšením iontové síly a snížením pH se podpoří to, aby se polymer více stočil, což má za následek snížení viskozity CMC. Její ovládání viskozity jí umožňuje použít např. jako zahušťovadlo, stabilizátor či pozastavovací činidlo [48, s. 379 – 380].

Karboxymethylcelulóza je bílý vločkovitý prášek, jenž je netoxický, bez zápachu, je hypoalergenní, stabilní a snadno rozpustný ve vodě. Karboxymethylcelulóza je přidávána zejména do mnoha nepotravinářských výrobků, například lubrikantů, zubních past, projímadel, dietních tablet, vodou ředitelných nátěrových hmot, čisticích přípravků, výrobků z papíru [48, s. 379 – 380].

2.4.3 Methylcelulóza

Methylcelulóza (MC) je methylester celulózy. Jedná se o semi-flexibilní lineární řetězec polysacharidu, který má to nejjednodušší chemické složení mezi deriváty celulózy s částečným nahrazením hydroxylových skupin methoxy skupinami. Podle počtu nahrazených hydroxylových skupin lze vytvořit různé druhy methylcelulózy. Průměrný počet methoxy skupin na jednotku anhydroglukosy se vyjadřuje stupněm substituce, která se pohybuje od nuly pro nemodifikované celulózy na maximálně tři, což odpovídá plně substituovanému řetězci [49]. Struktura methylcelulózy je uvedena na Obr. 7.



Obr. 7. Struktura methylcelulózy [50]

V současné době je MC jediný ve vodě rozpustný alkyl ether celulózy, která je vyráběna převážně ve Spojených státech. Methylcelulóza se vyrábí zahříváním celulózy se zásaditým roztokem (NaOH) a působením methylchloridu [49].

Methylcelulóza je pevná bílá látka bez zápachu, bez chuti a je netoxická. Ačkoliv se komerční produkt MC rozpouští ve studené vodě, je potřeba jej nejprve rozpustit v horké vodě a poté schladit na 5 – 10 °C. Kdyby byl prášek prvně ve styku se studenou vodou, došlo by ke vzniku slepenců, proto je nejdříve rozpuštěn v horké vodě. Výsledný roztok je čirý, vláčný a stabilní při pokojové teplotě. Nicméně, při zahřevu na teploty mezi 60 – 70 °C dochází v roztoku ke zvyšování viskozity a následné gelaci. Teplota gelace klesá se zvyšující se koncentrací MC v roztoku a také se zvyšující se průměrnou molekulovou hmotností rozpuštěné látky. Předpokládá se, že rozpustnost MC je způsobená její hydratací při nízkých teplotách. Tento proces snižuje přitažlivost mezi polymerními řetězci. Při vysokých teplotách je hydrát částečně vysráží a MC se odděluje ve formě gelu. Malé množství anorganických solí zvyšuje viskozitu a snižuje teplotu gelace [51, s. 648].

Při nízkých teplotách se viskozita ve zředěných roztocích MC s nárůstem smykové rychlosti mění jen mírně. Nicméně při vysokých teplotách, kde dochází k postupné gelaci, viskozita s nárůstem smykové rychlosti klesá. Toto thixotropní chování se zvyšuje v přítomnosti solí. Rozdíly v roztoku od pH 3 do 12 nemají vliv na MC, tzn., že nedochází k jejímu srážení. Avšak v roztocích silně alkalických dochází ke zvýšení viskozity [51, s. 649].

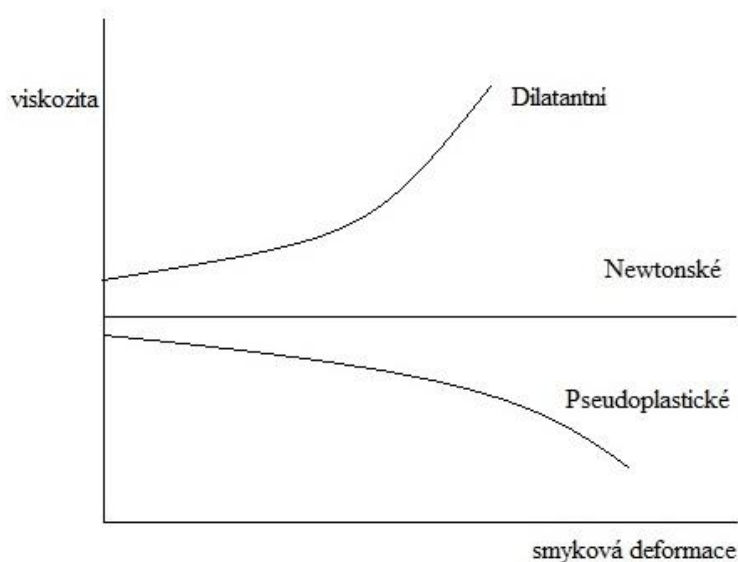
Methylcelulóza je kompatibilní s celou řadou vodě rozpustných materiálů, jako jsou např. mýdla, škroby, lepidla, kaseiny nebo přírodní gumy [51, s. 649]

Methylcelulóza je užívaná v široké škále průmyslového odvětví. Užívá se v rámci keramického, papírového, kožedělného průmyslu, aj. Díky tomu, že je netoxická, se výhradně využívá ve farmakologickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu [51, s. 649].

2.5 Reologické vlastnosti gelů

Prostředky na bázi gelotvorných látek mají upravené reologické vlastnosti, tak aby byla snadnější jejich aplikace a také rychlejší absorpce aktivních látek. Jedná se o kapaliny, které jsou typické svým nenevtonským chováním. Nenevtonské kapaliny jsou takové kapaliny, které specificky reagují na intenzitu smykové deformace. V důsledku působení smykové deformace může docházet ke zvýšení nebo snížení viskozity kapaliny.

U kosmetických gelů viskozita klesá s intenzitou smykové deformace, tudíž dochází ke snížení viskozity (Obr. 8). Tato vlastnost je způsobená přítomností gelotvorných látek. Kapaliny s takovýmto chováním jsou označovány jako pseudoplastické [26, s. 1 – 2], [52].



Obr. 8. Závislost viskozity na smykové deformaci [52]

Gely se do jisté hodnoty tečného napětí dokážou chovat jako elastická tělesa. Jako značně elastické se chovají zejména reverzibilní gely s kovalentními spoji, které disponují malým počtem vazeb v jednotce objemu. Čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím menší je možnost změny tvaru makromolekuly, a tím pevnější bude i prostorová síť [31, s. 216 – 220].

Oproti tomu, celá řada reverzibilních i ireverzibilních gelů s fyzikálními spoji má zřetelné tixotropní vlastnosti. Což znamená, že viskozita se mění v čase a klesá s dobou působení smykového namáhání. To znamená, že jsou-li síly poutající původní disperzní částice do síťovité struktury velmi slabé, je možné gel převést pomocí mechanického působení zpět na sol (např. prudkým potřepáním). Mechanickými účinky se ruší slabé vazby mezi částicemi. Pokud se nechá po mechanickém namáhání tekutý sol stát v klidu, vazby se pomalu obnoví a dojde k nové gelaci [26, s. 1 – 2], [31, s. 216 – 220], [52].

3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY V DEZINFEKČNÍCH PŘÍPRAVCÍCH

Při hygienické dezinfekci rukou se používají látky, které minimálně dráždí, musí však usmrcovat mikroorganismy ve velmi krátké době. Někdy je výhodné, aby účinné látky měly dlouhodobý reziduální účinek (např. při chirurgické dezinfekci rukou, kdy je potřeba potlačit dlouhodobě růst reziduální kožní flóry). Rychlý dezinfekční účinek mají alkoholy, peroxid vodíku a peroxokyseliny. Alkoholy se řadí k předním antimikrobiálním látkám využívaných při výrobě hygienických dezinfekčních přípravků [6, s. 76 – 77].

3.1 Alkoholy

I když existuje velké množství skupin zahrnující antimikrobiální aktivitu v rámci okamžité hygienické dezinfekce rukou, tak pouze jediné alkoholy jsou mezinárodně uznávány jako nejefektivnější a nejúčinnější antimikrobiální látky. Alkoholy jsou uváděny v mezinárodních normách a směrnících. Mají vyšší úroveň účinnosti a velmi široké spektrum antimikrobiální aktivity. Antibakteriální účinnost alifatických alkoholů je již známá po celá staletí. Konkrétní využití v rámci hygienické dezinfekce se datuje někdy ke konci 19. století [21, s. 365 – 366].

V řadě studií se zkoumala antimikrobiální aktivita celé řady jednosytných alkoholů zahrnujících methyl- až oktylalkohol, jenž např. sloužily jako substráty pro *E. coli*. Bylo zjištěno, že metylalkohol a další alkoholy (butyl- až oktylalkohol) nebyly schopny fungovat jako substrát, navíc inhibovaly dehydrogenaci jiných substrátů. Množství inhibice se zvyšovalo s délkou řetězce alkoholů. Bylo ale zjištěno, že ethyl- a propylalkohol jsou schopny hrát dvojí roli. Při nízkých koncentracích mohou sloužit jako substráty, oproti tomu při vysokých koncentracích způsobují inhibici. Zdaleka největší baktericidní účinky byly prokázány u etylalkoholu [53, s. 615].

Účinnější antimikrobiální činidlo než etanol, v rámci alkoholů, je izopropylalkohol. Například *Staphylococcus aureus* je usmrcen při působení 50 – 91% izopropylalkoholu po dobu 1 minuty při teplotě 20 °C [53, s. 615].

Mísitelnost alkoholů s vodou klesá se vzrůstající délkou uhlovodíkového řetězce. Dezinfekční účinek stoupá se zvyšující se molekulární hmotností a s délkou řetězce. Účinek tedy klesá v řadě butyl-, propyl-, ethyl-, methylalkohol a v řadě *n*-primární > izo-primární > sekundární > terciální alkoholy. Existuje konstantní poměr mezi

molekulárními koeficienty po sobě jdoucích členů této řady. Molekulární koeficient je definován rovnicí (Rov. 1):

$$\text{molekulární koeficient} = \frac{\text{molekulová hmotnost alkoholu}}{\text{molekulová hmotnost fenolu}} \cdot \text{fenolový koeficient} \quad (1)$$

Primární alkoholy s 6 – 16 atomy uhlíků mají schopnost inhibovat *Mycobacterium tuberculosis* a *Trichophyton gypseum*, ale nemají schopnost inhibovat bakterii *Staphylococcus aureus* [53, s. 615].

Mechanismus dezinfekčního účinku alkoholů je založený na schopnosti denaturovat bílkoviny. Ve vyšších koncentracích koagulují protoplazmu a dehydratují buňky. Baktericidní účinek se projeví jen v přítomnosti vody. Pouze metanol je účinný v bezvodém prostředí. Bakteriostatický účinek se projevuje u alkoholů i ve zlomcích procent [55, s. 267 – 268].

Spektrum účinnosti alkoholů zahrnuje všechny vegetativní formy bakterií. Gram-pozitivní i gram-negativní bakterie jsou na alkoholy velmi citlivé, oproti tomu nejodolnějšími mikroorganismy jsou stafylokoky. Všem alkoholům chybí sporicidnost a spory bakterií mohou v roztocích alkoholu přežít po dobu i několika let [54, s. 24].

Alkoholy se nejčastěji používají k dezinfekci kůže. Dezinfekční přípravky založené na alkoholech jsou bezpečné, rychle působí proti širokému spektru mikroorganismů, mají nízkou dráždivost a nejsou spojovány s rezistencí. Jsou také velmi oblíbeny proto, že se rychle na kůži odpařují a ruce zůstávají po aplikaci suché. Jejich nevýhodou je značné lokální podráždění kůže při porušení její celistvosti. Přípravky mají také velmi nízký bod vzplanutí. Další nevýhodou alkoholů jakožto antimikrobiálních látek je, že rozpouštějí tukové látky na kůži. To zapříčiňuje dehydrataci pokožky, následné praskání a tvorbu drobných trhlin. Proto se do ručních sanitizérů doporučuje přídavek 2 % glycerolu. I přes tyto nedostatky jsou ruční sanitizéry jedinečným shlukem benefitů, který je výslovně doporučen [21, s. 372], [55, s. 267 – 268], [56, s. 28], [57, s. 63 – 64].

3.1.1 Ethanol

Jedná se o druhý nejnižší alkohol, jehož sumární vzorec je C_2H_5OH . Jde o bezbarvou, těkavou, organickou kapalinu s charakteristickou vůní. Je významnou antimikrobiální látkou. Používá se v čisté nebo denaturované formě a je nejčastěji používaným alkoholem. Optimální účinnost má v koncentraci $70 \pm 5 \%$. V této koncentraci se užívá na dezinfekci suchých rukou. Jsou-li ruce umyté vodou a mýdlem, tj. jsou-li vlhké, je potřeba použít 80 – 96% alkohol. Při správné koncentraci má etanol vysoce účinné germicidní účinky na vegetativní patogeny (viz Tab. 1). Je pravidelnou součástí mnoha přípravků k hygienické dezinfekci rukou. Je nutno ho používat ve směsi vody, neboť ta mu teprve dává dezinfekční vlastnosti. Gram-pozitivní i gram-negativní mikroorganismy ničí 70% etylalkohol rychle, a to během 10 až 30 sekund, stafylokoky už pomaleji, za 60 sekund [57, s. 63 – 64], [58].

Tab. 1. Baktericidní a virucidní účinek ethanolu [53, s. 614]

Mikroorganismus	Účinná koncentrace [%]	Požadovaný čas
<i>Salmonella typhosa</i>	21,6	5 min
	17,3	10 min
	40 – 100	10 sec
<i>Staphylococcus aureus</i>	34,5	5 min
	60 – 95	10 sec
	100	50 – 90 sec
<i>Escherichia coli</i>	60	1 – 5 min
	70	40 sec
	80	30 sec
	60	5min
	40 – 100	10 sec
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30 – 100	10 sec

3.2 Netradiční antimikrobiální látky

V současné době roste poptávka po tzv. přírodních antimikrobiálních látkách v hygienických dezinfekčních přípravcích. Jedná se o trend směřující k životnímu prostředí. Na trhu lze již nalézt několik hygienických dezinfekčních přípravků na bázi přírodních surovin jako je např. thymol [21, s. 365 – 366].

Následující podkapitoly budou popisovat potenciální antimikrobiální látky, které mají využití i v průmyslu.

3.2.1 Hydroxykyseliny

Hydroxykyseliny jsou organické karboxylové kyseliny, které jsou dle molekulární struktury děleny na α - a β -typy (AHA a BHA). α -hydroxykyseliny jsou charakteristické polohou hydroxylové skupiny v poloze alfa, oproti tomu β -hydroxykyseliny jej mají v poloze beta. Obě tyto skupiny hydroxykyselin jsou po celá staletí využívány jako aktivní složky kožních léčiv a kosmetických přípravků. α -hydroxykyseliny jsou v rozsahu od jednoduchých alifatických sloučenin až po složité molekuly. Mnoho sloučenin z této skupiny pochází z přírodních zdrojů, a proto jsou často označovány jako ovocné kyseliny. Například kyselina mléčná je produkována mikroorganizmem *Lactobacillus* a je zodpovědná za chuť a vůni zksyleného mléka; kyselina citronová se nachází v ananasu nebo citrusech; kyselina vinná je obsažena v hroznech révy vinné, atd. [59], [60, s. 35 – 38].

α -hydroxykyseliny, které se využívají v dermatologii a kosmetologii, jsou obvykle získány chemickou syntézou. Dělí se do chemických skupin v závislosti na počtu zabudovaných karboxylových skupin (Tab. 2) [60, s. 35 – 38].

Tab. 2. Klasifikace hydroxykyselin [60, s. 36]

Dělení hydroxykyselin	Název kyseliny
α -hydroxykyseliny	
Monokarboxylové	Glykolová Mléčná Mandlová
Dikarboxylové	Jablečná Vinná
Trikarboxylové	Citronová
β -hydroxykyseliny	
	Salicylová 2-hydroxy-5-oktanoyl benzoová

Mnohá hlediska mechanismů působení hydroxykyselin jsou stále ještě neznámá. Fyzikálně-chemické vlastnosti hydroxykyselin se měří pomocí protonové disociace v roztoku a jsou vyjádřeny jako pK_a . Hydroxykyseliny mají silnější kyselost, když je jejich pK_a nižší. Pokles o 1 jednotku v pK_a představuje nárůst o desetinásobné síle [60, s. 35 – 38].

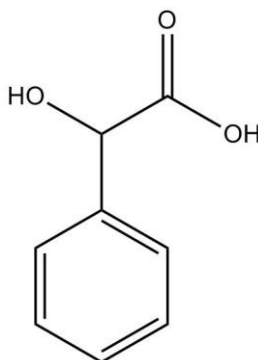
Hodnota pH formulací se liší v závislosti na druhu hydroxykyseliny a také na její koncentraci. Aby se zabránilo podráždění, je potřeba formulovat kosmetický přípravek

s pH blízkému normálnímu rozmezí pH pokožky. To může být dosaženo neutralizací. Nicméně vědecké studie ukazují, že neutrální pH přípravků obsahující AHA kyseliny mají velmi slabý účinek na pokožku. Je třeba ale poznamenat, že za biologickou aktivitu stojí i chemická struktura sloučenin, a to bez ohledu na jejich kyselost. Vynikající enantioselektivita vykazuje mnoho biologických systémů a naznačuje, že je důležitým parametrem v každém farmakologickém účinku, včetně farmakokinetiky, rychlosti metabolismu a také toxicity [60, s. 35 – 38].

Většina z výše uvedených účinků je závislá na množství hydroxykyseliny. Doporučované množství hydroxykyselin je kategorizované do třech koncentrací. Kategorie s nízkou koncentrací, která je menší než 4 % účinné látky v přípravku, dále střední koncentrace se aplikule v rozmezí 4 – 12 % a vysoká koncentrace pro dávky vyšší než 12 % [60, s. 38].

3.2.1.1 Kyselina mandlová

Kyselina mandlová (také kyselina fenylglykolová nebo alfa-hydroxybenzenoctová kyselina) je aromatickou α -hydroxykyselinou se sumárním vzorcem $C_8H_8O_3$ a její struktura je znázorněná na Obr. 9. Kyselina mandlová má hydroxylovou skupinu umístěnou na uhlíku, který sousedí s karboxylovou skupinou. Je nejmenším subjektem mezi AHA sloučeninami [61], [62, s. 26], [63, s. 191 – 192].



Obr. 9. Vzorec kyseliny mandlové [63, s. 191 – 192]

Kyselina mandlová je pojmenována po německém slovu mandel, které označuje mandli a byla objevená při hydrolýze amygdalinu, tj. extraktu z hořkých mandlí [62, s. 26].

Jedná se o bílou krystalickou látku o vysokém bodu tání (118 °C), která je částečně rozpustná ve vodě a snadno rozpustná v isopropylalkoholu a ethanolu. Její struktura

jí zaručuje bakteriostatické vlastnosti. Kyselina mandlová existuje ve dvou enantiomerních formách, které mohou mít značný vliv na farmaceutickou účinnost [61], [62, s. 26].

Molekula kyseliny mandlové je větší než molekula kyseliny glykolové, která je mimo jiné také široce využívanou α -hydroxykyselinou. Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty (pK_a) kyseliny mandlové je 3,41 při teplotě 25 °C. I v tomto případě je silnější než kyselina glykolová, která má pK_a 3,83 při 25 °C. Acidita jednotlivých AHA kyselin se značně liší, a to v závislosti na změnách teploty [62, s. 26].

Kyselina mandlová je zdaleka nejsilnější kyselina s antimikrobiálními účinky mezi AHA kyselinami, která se vyskytuje přirozeně v přírodě (mandle). Dále působí jako antiseptikum proti celé řadě mikrobiálních patogenů, např. proti *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Proteus sp.*, *Aerobacter sp.*, atd. [62, s. 26], [64].

Jak již bylo zmíněno výše, kyselina mandlová má větší molekulu než kyselina glykolová, což má za následek její lepší toleranci ke kůži. Přestože je kyselina mandlová ve skutečnosti silnější než glykolová, je méně dráždivá a dobře snášená i citlivou pokožkou [65].

Mimo antimikrobiální vlastnosti má kyselina mandlová celou řadu dalších pozitivních účinků na kůži člověka. Jedná se především o exfoliaci odumřelých buněk a nečistot z povrchu pokožky. Dále pak o její aplikaci na kůži, kdy dojde k urychlení cyklu její obnovy. To způsobí, že se horní vrstvy kůže rychleji odstraní a tím odhalí novou, nepoškozenou kůži. Potlačuje tvorbu melaninu, který má za následek tvorbu skvrn, pih a nepravidelných barevných změn na pleti. Například při klinických studiích bylo prokázáno snížení produkce melaninu až o 50 % pomocí aplikace 10% roztoku kyseliny mandlové v lotionu po dobu čtyř týdnů. Redukuje mimické vrásky, hluboké vrásky a jizvy po akné [66], [67].

3.2.2 Esenciální oleje

Esenciální olej je také definován jako esence, éterický olej nebo olej těkavý. Jedná se o komplexní směs těkavých složek, které jsou biosyntetizovány živými mikroorganismy. Esenciální oleje mohou být získávány z příslušné matrice pomocí parní, vodní a suché destilace. V případě citrusů pomocí exprese. Jejich výskyt a funkce v přírodě jsou stále otázkou a předmětem pokračujících výzkumů. Nicméně existují důkazy, že organizmy produkují éterické oleje pro jejich obranu, mají signalizační funkci, nebo jsou součástí jejich sekundárního metabolismu. Esenciální oleje, jejich frakce a izoláty jsou využívány

v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém průmyslu a v terapii. Jsou používány v nativní nebo ve zředěné formě. Esenciální oleje mohou obsahovat těkavé sloučeniny terpenoidního nebo neterpenoidního původu. Mohou existovat ve formě alkoholů, kyselin, esterů, epoxidů, aldehydů, ketonů, aminů, sulfidů, atd. Monoterpeny, seskviterpeny a dokonce triterpeny tvoří kompozici mnoha esenciálních olejů. Kromě uvedených látek se mohou vyskytovat i fenylypropanoidy, mastné kyseliny a jejich estery nebo produkty jejich rozkladu. Vzhledem k jejich povaze kapaliny jsou označovány jako oleje. Neměly by být zaměňovány s pevnými oleji nebo mastnými oleji, které se skládají z přirozeně se vyskytující směsi lipidů, které nemusí být nutně volatilní. Proto se éterické oleje zcela liší ve fyzikálních a chemických vlastnostech od mastných olejů. Například nanesený éterický olej na filtrační papír se zcela odpaří, ale pevné oleje se nevypaří a také zanechávají trvalou stopu [68, s. 43 – 50], [69, s. 1 – 2].

3.2.2.1 Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů

Antimikrobiální vlastnosti jsou známy u široké škály esenciálních olejů a v mnoha případech je tato aktivita v důsledku přítomnosti aktivních složek. Jedná se především o isopreny, jakožto monoterpeny, seskviterpeny a související alkoholy, uhlovodíky a fenoly [68, s. 87 – 90].

Lipofilní charakter jejich uhlovodíkového skeletu a hydrofilní charakter jejich funkční skupiny jsou jedny z nejdůležitějších faktorů v antimikrobiálním působení esenciálních olejů. Proto pořadí antimikrobiální aktivity bylo navrženo takto:

fenoly > aldehydy > ketony > alkoholy > estery > uhlovodíky [68, s. 87 – 90].

Z uvedeného pořadí lze říci, že oleje obsahující fenolické struktury, jako jsou karvakrol a thymol, jsou vysoce aktivní proti širokému spektru mikroorganismů [68, s. 87 – 90].

Přítomnost hydroxylové skupiny byla prokázána jako důležitá a zdá se, že relativní poloha hydroxylové skupiny na fenolovém kruhu nemá přílišný vliv na antimikrobiální aktivitu. Bylo prokázáno, že karvakrol je mnohem aktivnější než thymol. Kromě toho, že významnou roli hraje přítomnost aromatického kruhu (nedostatečná mikrobiální aktivita mentolu). Nízká aktivita byla také pozorována u komponentů, které obsahují pouze aromatický kruh s alkylovými substituenty jako např. u *p*-cymenu. Nicméně přítomnost aldehydové skupiny s konjugovanou dvojnou vazbou a dlouhým uhlovodíkovým řetězcem na aromatickém kruhu může mít za následek zlepšení antimikrobiální aktivity. Například

cinnamaldehyd je vysoce účinný při inhibici růstu několika kmenů bakterií a hub [68, s. 87 – 90].

Vysoké antimikrobiální a antifugální vlastnosti prokazuje karvakrol, zejména jsou na něj citlivé gram-pozitivní bakterie. U esenciálních olejů, které jsou bohaté na 1,8-cineol, byla prokázána vysoká mikrobiální aktivita proti gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím, včetně *Listeria monocytogenes*, dále pak proti kvasinkám *Candida albicans*, a v neposlední řadě proti fytopatogenním plísním. Aldehyd citral zajišťuje mírnou aktivitu. Ketony jako jsou pulegon, fenchon, α -thujon a kafr mají také antimikrobiální aktivitu [68, s. 87 – 90].

Okysličené monoterpeny jako jsou mentol a alifatické alkoholy (např. linalool) mají také proti několika bakteriím silnou až střední antimikrobiální aktivitu. Bylo prokázáno, že poloha alkoholové funkční skupiny ovlivňuje molekulární vlastnosti komponent jako je kapacita vodíkové vazby, a proto terpinen-4-ol jeví antimikrobiální aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco u α -terpineol nebyly prokázány antimikrobiální účinky [68, s. 87 – 90].

Monoterpeny jako jsou např. sabinen, terpinen a limonen mají také antimikrobiální vlastnosti a vykazují střední až silnou aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím a patogenním plísním, ale obecně mají nižší aktivitu proti gram-negativním bakteriím [68, s. 87 – 90].

Můstkové bicyklické monoterpeny jako jsou α -pinen a β -pinen prokázaly značnou antifungální aktivitu, nicméně nebylo prokázáno, který isomer pinenu je antimikrobiálně aktivní [68, s. 87 – 90].

Podobně jako esenciální oleje, které obsahují značné množství seskviterpenů, jako jsou např. 8-cadinen, (Z)- β -farnesen, γ -muurolen, spathulenol, hexahydrofarnesyl aceton a α -selinen, se vyznačují značnou antimikrobiální aktivitou [68, s. 87 – 90].

Hlavní složky esenciálních olejů jsou obvykle zodpovědné za antimikrobiální aktivitu, ale existují i studie, které uvádí, že esenciální oleje jako celek mají vyšší antimikrobiální aktivitu než kombinace hlavních izolovaných komponent. To je pravděpodobně z důvodu přítomnosti menších složek, které jsou v synergickém vztahu s hlavními komponenty a zajišťují tak vyšší antimikrobiální činnost esenciálních olejů. Například kombinace citralu, vanilinu, thymolu, eugenolu nebo karvakrolu prokázaly synergický účinek na inhibici růstu *Zygosaccharomyces bailii*. Na druhé straně u některých látek byl

pozorován antagonismus, jednalo se především o efekt mezi *p*-cymenem, tymolem a karvakolem (olej *Lippia chevalieri*) [68, s. 87 – 90].

Také bylo prokázáno, že fyzikální vlastnosti např. vodného tea tree oleje v disperzi výrazně ovlivňují antimikrobiální aktivitu. Mohou ji snižovat, příp. zvyšovat [68, s. 87 – 90].

Vzhledem k velkému počtu různých chemických sloučenin přítomných v esenciálních olejích je velmi pravděpodobné, že jejich antimikrobiální vlastnosti nelze přičítat jednomu konkrétnímu mechanismu. Terpenoidy jsou lipofilní látky, které narušují integritu a permeabilitu buněčné membrány. Obvyklým příznakem poškození membrány je únik K^+ iontů následovaný odlivem cytoplazmatických složek. Terpinen-4-ol inhibuje oxidativní dýchání a zvyšuje propustnost membrány. Antimikrobiální aktivita např. esenciálního oleje z oregána zahrnuje poškození integrity membrány, což ovlivňuje pH, homeostázu a rovnováhu anorganických iontů. Předpokladem je, že karvakrol destabilizuje cytoplazmatickou membránu a kromě toho působí jako výměník protonů, čímž dochází ke snižování pH gradientu přes cytoplazmatickou membránu. Výsledkem je kolaps, který vede k buněčné smrti [68, s. 87 – 90], [69, s. 235].

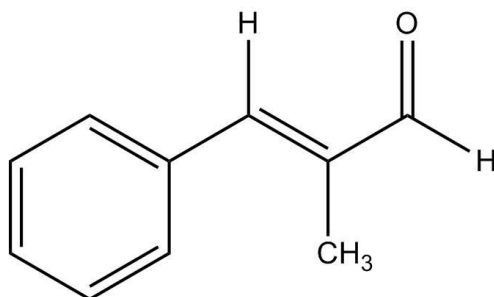
U kvasinek hraje důležitou roli převládající sterol (ergosterol), který zajišťuje tekutost membrány, její permeabilitu a činnost mnoha membránově vázaných enzymů. Terpeny inhibují syntézu ergosterolů v buňkách, a to vede k jejich zániku [68, s. 87 – 90].

3.2.2.2 *Skořicový olej*

Skořicovník je stále zelený strom dorůstající se výšky 10 až 20 m. Existuje celá řada různých druhů a odrůd. Všechny druhy rostou v jižní Asii. Stromy skořicovníků, které se pěstují pro komerční výrobu skořice, se obvykle prořezávají a tvoří tak nízké keře. Části, které jsou využívány pro těžení skořicového oleje, jsou sušená kůra, listy a větvičky. Skořicový olej se získává parní destilací sušené kůry z *Cinnamomum aromaticum* s výtěžkem přibližně 0,2 %. Tato rostlina je nejčastěji pěstována na Ceilonu, ale také na Seychelách a v Madagaskaru [70, s. 123 – 126], [71, s. 199].

Skořicová kůra obsahuje více než 4 % těkavého oleje. Tanin se skládá z polymerových 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3,4-diol jednotek, pryskyřice, sacharidů, gum, aj. Skořicový olej z kůry obsahuje jako hlavní složku cinnamaldehyd (60 – 75 %), další složky zahrnují eugenol, eugenolacetát, cinnamylacetát, cinnamylalkohol, methyleugenol, benzaldehyd,

linalool, monoterpeny a jiné. Cinnamaldehyd je přítomný v olejích v *trans* formě a jeho struktura je znázorněná na Obr. 10. Nejvyšší jsou oleje obsahující okolo 60 – 75 % cinnamaldehydu a přibližně 6 – 15 % eugenolu [70, s. 123 – 126], [71, s. 199].



Obr. 10. Struktura cinnamaldehydu

[72, s. 118]

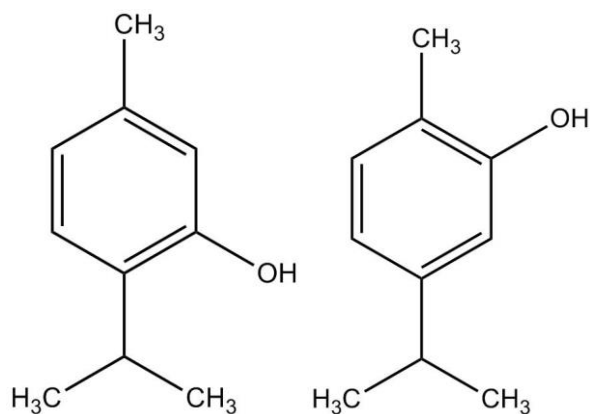
Skořicový olej má antifungální, antivirové a antibakteriální účinky. Například olej získaný z kůry skořicovníku v koncentraci 0,1 % dokáže zcela potlačit růst mikroorganismů *E. coli*, *S. aureus* a *Candida albicans* [70, s. 123 – 126].

Skořicový olej se využívá hlavně ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Světová produkce dosahuje až 10 tun ročně [70, s. 123 – 126].

3.2.2.3 Tymiánový olej

Existuje velké množství druhů a odrůd tymiánu, jejichž klasifikace je velmi obtížná. Nejběžněji užívaným druhem je *Thymus vulgaris*. Tento druh je běžně rostoucí ve středomořské oblasti (Řecko, Itálie). Rozsáhle se pěstuje ve Francii, Španělsku, Portugalsku, atd. Části, které jsou používány pro výrobu tymiánového oleje, jsou sušené nebo částečně sušené listy a květy. Olej se získává parní destilací o průměrném výtěžku 0,8 – 2,6 % [70, s. 309 – 311].

Těkavý olej obsahuje vysoce proměnlivé množství fenolů (20 – 80 %), monoterpeny (51 %) a alkoholy. Nejdůležitější částí oleje je fenolová frakce. Hlavní fenolickou složkou tymiánu je thymol, menší zastoupení náleží karvakrolu (Obr. 11). Další složky zahrnují tanin, flavonoidy, kyselinu kávovou, aj. [71, s. 213].



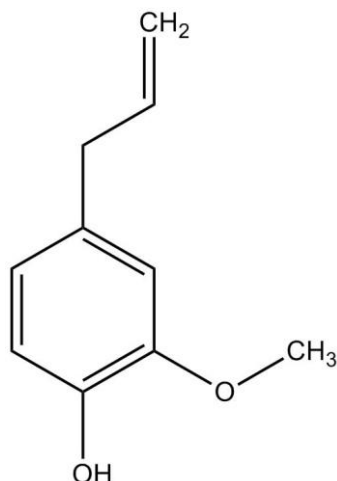
Obr. 11. Struktura tymolu (vlevo) a karvakrolu (vpravo) [72, s. 133]

Tymiánový olej vykazuje antimikrobiální aktivitu, zejména vůči bakteriím a plísním. Tato aktivita je způsobená přítomností thymolu a karvakrolu. Thymol může způsobovat mírné lokální podráždění kůže. Je častou komponentou dentálních přípravků, inhalantů, sprejů a lotionů [70, s. 309 – 311].

3.2.2.4 Hřebíčkový olej

Hřebíčkovce kořený (*Syzygium aromaticum*) je stále zelený strom, který dorůstá výšky cca 12 m. Tento strom pochází původně z jihovýchodní Asie, v současné době je pěstován celosvětově (Asie, Afrika, Amerika, atd.). Části stromu, které jsou využívány pro výrobu příslušných esenciálních olejů, jsou pupeny, stonky a listy. Hřebíčkový olej pocházející z pupenů nebo listů je získáván vodní destilací. Hlavním producentem hřebíčkového oleje je Tanzanie, mezi další producenty se řadí Indonésie, Malajsie nebo Srí Lanka. Hřebíčkový olej z pupenů je považován za daleko cennější olej než olej pocházející z listů, příp. stonků Hřebíčkovce kořeného. Výnosnost těkavého oleje z pupenu hřebíčku je přibližně 18 %, ze stonků 5 % a listů 2,5 % [70, s. 130 – 132], [71, s. 199 – 200].

Hlavní složkou zastoupenou v hřebíčkovém oleji je eugenol (Obr. 12). Eugenol je zastoupen v rozmezí od 60 do 90 %. Mezi další složky tohoto oleje patří 2 – 27 % eugenylacetátu, 5 – 12 % β -karyofylénu. Minoritně je zastoupen methylsalicylát, benzaldehyd, methyleugenol a mnoho dalších [70, s. 130 – 132].



Obr. 12. Vzorec eugenolu

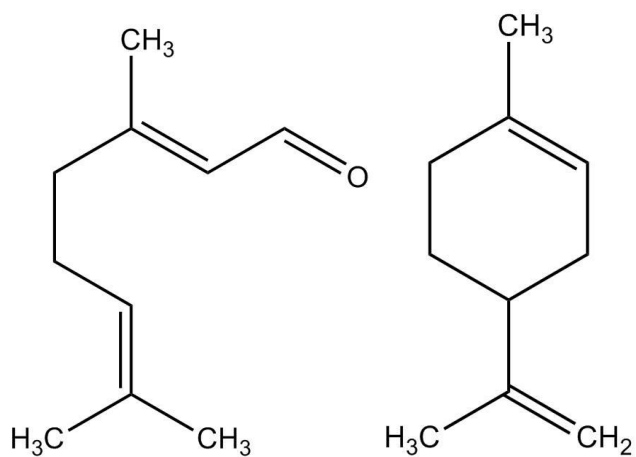
[72, s. 137]

Hřebíčkový olej má analgetické a mírně antiseptické vlastnosti. Vykazuje širokou antimikrobiální aktivitu, zejména proti gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím, kyselinotvorným bakteriím a plísním. Tato vysoká antimikrobní aktivita je způsobená vysokým obsahem eugenolu [70, s. 130 – 132], [71, s. 199 – 200].

3.2.2.5 Citrónový olej

Citrónovník (*Citrus limon*) je malý strom (6 m), původně pěstovaný v Asii. V současnosti je pěstovaný zejména ve Spojených státech (v Kalifornii a na Floridě), dále v Itálii, na Kypru a Guinei. Část, která je využívána pro těžení citrónového oleje, je hlavně kůra plodů. Citrónový olej se získává studenou expresí z kůry ovoce. Není příliš stabilní. Získ stabilního oleje se provádí odstraněním terpenů a seskviterpenů, a to pomocí protiproudé extrakce. Tento olej je mnohem rozpustnější ve vodných alkoholech a obsahuje až 70 % aldehydů, většinou citral. Hlavní producenti citrónového oleje jsou Spojené státy, Itálie, Kypr a Guinea. Celosvětová produkce je 1400 tun ročně [70, s. 217 – 218], [71, s. 205].

Citrónový olej obsahuje přibližně 90 % monoterpenů. Těchto 90 % zahrnuje 70 % limonenu, 2 – 6 % aldehydů (citral), alkoholů (linalool, oktanol, nonanol, dekanol, aj.), seskviterpeny, vosky a 0,41 – 0,87 % kumarínu. Struktura citralu a limonenu je znázorněna na Obr. 13 [71, s. 205].



Obr. 13. Struktura citralu (vlevo) a limonenu (vpravo) [72, s. 52]

Nejtypičtější složkou citrónového oleje je citral, který se nachází v kyslíkaté části oleje a zastává jeho charakteristickou vůni a chuť. Citronový olej má účinné antimikrobiální účinky. Olej není pro kůži dráždivý ani senzibilizující. Citronový olej je užíván jako vonná složka v mýdlech, detergentech, krémech, lotionech a parfémeh [70, s. 217 – 218].

4 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na téma modifikace antimikrobní složky v kosmetických gelech. To zahrnovalo charakterizaci základních gelotvorných látek, jejich vlastností, způsoby přípravy gelů a možností jejich využití v průmyslu, především kosmetickém, přehled antimikrobních látek, které se v kosmetických přípravcích hojně využívají, a jejich možné alternativy.

Dále prakticky ověřit účinnost antimikrobních gelů bez přídavku ethanolu jako účinné složky, tzn. nahradit jí alternativou ve formě esenciálních olejů, roztoku kyseliny mandlové, popř. jejich kombinací.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a zařízení

- Destilovaná voda
- Carbomer, Polygel CA, Miča a Harašta, s.r.o, Česká republika
- Karboxymethyl celulóza, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Methyl celulóza, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina mléčná, CHEMAPOL, Česká republika
- Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Ethanol (98 %)
- Tymióvaný olej Nobilis Tilia, Česká republika
- Hřebíčkový olej Nobilis Tilia, Česká republika
- Skořicový olej Nobilis Tilia, Česká republika
- Citronový olej Nobilis Tilia, Česká republika
- Kyselina mandlová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Chlorid sodný, LACH-NER s.r.o., Česká republika
- Chloramin, LACHEMA N.P., Česká republika
- Pufr ftalátový, pH 4
- Pufr fosfátový, pH 7
- Lecitin, MOGADOR s.r.o., Česká republika
- α -histidin, PEAXИM, Rusko
- Tween 80, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Thiosíran sodný, CHEMAPOL, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný, CHEMAPOL, Česká republika
- Gel na ruce dezinfekční, SANYTOL, Česká republika
- Hygienický antimikrobiální gel, BALEA, DM, Německo
- Běžné laboratorní sklo
- Laboratorní plasty (kádinky, špičky pro automatické mikropipety, zkumavky, stříkačky, pasterovy pipety, aj.)
- Digitální váhy KERN 440-45N, KERN & SOHN GmbH, Německo
- Digitální váhy EW420-3NM, KERN & SOHN GmbH, Německo
- Rotační viskozimetr MYR V2-L, Viscotech Hispanie, Španělsko

- Počítač s vyhodnocovacím programem Viscosoftplus pro měření viskozity
- Počítač s vyhodnocovacím programem StatK25 pro statistické vyhodnocení
- pH metr přenosný CPH 51, ELTECA, Česká republika
- pH elektroda THETA, typ HC 103, Česká republika
- Vpichový pH-metr WaterProof, pH Spear, USA
- Míchadlo magnetické MM4, LAVAT, Česká republika
- Vaříč, ETA 2107, Česká republika
- Očkovací pomůcky (plastové špičky, očkovací kličky, hokejky, Petriho misky, zkumavky, papírové disky aj.)
- Mikropipety DISCOVERY COMFORT, HTL, Polsko
- Mikropipety INTECH, MERCI, Česká republika
- Vortex Heidolph REAX top, Německo
- Denzilometr Densi-La-Meter, Emo, Německo
- Laminární box BIO-II-A, Telstar, Německo
- Autokláv Wolf SANoclav, Německo
- Autokláv Varioklav H+P Labortechnik AG, Německo
- Chladnička, Elektrolux, Česká republika
- Třepačka Reax top Heidolph Instruments GmbH, Německo
- Mikrobiologický inkubátor, Memmert GmbH + Co. KG, Německo
- Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 μm , Millipore
- Injekční jehly
- Korkovrt
- Mikrotitrační destička P, Gama Group a.s., Česká republika
- Stopky, Insportline SW Profi Basic, Česká republika
- Plastové kelímky
- Papírové ubrousky

5.2 Použité mikroorganismy

Antimikrobiální účinky připravených gelů byly testovány na bakteriálních kmenech a kvasinkách, jež byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně.

- *Candida albicans* CCM 8275
- *Candida parapsilosis* CCM 8276
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Micrococcus luteus* CCM 734
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Staphylococcus aureus* CCM 3953

5.3 Příprava gelů

Základem pro tvorbu gelů je přítomnost gelotvorných látek. V této práci byly použity látky na bázi syntetických pryskyřic a derivátů celulózy, a to carbomer, známý pod obchodním názvem jako Polygel CA. Dále bylo pracováno s methylcelulózou a karboxymethylcelulózou. Při přípravě gelů vždy postupovalo tak, že do 100 ml kádinky bylo naváženo vypočtené množství gelotvorné látky při dané koncentraci gelotvorné látky (Tab. 3) a navážka byla doplněná destilovanou vodou do celkové hmotnosti 50 g. Tato směs byla důkladně promíchána a ponechána botnat po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po této době došlo k nabotnění, nebo-li ke gelaci dané látky. Následně byly gely podrobeny měření pH a viskozity.

Tab. 3. Receptury gelů s vybranými gelotvornými látkami při daných koncentracích

Gelotvorná látka	Koncentrace gelotvorné látky [%]	Množství gelotvorné látky [g]	Množství destilované vody [g]
Carbomer	0,4	0,2	49,8
	0,6	0,3	49,7
	0,8	0,4	49,6
	1,0	0,5	49,5
Methylcelulóza	0,5	0,25	49,75
	1,0	0,5	49,5
Karboxymethylcelulóza	0,5	0,25	49,75
	1,0	0,5	49,5

5.3.1 Měření viskozity

Měření viskozity gelů bylo prováděno na rotačním viskozimetru Viscotech MYR V2-L. Tento viskozimetr je určen pro měření viskozity dle ISO 2555 a příslušných norem ASTM, které specifikují torzi, rychlost otáček a tvar měřících spindlů. Viskozimetr byl propojen s počítačem, ve kterém byl nainstalován speciální softwarový program (ViscosoftPlus), který umožňuje nastavit jednotlivé parametry, např. počet a rychlost otáček, typ spindlu, aj. Metoda měření na tomto viskozimetru odpovídá metodě dle Brookfielda.

Poté, co vždy byla provedena kalibrace přístroje, byl každý vzorek umístěn do 100 ml kádinky, do níž byl ponořen příslušný spindl. Typ spindlu byl volen vždy v závislosti na předpokládané viskozitě gelu (viz Tab. 4). Proto byl každý vzorek podroben různým RPM (počtu otáček) a měřen po dobu přibližně 60 sekund tak, aby bylo vždy dosaženo konstantní hodnoty viskozity při daném RPM. Byla-li hodnota točivého momentu nad horní hranicí (tj. nad 50 %), byl spindl nahrazen spindlem o jiné geometrii tak, aby se zajistilo, že se hodnoty točivého momentu nachází v rozmezí 10 – 50 %.

Tab. 4. Typy spindlu a jejich rozsahy pro měření viskozity

Typ spindlu	L2	PA	PB	PC
Rozsah viskozity [mPa.s]	$3 \cdot 10^5 - 1,5 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^3 - 1,9 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^3 - 3,8 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^3 - 4,0 \cdot 10^5$
Typ spindlu	PD	PE	PF	-
Rozsah viskozity [mPa.s]	$15,6 \cdot 10^3 - 1,9 \cdot 10^6$	$39 \cdot 10^3 - 4,7 \cdot 10^6$	$78 \cdot 10^3 - 9,4 \cdot 10^6$	-

Jak již bylo zmíněno výše, každý vzorek byl měřen po dobu 60 s a každé 1,2 s byly zaznamenávány hodnoty viskozity, celkem tedy bylo vždy zaznamenáno 50 hodnot. Každý vzorek byl proměřen třikrát vedle sebe. Výsledná hodnota viskozity byla vypočtena z průměru 40 naměřených hodnot, jelikož prvních deset hodnot bylo zanedbáno, tzn., nebylo započítáno do průměru.

5.3.2 Měření pH

Pro měření pH vytvořených gelů byl použit vpichový pH-metr (WaterProof, pH Spear) s přesností měření $\pm 0,1$ pH. Před vlastním měřením byla sonda pH-metru vždy zkalibrována na pufrů o pH 4 a 7. Poté byla sonda vložena do vytvořeného gelu a byla odečtená hodnota pH z displeje přístroje. Jednotlivá měření byla prováděna vždy třikrát vedle sebe, a to vždy při laboratorní teplotě.

5.3.3 Potenciometrická titrace

Potenciometrická titrace je jedna z nejrozšířenějších elektrochemických metod kvantitativního stanovení látek. V potenciometrické odměrné analýze je dosažení bodu ekvivalence zjišťováno na základě měření pH roztoku.

Pro účely našeho stanovení byla provedena alkalimetrická titrace, kdy odměrným roztokem byl alkalický hydroxid s potenciometrickou indikací a sledovanou veličinou bylo pH roztoku, tedy veličina úměrná potenciálu indikační skleněné elektrody. Měření bylo prováděno na pH-metru (CPH 51, ELTECA), jehož stupnice byla cejchovaná v jednotkách pH.

Před samotným měřením byla provedená kalibrace pH-metru pomocí pufrů se známou hodnotou pH. Jednalo se o roztoky ftalátového a fosfátového pufru. Kalibrace byla provedena tak, že do kádinek byly nality příslušné pufrы, a to v takovém množství, aby byla elektroda dostatečně ponořená. Nejdříve byl přístroj kalibrován ftalátovým pufrem o hodnotě $\text{pH} = 4,00$. V případě, že naměřená hodnota pH neodpovídala hodnotě příslušného pH pufru, byla tato upravená pomocí příslušného kalibračního šroubu. Následně byla elektroda ponořena do kádinky obsahující pufr fosfátový a přístroj byl kalibrován na hodnotu $\text{pH} = 7,00$. Po zkalibrování přístroje byl tento připraven k měření.

Vlastní potenciometrická titrace byla prováděna nejprve na roztoku kyseliny mléčné. Koncentrace roztoku kyseliny musela být ale upravena tak, aby jeho pH bylo přibližně 3,00. Toto bylo z důvodu, aby se nastolilo pH odpovídající pH gelu, který tvořil pouze carbomer a voda.

Z potenciometrické titrace byl stanoven bod ekvivalence a množství přídavku roztoku hydroxidu sodného.

5.3.3.1 Potenciometrická titrace roztoku kyseliny mléčné

Jak již bylo řečeno výše, pH roztoku kyseliny mléčné bylo upraveno tak, aby korespondovalo s pH carbomerových gelů, čili přibližně okolo $\text{pH} = 3,00$. Byl tedy připraven 0,1% roztok kyseliny mléčné, který byl postupně titrován 0,1, 0,5 a 1M roztokem NaOH.

Titrace vždy probíhala tak, že do 50 ml kádinky bylo napipetováno 20 ml roztoku kyseliny mléčné. Do roztoku byla ponořená elektroda a bylo měřeno pH. Roztok kyseliny mléčné byl titrován odměrným roztokem NaOH o příslušné koncentraci. Roztok hydroxidu byl postupně po 1 ml přidáván do roztoku kyseliny mléčné. Po každém přídavku odměrného

roztoku hydroxidu byla odečítána hodnota pH z displeje pH-metru. Titrace byla ukončena po přidavku 7 ml odměrného roztoku NaOH.

Druhá a třetí titrace byla provedena stejným způsobem, pouze v oblasti bodu ekvivalence se přidavky odměrného roztoku snížily na přídavek 0,1 ml. V případě koncentrovanějších roztoků NaOH (0,5 a 1M) byly přidavky sníženy dokonce na přídavek 0,05 ml. Po každém přidavku roztoku hydroxidu do roztoku kyseliny mléčné byly hodnoty zaznamenávány do tabulky a následně z nich byly sestrojeny titrační křivky (závislost pH na objemu titračního činidla).

5.3.3.2 Potenciometrická titrace roztoku carbomeru

Pro tuto titraci byly připraveny 0,01 a 0,1% roztoky carbomeru s destilovanou vodou (viz kap. 5.3). Takto připravené roztoky byly titrovány pomocí 0,01 a 0,05M roztoků NaOH (viz kap. 5.3.3.1).

Každá titrace byla provedena 0,05M roztokem NaOH do 0,01% roztoku carbomeru v destilované vodě třikrát vedle sebe. Pro přesné vyhodnocení analýzy byla použita klasická metoda, která vychází z křivky druhé derivace. Ze spotřeby titračního činidla v bodě ekvivalence byl vypočítán obsah NaOH v ml v původním vzorku.

5.3.4 Příprava gelů s etanolem

Příprava gelů s ethanolem zahrnovala obdobný postup jako při tvorbě gelů bez dalších přídatných látek. Rozdíl byl však v rámcovém složení receptury. Byly tedy připraveny gely o koncentraci 0,1, 0,2 a 0,4 hm.% carbomeru, a to tak, že do 100 ml kádinky bylo naváženo příslušné množství carbomeru, které bylo následně doplněno příslušným množstvím destilované vody, a po 24 hodinovém nabotnění bylo přidáno 31,25 g ethanolu. Po přidavku ethanolu byly gely důkladně promíchány a poté byly zneutralizovány 1M roztokem NaOH (Tab. 8) tak, aby se jejich pH pohybovalo okolo 6 a jejich viskozita odpovídala viskozitě určené. Vzorky gelů o různém obsahu carbomeru byly vždy připraveny paralelně vedle sebe.

Rámcová složení gelů s různým obsahem carbomeru a ethanolem uvádí Tab. 5 – 7.

Tab. 5. Antimikrobiální gel s obsahem 0,1 hm.% carbomeru

Složení antimikrobiálního gelu	Obsah složky [hm.%]	Hmotnost složky [g]
Carbomer	0,1	0,1
Ethanol (98%)	30,0	31,25
Destilovaná voda	69,9	68,65

Tab. 6. Antimikrobiální gel s obsahem 0,2 hm.% carbomeru

Složení antimikrobiálního gelu	Obsah složky [hm.%]	Hmotnost složky [g]
Carbomer	0,2	0,2
Ethanol (98%)	30,0	31,25
Destilovaná voda	69,8	68,55

Tab. 7. Antimikrobiální gel s obsahem 0,4 hm.% carbomeru

Složení antimikrobiálního gelu	Obsah složky [hm.%]	Hmotnost složky [g]
Carbomer	0,4	0,4
Ethanol (98%)	30,0	31,25
Destilovaná voda	69,6	68,35

Tab. 8. Přídavky 1M hydroxidu sodného do gelů o příslušném obsahu carbomeru

Obsah carbomeru [hm.%]	Množství přídavku 1M roztoku NaOH [ml]
0,1	0,45
0,2	0,9
0,4	1,8

5.3.5 Příprava gelů s esenciálními oleji

Příprava gelů s obsahem esenciálních olejů probíhala obdobně jako výše uvedené.

Pro jejich přípravu bylo tedy vždy naváženo 0,1 hm.% carbomeru do 50 ml kádinky a přidáno vypočtené množství destilované vody (Tab. 9). Takto připravené roztoky carbomeru a vody byly ponechány 24 hod. v klidu, aby došlo k nabotnutí carbomeru. Následně bylo do gelů přidáno 0,5 hmot.% esenciálního oleje. Po důkladném zamíchání všech složek byl gel zneutralizován 0,23 ml 1M NaOH. Po přídavku roztoku hydroxidu byl gel opět intenzivně promícháván tak, aby došlo k dokonalému zapracování všech složek. Pro každý druh esenciálního oleje byly připraveny vždy dva vzorky. Jednalo se o esenciál-

ní oleje z firmy Nobilis Tilia, konkrétně o hřebíčkový, tymiánový, skořicový a citrónový olej.

Tab. 9. Antimikrobiální gel s přidavkem esenciálních olejů

Složení antimikrobiálního gelu	Obsah složky [hm. %]	Hmotnost složky [g]
Carbomer	0,1	0,05
Esenciální olej	0,5	0,25
Destilovaná voda	99,4	49,7

5.3.6 Příprava gelů s kyselinou mandlovou

Pro přípravu gelů s obsahem kyseliny mandlové bylo nutné připravit sérii gelů o různých koncentracích carbomeru, kyseliny mandlové a hydroxidu sodného. V zásadě se postup přípravy gelů nijak nelišil od přípravy gelů uvedené výše. Do 50 ml kádinky tedy bylo naváženo příslušné množství carbomeru, přidána destilovaná voda a gel byl ponechán 24 hodin k jeho nabotnění. Poté následovala úprava pH roztoku kyseliny mandlové o dané koncentraci na pH = 3,5 pomocí 1M roztoku NaOH. Takto upravený roztok kyseliny byl přidán do nabotnělého carbomeru a vše bylo intenzivně promícháváno. Po důkladném promíchání byl gel zneutralizován 1M roztokem NaOH tak, aby se jejich pH pohybovalo okolo 6 a jejich viskozita odpovídala viskozitě určené. Pro každý gel, resp. koncentraci a hmotnostním zastoupení kyseliny mandlové byly přidavky neutralizátoru rozdílné. Rámcová složení těchto gelů jsou uvedeny v kap. 6.2, konkrétně v Tab. 26.

5.3.7 Příprava směsných gelů

Pod pojmem směsný gel je možno si představit gel s obsahem jak roztoku kyseliny mandlové, tak esenciálních olejů. Příprava těchto gelů byla opět velmi podobná. Bylo naváženo 0,25 g carbomeru do 50 ml kádinky a dováženo 48 g destilované vody. Tento roztok byl ponechán po dobu 24 hodin botnat. Poté byl do jiné kádinky navážen roztok kyseliny mandlové o příslušné koncentraci v množství 1,5 g, jež zaujímal 3 hm. % celkového gelu. Poté bylo jeho pH upraveno pomocí 1M roztoku NaOH na výsledné pH = 3,5. Po úpravě pH byl roztok kvantitativně převeden do kádinky s gelem, k němuž byl dovážen v množství 0,25 g příslušný esenciální olej. Po smíchání látek následovala neutralizace gelů 1M NaOH v množství uvedeném v Tab. 10 – 11.

Tab. 10. Receptury antimikrobiálních gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové a esenciálních olejů

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]	Druh esenciálního oleje	Množství přidavku 1M roztoku NaOH [ml]
I.	0,5	10	Tymiánový	2,0
II.	0,5	10	Hřebíčkový	2,0
III.	0,5	10	Skořicový	2,1
IV.	0,5	10	Citrónový	2,0
V.	0,5	10	Tymiánový	1,5
VI.	0,5	10	Hřebíčkový	1,5
VII.	0,5	10	Skořicový	1,5
VIII.	0,5	10	Citrónový	1,5

Pozn.: Vždy bylo pracováno s 3 hm.% roztoku kyseliny mandlové

Tab. 11. Receptury antimikrobiálních gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové a esenciálních olejů

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]	Druh esenciálního oleje	Množství přidavku 1M roztoku NaOH [ml]
A	0,5	15	Tymiánový	2,5
B	0,5	15	Hřebíčkový	2,5
C	0,5	15	Skořicový	2,5
D	0,5	15	Citrónový	2,0
E	0,5	15	Tymiánový	2,0
F	0,5	15	Hřebíčkový	2,0
G	0,5	15	Skořicový	2,0
H	0,5	15	Citrónový	2,0

Pozn.: Vždy bylo pracováno s 3 hm.% roztoku kyseliny mandlové

5.3.8 Příprava živných médií

Pro stanovení antimikrobní účinnosti vyrobených gelů bylo nezbytné připravit řadu živných půd, a to především podle typu mikroorganismů, které měly být pro testování použity.

5.3.8.1 *Nutrient agar*

Pro kultivaci mikroorganismů tj. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Micrococcus luteus* byly připraveny pevné půdy typu Nutrient agar (NA). Jedná se o agary, které obsahují složky uvedené v Tab. 12. Příprava agaru spočívala v navážce 28 g práškové půdy do zásobní láhve, která byla následně rozpuštěna v 1 litru destilované vody. Dále byl tento agar sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci se nechaly zásobní láhve mírně zchladit na vzduchu a takto připravená živná půda byla vylita do sterilních plastových Petriho misek. Po ztuhnutí agarů v miskách na něj byly očkované příslušné mikroorganismy. Očkování bylo provedeno v aseptickém prostředí v laminárním boxu pomocí bakteriologické kličky z kapky původního kmenu mikroorganismu. Průběžně sterilizovanou kličkou byl substrát rozočkovaný.

Tab. 12. Složení Nutrient agaru

Složení živné půdy	Hmotnost složky [g/l]
Pepton A	5,00
Chlorid sodný	5,00
Hovězí extrakt	1,50
Kvasničný extrakt	1,50
Agar	15,00

5.3.8.2 *Sabouraud Chloramphenicol agar*

Sabouraudův agar sloužil také pro kultivaci mikroorganismů, nikoliv však pro bakterie, ale pro kvasinky. Jedná se o speciální půdu používající se pro kvasinkové mikroorganismy. Standardní složení agaru je uvedeno v Tab. 13.

Tab. 13. Složení Sabouraud Chloramphenicol agaru

Složení živné půdy	Hmotnost složky [g/l]
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,00
Masový pepton	5,00
Dextrosa	40,00
Chloramfenikol	0,05
Agar	15,00

Sabouraudův agar byl připraven tak, že bylo naváženo 65 g agarového prášku, toto bylo následně rozpuštěno v 1 litru destilované vody a sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Další postup korespondoval s postupem, který je uveden v kap. 5.3.4.1. Očkování mikroorganismů bylo prováděno kvasinkovým substrátem obsahujícím kvasinky *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*.

5.3.8.3 Nutrient broth

Živná půda Nutrient broth (NB) slouží pro přípravu tekutých půd. Složení NB je uvedeno v Tab. 14. Půda byla připravena tak, že bylo naváženo 13 g prášku do zásobní láhve, jež byl rozpuštěn v 1 litru destilované vody a sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci byl bujón rozpipetován do sterilních zkumavek a uložen do chladničky. Bujóny sloužily zejména pro pomnožení bakterií pro účely dalších mikrobiálních stanovení.

Tab. 14. Složení Nutrient brothu

Složení bujónu	Hmotnost složky [g/l]
Pepton A	5,00
Chlorid sodný	5,00
Hovězí extrakt	1,50
Kvasničný extrakt	1,50

5.3.8.4 Müller-Hinton agar

Tento typ půdy se běžně používá na testování mikrobiálního růstu mikroorganismů. Müller-Hinton agar (MHA) byl připraven tak, že bylo naváženo 38 g, rozpuštěno v 1 l destilované vody a sterilizováno při teplotě 121°C po dobu 21 minut. Po sterilizaci byly tekuté agary rozlity na sterilní Petriho misky. Složení agaru je v Tab. 15.

Tab. 15. Složení Mueller-Hinton agaru

Složení živné půdy	Hmotnost složky [g/l]
Hovězí masová infúze	300,00
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,50
Škrob	1,50
Agar	17,00

5.3.8.5 Tryptonový sójový bujón

Trypton sojový bujón (TSB) slouží pro zkušební metodu hygienické dezinfekce rukou. Složení tohoto média je uvedena v ČSN EN 1500. Příprava bujónu zahrnovala navážení jednotlivých složek (Tab. 16) do zásobní láhve, poté rozpuštění v 1 l destilované vody. Následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Tab. 16. Složení tryptonového sójového bujónu

Složení bujónu	Hmotnost složky [g/l]
Trypton, pankreaticky natrávený kasein	15,0
Sójový pepton, papainem natrávená sójová mouka	5,0
Chlorid sodný	5,0

5.3.8.6 Tryptonový sójový agar

Tryptonový sójový agar (TSA) sloužil také pro zkušební metodu hygienické dezinfekce rukou, konkrétně pro stanovení celkového počtu živých mikroorganismů před a po aplikaci připravených antimikrobiálních gelů.

Příprava TSA probíhala tak, že bylo naváženo 40 g této půdy do infuzní láhve a rozpuštěno v 1 l destilované vody. Opět probíhala sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci byly tekuté agary opět vylity na Petriho misky, kde ztuhly a byly tak připraveny pro zkušební metodu dle ČSN EN 1500. Složení agaru je znázorněno v Tab. 17.

Tab. 17. Složení TSA

Složení živné půdy	Hmotnost složky [g/l]
Trypton, pankreaticky natrávený kasein	15,0
Sójový pepton, papainem natrávená sójová mouka	5,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	15,00

5.3.9 Disková difúzní metoda

Pro diskovou difúzní metodu (DDM) byly použity čisté kultury mikroorganismů *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Z Petriho misek byly do zkumavek s připravenými bujóny (Nutrient broth) naočkovány kultury těchto mikroorganismů. Následně byly takto připravené zkumavky umístěny na třepačku, kde byly mírně protřepávány po dobu 24 hodin při teplotě 22 °C. Po uplynutí předepsané doby byly tyto bakteriální suspenze z důvodů vysoké hustoty inokula zředěny fyziologickým roztokem na výslednou hodnotu 0,5 podle McFarlandovy stupnice (McF). Tato hodnota zákalu byla zvolena z důvodů souvislého nárůstu mikroorganismů. Takto připravená inokula bakterií byla za aseptických podmínek naočkována v množství 100 µl na Petriho misky s Müller-Hinton agarem, následně byla rozetřena pomocí sterilní hokejky. Po zaschnutí inokula byly na agar umístěny standardní papírové disky o průměru 5 mm. Sestava disků na 1 Petriho misce byla maximálně 6 disků/miska.

Dále byly připraveny vzorky kyseliny mandlové v koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45%. Nejdříve byl připraven zásobní roztok 45% roztoku kyseliny mandlové, a to tak, že bylo do kádinky naváženo 22,5 g kyseliny, která byla rozpuštěna v malém množství destilované vody. Tento roztok byl umístěn na vařič a za mírného varu byl míchán a pomalu rozpuštěn. Následně byl rozpuštěný roztok kyseliny mandlové kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Poté bylo z této baňky odpipetováno vypočítané množství (Tab. 18), jež bylo převedeno do 5 ml odměrné baňky a doplněné destilovanou vodou po rysku.

Tab. 18. Koncentrace roztoků kyseliny mandlové

Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]	Pipetovaný objem [ml]
5	0,6
10	1,1
15	1,6
20	2,2
25	2,7
30	3,3
35	3,9
40	4,4
45	5,0

Vzorky antimikrobiálních látek pro stanovení, zejména roztoky kyseliny mandlové byly nejdříve přefiltrovány přes sterilní filtr o velikosti pórů 0,22 µm do sterilních zkumavek. Poté byly tyto látky nanášeny na jednotlivé disky v množství 5 µl, dále byla na misku napipetována destilovaná voda, která sloužila jako kontrola. Takto připravené misky byly kultivovány v termostatu dle požadavků příslušných mikroorganismů (*E. coli* 37 °C/24h, *S. aureus* 37 °C/24h, *M. luteus* 37 °C/48h, *P. aeruginosa* 30 °C/24h a kvasinky při pokojové teplotě po dobu 48 hodin). Po stanovené době kultivace byl měřen okolo každého disku průměr inhibičních zón. Samotná velikost inhibiční zóny byla vypočítána dle následujícího vzorce:

$$\text{Velikost inhib. zóny} = \frac{\varnothing \text{ inhibiční zóny} - \varnothing \text{ disku}}{2} \quad (2)$$

5.3.10 Jamková difúzní metoda

Pro tuto metodu byla připravena bakteriální suspenze stejným způsobem, jak je uvedeno v předešlé kapitole, tj. kap. 5.3.9.

Samotné testování bylo provedeno tak, že do šesti sterilních zkumavek bylo napipetováno inokulum bakterií, sestávající se z fyziologického roztoku a příslušných mikroorganismů s hodnotou zákalu 0,5 a 0,1 McF. Inokula byla na Petriho misku pipetována v množství 1000 µl a následně byla přelita Müller-Hinton agarem. Krouživým pohybem misky byla inokulem pokryta celá plocha agaru. Při dalších experimentech bylo toto přelévání nahrazeno hokejkováním, tzn., že na připravený agar bylo napipetováno 100 µl inokula, které bylo rozetřeno po ploše agaru. Tento způsob aplikace inokula byl efektivnější pro následné odečítání inhibičních zón. Dále byly do suchého agaru pomocí korkovrtu vyhloubeny jamky o průměru 5 mm. Do těchto jamek bylo pipetováno přibližně 300 µl gelu s aktivními látkami tak, aby jeho množství bylo v rovině s agarem. Do kontrolní jamky byla pipetována destilovaná voda, která sloužila jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byl použit vyrobený gel s 30 % ethanolu a dále komerční vzorky dezinfekčních gelů se 45 a 60 % ethanolu. Jednalo se o hygienický antimikrobiální gel Balea DM (100 g produktu obsahovalo 45 g ethanolu) a gel na ruce dezinfekční SANYTOL (6.10² g/kg ethanolu). Dále byl použit i samotný 96% ethanol. Všechny stanovované gely byly stanovovány paralelně vedle sebe. Takto připravené Petriho misky byly po předepsanou dobu umístěny do termostatu o teplotě potřebné pro kultivaci jednotlivých mikroorganismů. Po kultivaci byly odečteny inhibiční zóny.

5.3.11 Doplnková metoda

Pro doplňkovou metodu byla opět z Petriho misek naočkována čistá kultura mikroorganismů (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*) do zkumavek s připravenými bujóny (NB). Následně byly tyto zkumavky umístěny na třepačku, kde byly při teplotě 22 °C a po dobu 24 hod. mírně protřepávány. Po uplynulé době byla tato bakteriální suspenze ředěna fyziologickým roztokem na výslednou hodnotu zákalu 0,5 McF. Poté bylo 20 µl takto připraveného inokula mikroorganismů napipetováno do sterilní mikrotitrační destičky. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 µl testovaného gelu. Celkem bylo tedy zaplněno 54 jamek z 96, přičemž 6 jamek bylo kontrolních, tzn. že v nich bylo 20 µl inokula a 200 µl destilované vody. Kultivace takto připravené mikrotitrační destičky probíhala po dobu 1 hodiny a při teplotě 30 °C. Poté bylo z jednotlivých jamek odebíráno 100 µl suspenze a pipetováno na sterilní Petriho misky s Nutrient agarem. Z každé jamky bylo tedy odebráno 2 x 100 µl suspenze pro dvojí stanovení. Po nanesení suspenze na agar byla suspenze rozhokejována. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány v termostatu opět dle požadavků na kultivaci příslušných mikroorganismů (*E. coli* 37 °C/24h, *S. aureus* 37 °C/24h, *M. luteus* 37 °C/48h, *P. aeruginosa* 30 °C/24h a kvasinky při pokojové teplotě po dobu 48 hodin).

5.3.12 Zkušební metoda dle ČSN EN 1500

Pro tuto metodu byly zvoleny čtyři gely s aktivními látkami, tj. kyselinou mandlovou a esenciálními oleji, které vykazovaly nejlepší výsledky předešlých mikrobiologických zkoušek. Dále bylo přihlíženo na pH gelu, které odpovídalo pH kůže (5,5 – 6,5), a v neposlední řadě i na viskozitu vytvořených gelů (5000 – 15000 mPa.s). Vybrané gely a jejich složení je znázorněno v Tab. 19. Jako srovnávací vzorek byly použity komerční dezinfekční gely s aktivní látkou ethanolem.

Tab. 19. Vybrané směsné gely pro testování dle ČSN EN 1500

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Esenciální olej	Koncentrace kyseliny mandlové [%]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
1	0,5	Tymiánový	10	6,50	6406 ± 11
2	0,5	Hřebíčkový	10	6,04	12833 ± 16
3	0,5	Skořicový	10	5,77	8243 ± 29
4	0,5	Citrónový	15	5,67	6328 ± 26

Pozn.: Vždy bylo pracováno s 3 hm.% roztoku kyseliny mandlové

5.3.12.1 Příprava neutralizátoru

Neutralizátor sloužil pro zjištění koncové hodnoty antimikrobiálního účinku při zkoušce antimikrobiálních gelů. Složení neutralizátoru bylo uzpůsobeno chemickému složení antimikrobiálních látek gelů. Mezi aktivní látky neutralizátoru patřil Tween 80, který neutralizoval alkoholy, amfotermní sloučeniny a fenolické látky, dále Lecitin, jež neutralizoval to samé. L-histidin působil neutralizačně na aldehydy, thiosíran sodný na kyslíkaté sloučeniny a jako poslední dihydrogenfosforečnan draselný. Tyto látky byly naváženy do zásobní láhve a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 200 ml. Jednotlivé navážky jsou znázorněné v Tab. 20. Poté byl neutralizátor sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Tab. 20. Složení neutralizátoru

Složení neutralizátoru	Hmotnost složek [g]
Tween 80	6,0
Lecitin	0,6
L-histidin	0,2
Thiosíran sodný	1,0
Dihydrogenfosforečnan draselný	6,8

5.3.12.2 Příprava pro hygienickou dezinfekci rukou

Ruce probandů byly otírány o dno Petriho misky, která obsahovala 10 ml TSB bez neutralizátoru. Otírání rukou probíhalo po dobu 60 sekund. Cílem bylo uvolnění mikroorganismů před působením zkoušeného gelu. Z této tekutiny bylo odebráno za aseptických podmínek 100 µl a přeneseno na předem připravené plotny a TSA agarem. Následovalo rozhojekování tekutiny po povrchu agaru. Následně byly tyto misky umístěny do termostatu o teplotě 37 °C/24 hod.

5.3.12.3 Hygienická dezinfekce rukou se zkoušeným gelem

Bezprostředně po odebrání vzorků pro přípravu hygienické dezinfekce ruku, tj. pro zjištění počátečních hodnot mikroorganismů a bez rekontaminace rukou, bylo probandům nanášeno množství 3 ml zkoušeného gelu. Hygienická dezinfekce rukou byla provedena dle standardního postupu, uvedeného v příloze P I. To zahrnovalo pět tahů dozadu a dopředu dlaněmi k sobě, pravou dlaní přes levý hřbet a levou dlaní přes pravý hřbet s propletenými prsty, sevřít zadní strany prstů do protilehlé dlaně, otáčením mnout pravý

palec v sevření levé dlaně a levý palec sevřený v pravé dlani, otáčením mnout sevřené prsty pravé ruky v dlani levé ruky a levé ruky v dlani pravé ruky. Tento postup se opakoval tak dlouho, dokud celkový čas vtírání nedosáhl 60 sekund.

5.3.12.4 Hodnoty mikroorganismů po hygienické dezinfekci rukou

Ihned po hygienické dezinfekci rukou byly konce prstů, včetně palce, otírány 60 sekund o dno Petriho misky obsahující 10 ml půdy TSB s 10 ml neutralizátoru. Poté bylo odebráno 100 µl půdy a přeneseno na TSA agar. Tekutina byla rozhojekována a spolu s předešlými Petriho miskami byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí stanovené kultivační doby byl zhodnocen nárůst mikroorganismů na plotně a srovnán s plotnou s počátečními hodnotami konkrétního probanda.

5.3.13 Senzorická analýza antibakteriálních gelů

Pro senzorické hodnocení antimikrobiálních gelů byly vybrány čtyři gely s přidavkem esenciálních olejů a kyseliny mandlové (Tab. 19) a dále komerční antimikrobiální gel s účinnou látkou ethanolem (SANYTOL, 60 % ethanolu). Byla připravená sada antimikrobiálních gelů, které byly označeny písmeny A, B, C, D, E o objemu 5 ml. Tyto vzorky byly předloženy 12-ti hodnotitelům, kteří měli za úkol zhodnotit jednotlivé znaky předložených vzorků gelů dle příslušného zadání (příloha P II).

5.3.13.1 Senzorické hodnocení s použitím stupnic

Samotné hodnocení s použitím stupnic vypadalo tak, že posuzovatelům byl předán protokol, kde byly uvedeny senzorické znaky, které byly u vzorků hodnoceny. K tomu obdrželi stupnice, dle kterých byl vzorek zařazován. Ke stupnicím hodnotitelé obdrželi i definici jednotlivých stupňů u příslušných senzorických znaků. Po obdržení vzorků je posuzovatelé posoudili a v souladu se stupnicí zapsali svá hodnocení (zpravidla pomocí čísla stupně, který vzorku prisoudili). Toto bylo provedeno u každého hodnoceného znaku a vzorku. Pro hodnocení konzistence a roztíratelnosti byly v jednotlivých kójkách připraveny sklíčka a skleněné tyčinky. Pro vstřebatelnost gelů bylo hodnotitelům doporučeno rozetření malého množství sensorovaného gelu na volární stranu zápěstí a jeho ponechání na něm po dobu 1 minuty.

Pomocí 5-ti bodové ordinální hédonické stupnice 2. druhu byly hodnoceny vzhled a barva gelů, dále vůně, konzistence, roztíratelnost a jejich vstřebatelnost. Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu StatK25, konkrétně pomocí Kruskal-Wallisového testu.

Tento test má za cíl stanovit, zda jsou všechny vzorky stejné, nebo alespoň jeden ze vzorků je odlišný od jiných. Hladina významnosti byla 5 %, tj. bylo otestováno, které vzorky se od sebe liší.

5.3.13.2 Pořadová zkouška

Pořadová zkouška spočívala v tom, že posuzovatel obdržel v náhodném pořadí skupinu vzorků a jeho úkolem bylo seřadit vzorky dle vlastních preferencí. Příprava vzorků byla provedena korektně tak, aby posuzovatelé neměli možnost vyvozovat závěry o vlastnostech vzorků ze způsobu, jakým jsou předloženy. Zpravidla bylo doporučováno, aby na jedno místo v pořadí byl přiřazen pouze jeden vzorek, tzv. nucená volba. Výsledky posuzovatelů byly zaznamenány do předem připravených dotazníků (viz P II). Pořadová zkouška byla vyhodnocována pomocí Friedmanova testu v programu StatK25. Byla porovnávána průměrná pořadí pro všechny proměnné, jelikož je tento test založen na pořadí hodnot a jeho základní ideou je fakt, že pokud není rozdíl mezi výběry, pak není rozdíl mezi průměrnými pořadími.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Před vlastním měřením byla provedená série pre-experimentů, kde byly testovány různé gelotvorné látky. Jednalo se o látky na bázi derivátů celulózy, tj. karboxymethylcelulóza, methylcelulóza, a dále na bázi syntetických pryskyřic (carbomer). Tento pre-experiment zahrnoval přípravu gelů o různých koncentracích na bázi výše zmíněných látek. U takto připravených gelů bylo zjišťováno jejich pH a viskozita. Jednotlivé koncentrace a navážky jsou uvedeny v Tab. 3.

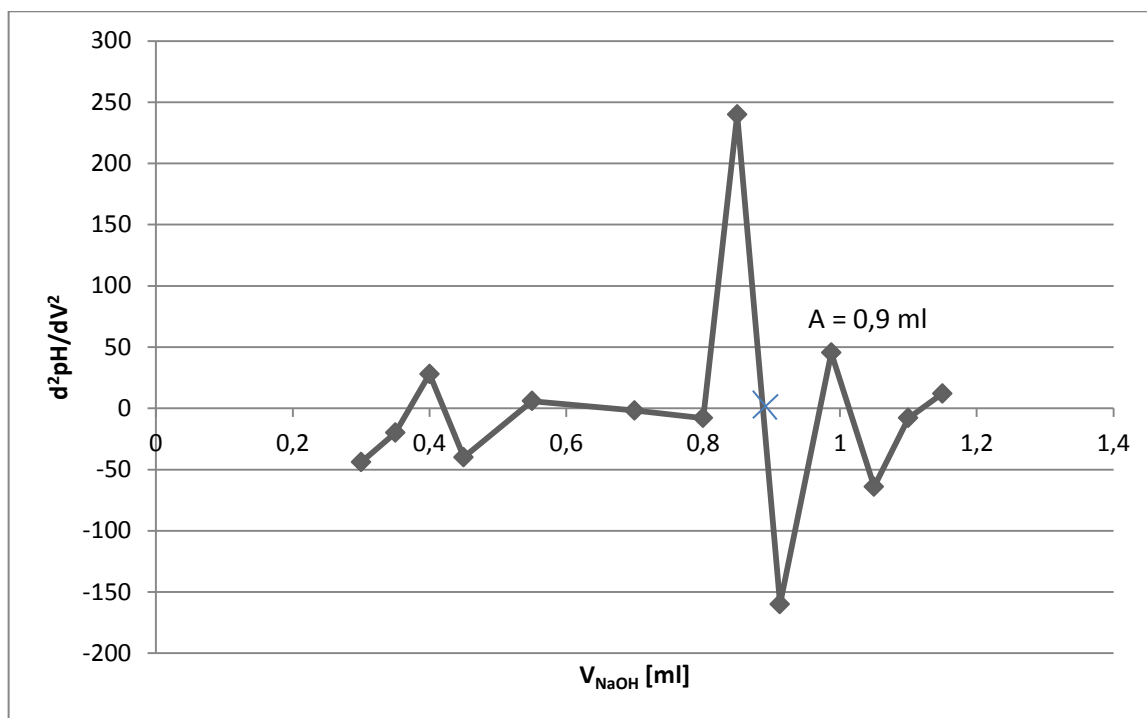
Při prvotním výběru gelotvorné látky byla právě viskozita jedním z nejdůležitějších kritérií. Proto i pro další práci byl vybrán carbomer, tj. látka na bázi syntetické pryskyřice, jelikož při jeho různém obsahu ve směsi byla viskozita vzniklého gelu daleko vyšší, než tomu bylo u methylcelulózy a karboxymethylcelulózy. Jednotlivé hodnoty viskozit a pH u příslušných obsahů gelotvorných látek v gelech jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21. Naměřené hodnoty pH a viskozity gelů s obsahem různých gelotvorných látek

Gelotvorná látka	Obsah gelotvorné látky [hm.%]	pH vyrobeného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
Carbomer	0,4	3,02	1636 ± 8
	0,6	2,98	2979 ± 18
	0,8	2,89	7364 ± 14
	1,0	2,80	9238 ± 30
Methylcelulóza	0,5	6,58	-
	1,0	6,30	38 ± 1
Karboxymethylcelulóza	0,5	6,59	34 ± 1
	1,0	6,37	156 ± 6

U všech vyrobených gelů byla nutná úprava jejich pH pomocí roztoku hydroxidu sodného. Proto byla nezbytné provést potenciometrickou titraci, ze které by bylo možné určit množství přídavku roztoku hydroxidu sodného. Nejprve byla tedy provedena potenciometrická titrace připraveného gelu s obsahem 0,01 % carbomeru 0,05M roztokem hydroxidu sodného, kdy bylo zjišťováno pH gelu po jednotlivých přídavcích roztoku NaOH. Množství přídavku NaOH záviselo na pH gelu, tj. za oblastí bodu ekvivalence byla titrace ukončena. Z výpočtu druhé derivace a spotřeby titračního činidla byl sestaven graf (Obr. 14), ze kterého bylo možné určit přesnou spotřebu 0,05M roztoku NaOH. Přepočtem na jiný obsah carbomeru byl pak zjištěn přídavek 1M roztoku NaOH, tzn. že pro gel s obsahem 0,4 % carbomeru byl přídavek 1M roztoku NaOH stanoven na hodnotu 1,8 ml

na celkové množství gelu 100 g. Tento přídavek roztoku NaOH byl pak dále použit jednak pro úpravu pH vyrobených gelů, a jednak pro úpravu jejich viskozity.



Obr. 14. Křivka 2. derivace titrační křivky v okolí bodu ekvivalence

Pro výběr optimálního obsahu gelotvorné látky, zejména z hlediska viskozity výsledného gelu, byly připraveny další vzorky gelů s obsahem 0,1, 0,2 a 0,4 % carbomeru. Výsledky měření pH a viskozity vyrobených gelů jsou uvedeny v Tab. 22.

Tab. 22. Hodnoty měření pH a viskozity carbomerových gelů

Vzorek	Obsah gelotvorné látky [hm. %]	Množství přídavku 1M roztoku NaOH [ml]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
I.	0,1	0,45	5,67	10698 ± 79
II.	0,1	0,45	5,65	10768 ± 16
I.	0,2	0,9	5,84	15450 ± 41
II.	0,2	0,9	5,85	15938 ± 75
I.	0,4	1,8	5,97	39903 ± 85
II.	0,4	1,8	5,96	35119 ± 22

Na základě naměřených výsledků (viskozity a pH) byl tedy zvolen gel s obsahem carbomeru 0,1 % a množstvím přídavku 1M roztoku NaOH 0,45 ml, jelikož viskozita dezinfekčních gelů z důvodů jejich snadné aplikace nesmí být příliš vysoká. Gel s obsahem

0,2 % carbomeru měl viskozitu podobnou výše zmíněnému, ale s ohledem na další přídavky antimikrobiálních složek obsahujících hydroxy skupiny, a tudíž k možnému riziku dalšího zvýšení viskozity, byl nakonec zvolen 0,1% obsah carbomeru v gelu.

6.1 Vliv vybraných antimikrobních látek na inhibici mikroorganismů

Před vlastním přídavkem antimikrobní přísady do gelů ji bylo třeba podrobit testování velikosti jejich inhibičních účinků. Proto byly veškeré použité antimikrobní přísady testovány vůči vybraným druhům gram-negativních a gram-pozitivních bakterií a kvasinek. Pro toto testování byla použita disková difúzní metoda, pro kterou byly připraveny různé koncentrace roztoků kyseliny mandlové (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 %) do 5 ml odměrných baněk. Vybrané druhy esenciálních olejů (hřebíček, skořice, citrón, tymián) byly použity v neředěném stavu, čili v jejich 100% koncentraci. Metoda byla prováděná dle metodiky uvedené v kap. 5.3.9.

Diskovou difúzní metodou byla tedy prokázána inhibice růstu, a to u většiny testovaných bakteriálních kmenů a kvasinek. Výsledky testování jsou shrnuty v Tab. 23 – 24.

Tab. 23. Inhibiční účinky roztoků kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí diskové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
c [%]	Velikost inhibičních zón [mm]					
5	0,5	1,5	1,0	1,3	1,3	1,0
10	1,5	2,5	0,8	2,0	1,8	1,8
15	2,5	3,0	1,3	5,0	1,5	1,5
20	3,5	5,3	5,3	7,0	2,0	1,8
25	3,0	3,8	2,0	6,8	2,0	1,8
30	3,0	4,8	3,0	7,8	1,8	1,8
35	3,0	5,3	5,3	7,0	2,0	1,8
40	3,6	5,5	8,5	8,3	2,0	1,8
45	4,3	9,0	7,0	11,8	2,3	2,5
Kontrola	-	-	-	-	-	-

Pozn. – žádné inhibiční zóny, c koncentrace kyseliny mandlové

Tab. 24. Inhibiční účinky esenciálních olejů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí diskové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Druh EO	Velikost inhibičních zón [mm]					
Citrónový	-	-	2,3	2,8	4,5	7,5
Hřebíčkový	5,5	2,0	5,3	12,8	8,8	11,8
Skořicový	7,8	3,5	11,8	18,3	15,0	14,8
Tymiánový	5,0	21,3	20,5	21,3	15,0	8,8

Pozn.: – žádné inhibiční zóny, ES esenciální olej

Na základě výsledků z diskové difúzní metody byly tedy vybrány účinné koncentrace roztoků kyseliny mandlové, které byly následně použity pro výrobu gelů s antimikrobiálními vlastnostmi. Jednalo se konkrétně o koncentrace od 5 do 20 %. Tyto koncentrace byly vybrány především z důvodů podobných výsledků velikosti inhibičních zón, jako tomu bylo u vyšších koncentrací kyseliny mandlové v roztoku (25 – 45 %) a hlavně i z důvodu její lepší rozpustnosti ve vodě při její nižší koncentraci.

U esenciálních olejů se jednalo pouze o zjištění míry antimikrobiálního účinku pro následné srovnání s účinky esenciálních olejů v gelech a posléze i ve směsných gelech spolu s kyselinou mandlovou.

6.2 Vliv přídavku antimikrobiálních látek

Jak již bylo zmíněno výše, jako antimikrobiální složky gelů byly tedy vybrány 4 druhy esenciálních olejů a následně i 5 – 20% roztoky kyseliny mandlové ve vodě.

Jako první byly připraveny gely s esenciálními oleji, které obsahovaly 0,1 hm.% carbomeru (viz kap. 5.3.5), a 0,5 hm.% příslušného esenciálního oleje (0,25 g).

Nejdříve bylo nutné vyzkoušet, zda má na tvorbu a stabilitu gelů vliv pořadí přídavků jednotlivých složek, hlavně esenciálního oleje a roztoku NaOH. Proto byly připraveny dva vzorky gelů, kdy u prvního předcházela přídavek esenciálního oleje do gelů před přídavkem roztoku NaOH. U druhého vzorku bylo pořadí přídavků těchto složek přehozeno, tzn. že nejprve byl gel zahuštěn roztokem NaOH a až poté byl přidán esenciální olej. Bohužel u druhého postupu i po intenzivním promíchání všech složek došlo k separaci esenciálního oleje od gelu, a proto nebyl tento postup již dále používán.

Takže příprava gelů s obsahem esenciálních olejů jako antimikrobní složky probíhala vždy tak, že ihned po přidavku 0,5 hm.% příslušného esenciálního oleje do nabotnalého gelu a po jeho intenzivním promíchání bylo u každého vzorku gelu změřeno pH. Dále bylo do gelu přidáno 0,23 ml 1M roztoku NaOH, vše bylo intenzivně promícháno a opět bylo proměřeno pH. Díky intenzivnímu mechanickému míchání došlo k dokonalému rozptýlení esenciálních olejů do gelů. Bylo ale pozorováno mírné zakalení a zbarvení gelů do jemně nažloutlé barvy a také byla pozorována výrazná ztráta charakteristických bublin. Po vyrobení gelů byla u každého vzorku vždy změřena jejich viskozita (Tab. 25).

Tab. 25. Hodnoty pH a viskozity u gelů s přidavkem esenciálních olejů

Vzorek	Gely s esenciálními oleji	pH připraveného gelu	pH gelu po úpravě 1M roztokem NaOH	Naměřená viskozita [mPa.s]
I.	Citrónový	3,52	6,15	9080 ± 32
II.	Citrónový	3,49	6,26	10886 ± 12
I.	Hřebíčkový	3,72	6,37	9488 ± 45
II.	Hřebíčkový	3,48	6,42	8558 ± 40
I.	Skořicový	3,67	6,21	6859 ± 33
II.	Skořicový	3,65	6,04	8429 ± 8
I.	Tymiánový	3,81	6,12	11070 ± 40
II.	Tymiánový	3,82	6,26	8257 ± 37

Gely obsahující ve své formulaci 0,5 hm.% esenciálního oleje byly po celou dobu testování, tj. cca 60 dnů, a při teplotě laboratoře (22 °C) stabilní.

Jako další byly připraveny gely s přidavkem roztoku kyseliny mandlové a obsahu carbomeru 0,1 hm. %. Koncentrace roztoku kyseliny mandlové byla stanovena na základě vyhodnocení diskové difúzní metody. Nejdříve bylo tedy pracováno s 20% roztokem kyseliny mandlové, protože tento roztok vykázal při diskové difúzní metodě velmi dobré inhibiční účinky. Konkrétně to bylo s 1, 3 a 5 hm.% dvacetiprocentního roztoku kyseliny mandlové. Po přidavku vypočteného množství kyseliny mandlové do 24 hod. nabotnalého gelu a následném přidavku 0,23 ml 1M roztoku NaOH nedošlo téměř ke zvýšení pH a viskozity gelů, nýbrž došlo k jeho rozpadu. Totéž bylo provedeno i u stejných přidavků roztoků kyseliny mandlové o koncentracích 5, 10 a 15 % a vždy došlo k rozpadu gelu. Proto bylo vždy před přidavkem roztoku kyseliny mandlové do gelu nutné upravit jeho pH. Hodnota pH samotného 5% roztoku kyseliny mandlové bylo 2,28 a bylo třeba jej upravit min. na hodnotu pH 3, jinak by nedošlo k tvorbě gelu, tak jak je napsáno v kap. 2.4.1.1.

Samotný carbomer totiž vytváří ve vodném roztoku mírně kyselé prostředí (přibližně pH 3). pH kyseliny mandlové bylo v rozsahu od 1,88 (45% roztok kyseliny) do 2,28 (5% roztok kyseliny), proto po přidavku roztoku kyseliny vždy došlo k razantnímu poklesu pH roztoku carbomeru, případně k jeho vysrážení (Obr. 5 v teoretické části). Úprava pH byla provedena 0,05M roztokem NaOH. Bohužel úprava pH na hodnotu 3 nebyla dostačující a opět došlo k vysrážení carbomeru. Proto bylo přistoupeno k dalšímu zvýšení pH roztoku kyseliny mandlové, a to na hodnotu 3,5. Toto bylo provedeno pomocí 1M roztoku NaOH, jelikož při použití slabšího roztoku NaOH, tj. 0,05M, by ho bylo třeba použít větší množství a došlo by tak k výraznému naředění roztoku. Po přidání takto upraveného roztoku kyseliny mandlové do gelu a jeho promíchání bylo třeba upravit hodnotu pH a viskozity výsledného gelu. Opět byl k tomuto kroku použit 1M roztok NaOH. Po jeho intenzivním mechanickém promíchání v gelu došlo k vytvoření finálního gelu s dostatečnou viskozitou a pH vhodným pro pokožku.

Při další přípravě gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové byla připravena série gelů o koncentraci carbomeru 0,3 a 0,4 hm.% a koncentraci kyseliny mandlové ve vodě od 5 do 10 % (3 a 5 hm.%, Tab. 26).

Tab. 26. Rámcové složení gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Obsah roztoku kyseliny mandlové [hm.%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]
A	0,3	3	5
B	0,3	3	5
C	0,3	3	5
D	0,4	3	5
E	0,3	5	5
F	0,4	5	5
G	0,3	5	5
H	0,3	3	10
I	0,4	3	10
J	0,4	5	10
K	0,4	5	10
L	0,4	5	10
M	0,3	5	10

Všechny přidavky roztoků kyseliny mandlové byly upraveny na pH přibližně 3,5. Po přidavku roztoku kyseliny do nabotnalých gelů bylo změřeno pH směsí. Následovala neutralizace 1M roztokem NaOH. Po každém přidavku roztoku hydroxidu, tj. 0,23 ml,

a důkladném mechanickém promíchání bylo změřeno výsledné pH gelů a sensoricky zhodnocena jejich viskozita. Účelem bylo vytvořit gely s viskozitou obdobnou gelům s esenciálními oleji a hlavně s pH odpovídajícím pH pokožky, tj. 5,5 – 6,5. Hodnoty pH uvádí Tab. 27.

Tab. 27. Hodnoty pH a sensorické zhodnocení viskozity gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	pH připraveného gelu	pH po úpravě 1M roztokem NaOH	Senzorické zhodnocení viskozity [mPa.s]
A	3,23	6,02	velmi nízká
B	3,51	6,02	velmi nízká
C	3,28	6,44	Optimální
D	3,01	5,40	Optimální
E	3,29	6,25	velmi nízká
F	3,09	6,11	Optimální
G	3,12	6,38	velmi nízká
H	3,20	6,55	velmi nízká
I	3,12	6,05	Optimální
J	3,20	6,05	velmi nízká
K	3,20	6,22	Optimální
L	3,06	6,29	velmi nízká
M	3,19	6,88	velmi vysoká

Na základě tohoto testování bylo vybráno 5 gelů s optimální viskozitou a pH blízkým pH pokožky. Jednalo se o vzorky označené v Tab. 27 jako C, D, F, I a K. Znovu pak byly tyto vzorky připraveny z důvodu ověření použité formulace a změření jejich přesné viskozity. Vzorky gelů byly připraveny paralelně dvakrát vedle sebe (Tab. 28 a 29).

Tab. 28. Přesné přidavky 1M NaOH do gelů s obsahem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Obsah roztoku kyseliny mandlové [hm.%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]	Přídavek 1M roztoku NaOH [ml]
C	0,3	3	5	1,35
D	0,4	3	5	1,15
F	0,4	5	5	1,85
I	0,4	3	10	1,85
K	0,4	5	10	2,28

Tab. 29. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	Vzorek I.		Vzorek II.	
	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
C	6,47	7586 ± 12	6,23	8407 ± 12
D	5,50	11271 ± 15	5,23	11988 ± 40
F	6,46	9371 ± 86	6,20	8899 ± 74
I	6,12	9594 ± 41	6,16	10088 ± 90
K	6,39	9076 ± 24	6,29	8060 ± 25

Poté u nich byla stanovována antimikrobiální aktivita pomocí jamkové difúzní metody.

Pro jamkovou metodu byla také připravena série gelů s koncentrací carbomeru 0,5 a 0,6 hm.% a s vyšší koncentrací roztoku kyseliny mandlové, tj. 15 a 20 %. Zvláštním případem pak byla příprava série gelů, jejichž pH bylo upraveno tak, aby bylo blízké pH 5 (Tab. 30 – 31).

Tab. 30. Rámcové složení gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	Obsah roztoku kyselina mandlové [hm.%]	Koncentrace roztoku kyseliny mandlové [%]
N	0,5	5	5
O	0,5	3	10
P	0,5	3	15
Q	0,6	5	15
R	0,6	3	20

Tab. 31. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	Přídavek 1M roztoku NaOH [ml]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
N	2,0	5,19	12378 ± 13
O	1,75	5,19	10392 ± 62
P	3,5	6,37	6713 ± 18
Q	2,75	6,00	20753 ± 21
R	3,25	6,00	15790 ± 10

Gely s pH blízkým hodnotě 5 byly vytvořeny proto, že při pH blízkém hodnotě 6 nedošlo při jamkové difúzní metodě k žádané inhibici vybraných druhů MO.

Sérii gelů s obsahem antimikrobní složky doplňovaly gely s přidavkem 30 hm.% etanolu (96%). Tyto gely byly připraveny dle receptury, jejíž složení uvádí Tab. 5 - 7. I u této série gelů byla proměřena viskozita a pH (Tab. 32).

Tab. 32. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s obsahem 30 % ethanolu

Vzorek	Obsah carbomeru [hm.%]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
I.	0,1	6,78	5461 ± 44
II.	0,1	6,72	7415 ± 85
I.	0,2	6,23	23162 ± 16
II.	0,2	6,53	24114 ± 14
I.	0,4	6,46	46402 ± 51
II.	0,4	6,46	47155 ± 46

Na základě měření viskozity byl pro další testování vybrán gel s obsahem 0,1 hm.% carbomeru. U vyššího obsahu carbomeru bylo nutné opět zvýšit přidavek 1M roztoku NaOH, tím se však zvýšila i viskozita, což již nebylo pro naše účely žádoucí.

6.3 Vliv jednotlivých antimikrobiálních látek v gelové kompozici na antimikrobiální účinnost

Na základě diskové difúzní metody byly vybrány účinné koncentrace látek, které byly následně přidány do formulací, a tyto byly pak testovány i pomocí jamkové difúzní metody (viz kap. 5.3.10). Nejdříve muselo být provedeno kontrolní ředění bakteriální suspenze v rozsahu 0,5 McF – 0,5.10⁻⁶ McF, z něhož bylo vybráno ředění se souvislým nárůstem mikroorganismů. Bylo tedy vybráno ředění 0,5.10⁻³. Jamková difúzní metoda byla provedena pomocí zalévání mikrobiální suspenze se zákalem 0,5.10⁻³ McF do půdy s následnou tvorbou jamek pomocí korkovrtu. Při vyhodnocení inhibiční účinnosti bylo zjištěno, že ani jeden z připravených gelů, včetně kontrolních vzorků gelů s ethanolem a samotným ethanolem, nejevil žádné známky inhibice. Respektive neobjevil se růst samotných mikroorganismů i přes to, že toto ředění bylo vybráno jako optimální. Proto bylo nutné zvolit jiné ředění, a to ředění 0,5 McF. Poté bylo nezbytné celý postup testování zopakovat. Ani změna ředění nevedla k jakémukoliv nárůstu MO. Proto byla zvolená alternativní metoda rozhořekování bakteriální suspenze se zákalem 0,5 McF po povrchu příslušného agaru s následnou tvorbou jamek korkovrtem. Tato metoda již přinesla kýžené výsledky

nárůstu či inhibice testovacích MO. Získané výsledky velikosti inhibičních zón uvádí Tab. 33.

Tab. 33. Inhibiční účinky gelů s obsahem esenciálních olejů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
Druh MO	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Druh EO	Velikost inhibičních zón [mm]					
Citrónový	-	-	-	-	-	-
Hřebíčkový	2,5	1,5	2,8	-	1,5	1,5
Skořicový	0,8	1,8	2,0	-	4,0	5,5
Tymiánový	3,8	1,0	2,3	3,0	2,5	4,0

Pozn.: MO mikroorganismus, ES esenciální olej, – žádné inhibiční zóny

Jak je z tabulky patrné, nejlepších antimikrobních výsledků dosahoval gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje. Dále pak gel s přídavkem hřebíčkového a skořicového esenciálního oleje. Gel obsahující citronový esenciální olej nevykazoval žádnou antimikrobní aktivitu i přesto, že při diskové difúzní metodě ano.

U gelů s přídavkem roztoků kyseliny mandlové, připravených dle Tab. 28, nebyly také prokázány inhibiční účinky (Tab. 34). Proto byla připravena další série gelů s obsahem roztoků kyseliny mandlové, jak je uvedeno v kap. 6.2, dle receptury uvedené v Tab. 30.

Tab. 34. Inhibiční účinky gelů s kyselinou mandlovou na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
Druh MO	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Vzorek	Velikost inhibičních zón [mm]					
C	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-

Pozn.: MO mikroorganismus, – žádné inhibiční zóny

Po testování těchto gelů proti vybraným bakteriálním kmenům bylo zjištěno, že gel, u něhož bylo pH sníženo na hodnotu 5 vytvářel mírnou inhibiční zónu, jednalo se o gel s označením N (Tab. 35). Další gely, které vykazovaly mírnou inhibici vůči vybraným

bakteriálním kmenům byly gely s obsahem 3 a 5 hm.% patnáctiprocentního roztoku kyseliny mandlové (Tab. 35).

Tab. 35. Inhibiční účinky gelů s kyselinou mandlovou na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Vzorek	Velikost inhibičních zón [mm]					
N	-	-	1,5	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-
P	-	-	0,5	-	-	-
Q	-	0,5	-	-	-	-
R	-	-	-	-	-	-

Pozn.: MO mikroorganismus, – žádné inhibiční zóny

Pro porovnání antimikrobních účinků gelů s alternativními antimikrobními složkami s gely s obsahem ethanolu byl vytvořen gel s obsahem 30 hm.% ethanolu, který byl vyroben dle receptury v Tab. 5. Dále byly zakoupeny v komerční síti antimikrobní gel Balea s obsahem 45 % ethanolu a antimikrobní gel na ruce SANYTOL s obsahem ethanolu 60 %. Testování doplnil samotný 96% ethanol.

Všechny tyto gely i samotný ethanol byly testovány pomocí jamkové difúzní metody vůči vybraným kulturám MO a následně kultivovány při teplotách vhodných pro inkubaci příslušných mikroorganismů. Výsledky velikosti inhibičních zón uvádí Tab. 36.

Tab. 36. Inhibiční účinky gelů s ethanolem na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Koncentrace ethanolu [%]	Velikost inhibičních zón [mm]					
30	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	0,5	1,0	1,0
60	4,5	2,0	2,5	1,0	3,0	2,5
96	10,5	4,5	7,0	2,0	5,0	9,5

Pozn.: MO mikroorganismus, – žádné inhibiční zóny

Bylo prokázáno, že u gelů s obsahem 30 hm.% ethanolu nebyla prokázána žádná inhibiční aktivita. U hygienického antibakteriálního gelu Balea se 45 % ethanolu byly prokázány inhibiční zóny pouze u bakterie *Micrococcus luteus* a kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Gel na ruce SANYTOL s obsahem 60 % ethanolu prokázal antimikrobiální účinek u všech testovaných mikroorganismů. U samotného 96% ethanolu byly prokázány největší inhibiční zóny. Lze tedy říci, že se zvyšující se koncentrací ethanolu v gelu se zvyšuje i antimikrobiální účinek vůči mikroorganismům.

6.4 Vliv smísení antimikrobiálních látek v gelové kompozici na antimikrobiální účinnost

Gely, které byly připraveny dle receptury uvedené v Tab. 10 – 11, byly nejdříve podrobeny měření pH a jejich viskozity. Výsledky měření uvádějí Tab. 37 – 38.

Tab. 37. Hodnoty pH a viskozity u směsných gelů s obsahem 3 hm.% 10% roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
I.	6,50	6406 ± 11
II.	5,68	20428 ± 65
III.	5,78	18099 ± 21
IV.	5,66	15077 ± 9
V.	6,08	25499 ± 98
VI.	6,04	12833 ± 16
VII.	5,77	8243 ± 29
VIII.	5,55	8170 ± 18

Tab. 38. Hodnoty pH a viskozity u směsných gelů s obsahem 3 hm.% 15% roztoku kyseliny mandlové

Vzorek	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
A	5,78	10067 ± 13
B	6,05	8050 ± 65
C	6,02	6910 ± 56
D	5,95	7698 ± 11
E	5,79	5616 ± 36
F	5,59	5825 ± 12
G	5,80	7653 ± 45
H	5,67	6328 ± 26

Dále byla u takto připravených gelů provedena jamková difúzní metoda. Výsledky prokázaly značný inhibiční účinek připravených gelů na MO (Tab. 39 – 40).

Tab. 39. Inhibiční účinky směsných gelů s 3 hm.% 10% roztoku kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>
Vzorek	Velikost inhibičních zón [mm]					
I.*	3,0	1,0	2,8	3,8	5,0	11,8
II.	2,0	1,5	-	1,0	4,3	5,0
III.	2,5	1,0	-	1,5	11,5	15,8
IV.	-	-	-	-	-	-
V.	2,0	0,5	-	3,0	3,8	7,0
VI.*	2,8	1,0	1,5	3,8	6,5	12,5
VII.*	5,8	1,8	2,8	2,5	15,0	13,0
VIII.*	-	-	-	-	-	2,5

Pozn.: MO mikroorganismus, – žádné inhibiční zóny, * vybrané směsné gely pro další metodu

Tab. 40. Inhibiční účinky směsných gelů s 3 hm.% 15% roztoku kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>
Vzorek	Velikost inhibičních zón [mm]					
A*	3,0	-	2,3	3,8	7,3	7,5
B*	1,5	-	2,0	3,3	5,0	7,0
C*	3,8	1,5	2,0	3,5	15,0	15,8
D	-	-	-	1,8	-	-
E	1,3	-	1,8	3,5	3,3	4,0
F	2,0	-	0,5	-	3,5	5,0
G	2,3	-	2,5	2,5	12,5	12,5
H*	1,0	1,3	1,0	2,5	1,5	3,3

Pozn.: MO mikroorganismus, – žádné inhibiční zóny, * vybrané směsné gely pro další metodu

Jak je z tabulek patrné, antimikrobiální aktivita gelů s obsahem esenciálních olejů byla podpořena přidavkem roztoku kyseliny mandlové. Toto bylo zřejmé zejména u výsledků protimikrobního testování vůči kvasinkám, a také u gelů s obsahem citrónového esenciálního oleje a roztokem kyseliny mandlové. Zde byly pozorovány malé inhibiční zóny, zejména u bakteriálního rodu *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas aeruginosa*,

naproti tomu u gelů pouze s obsahem citrónového esenciálního oleje nedocházelo k žádné inhibici.

Pro ověření získaných výsledků antimikrobní účinnosti gelů s obsahem esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové byla provedena doplňková metoda (kap. 5.3.11). Z nedostatku času byly pro tuto metodu vybrány pouze gely s největšími inhibičními zónami (Tab. 39 a 40, gely s hvězdičkou v horním indexu).

Doplňková metoda potvrdila výsledky jamkové difúzní metody (Tab. 41). Dokonce v některých případech byly výsledky antimikrobní účinnosti lepší než výsledky získané jamkovou difúzní metodou.

Tab. 41. Inhibiční účinky směsných gelů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí doplňkové metody

Druh MO	G ⁻ bakterie		G ⁺ bakterie		Kvasinky	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Vzorek	Velikost inhibičních zón [mm]					
I.	-	-	-	-	-	-
VI.	-	-	-	-	-	-
VII.	-	-	+	-	-	-
VIII.	+++	++	++	++	-	+
A	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-
C	-	-	+	+	-	-
H	++	-	+++	+	-	-
Kontrola	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn.: + mírný nárůst bakteriálního kmene, ++ střední nárůst bakteriálního kmene, +++ silný nárůst bakteriálního kmene, - žádné inhibiční zóny

Na základě výsledků obou předešlých metod, byly vybrány 4 gely s obsahem jak esenciálních olejů, tak roztoků kyseliny mandlové (Tab. 42), které vykazovaly nejlepší antimikrobiální účinky. Tyto byly následně testovány za praktických podmínek a byly také sensoricky hodnoceny.

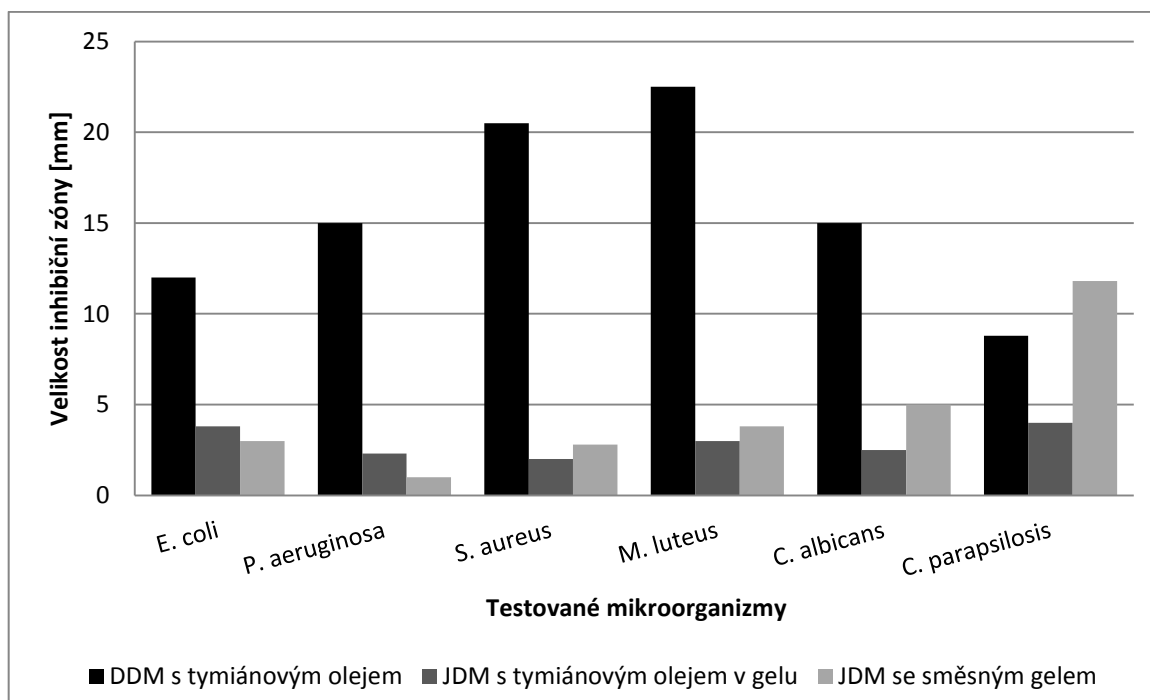
Tab. 42. Směsné gely s nejlepšími antimikrobiálními vlastnostmi

Vzorek	Esenciální olej	Obsah kyseliny mandlové [hm. %]	Koncentrace kyseliny mandlové [%]	pH připraveného gelu	Naměřená viskozita [mPa.s]
I.	Tymiánový	3	10	6,50	6406 ± 11
VI.	Hřebíčkový	3	10	6,04	12833 ± 16
VII.	Skořicový	3	10	5,77	8243 ± 29
H	Citrónový	3	15	5,67	6328 ± 26

6.5 Srovnání účinnosti antimikrobiálních látek

Pro srovnání antimikrobní účinnosti vyrobených gelů byly, jak již bylo zmíněno výše, pomocí mikrobiologických metod - diskové difúzní metody (DDM) a jamkové difúzní metody (JDM), srovnány velikosti antimikrobních účinků jednotlivých gelů, a to jak s obsahem esenciálních olejů, tak s obsahem esenciálních olejů v kombinaci s roztokem kyseliny mandlové (Tab. 42).

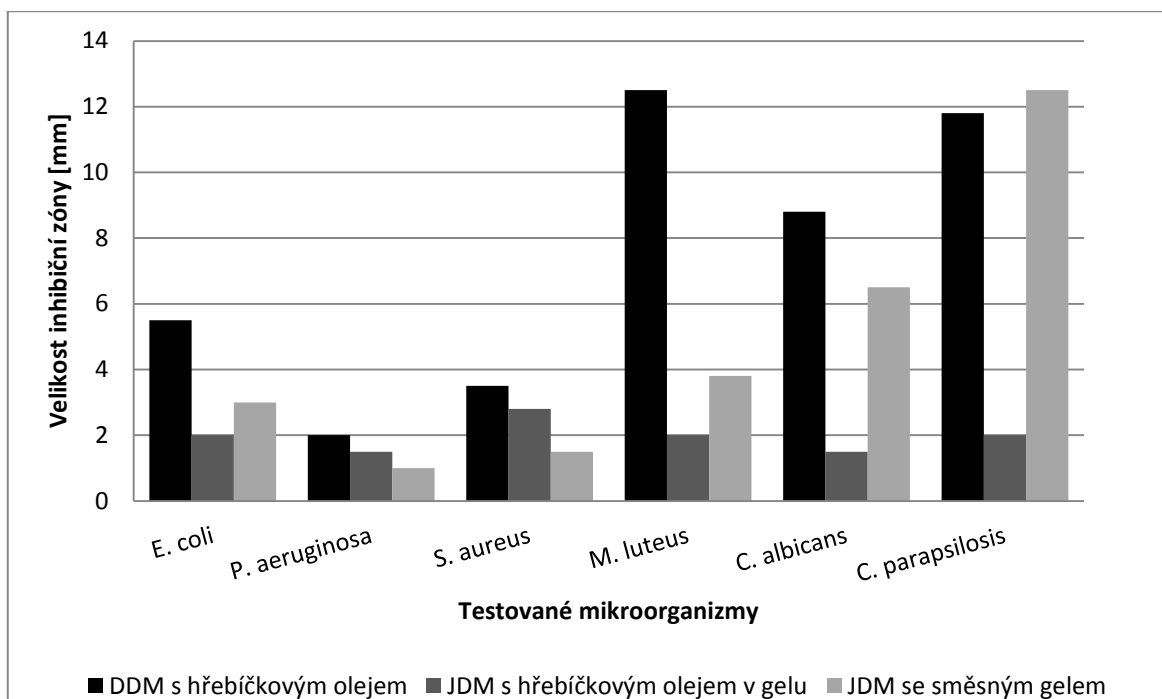
Pro testování protimikrobní účinnosti byly použity čisté kultury mikroorganismů - *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *M. luteus*, *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Testováním byly u jednotlivých gelů zjišťovány velikosti inhibičních zón. Porovnání protimikrobní účinnosti je znázorněno na Obr. 15 – 19.



Obr. 15. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem tymiánového esenciálního oleje

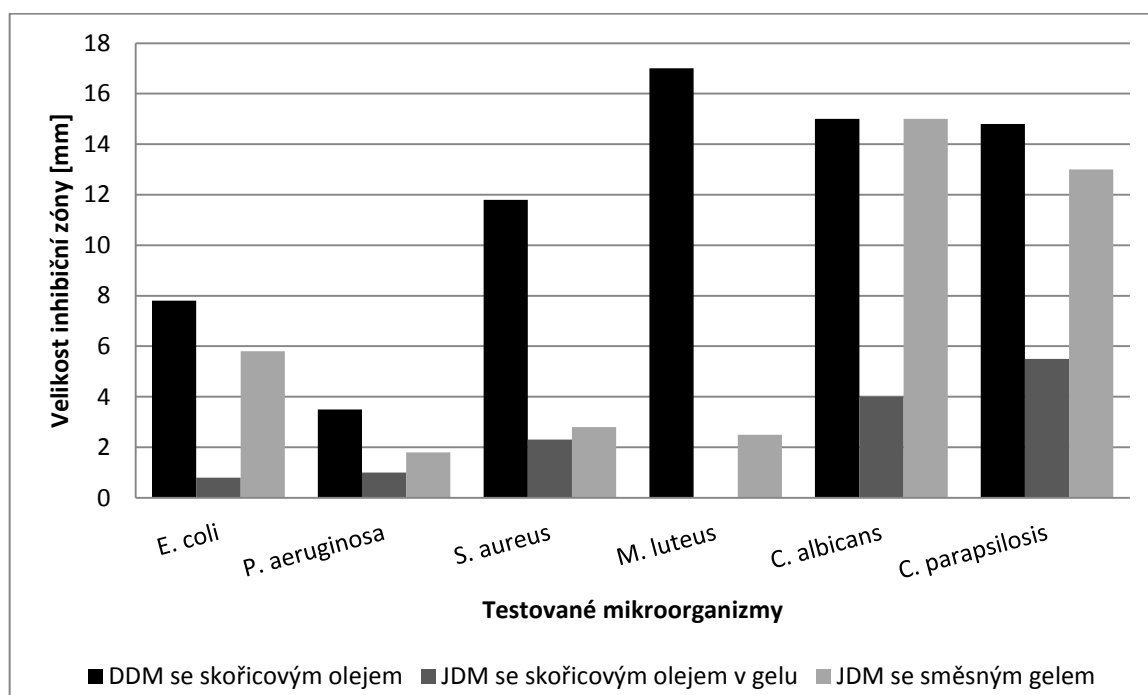
Jak je z Obr. 15 patrné, samotný tymiánový esenciální olej vykazoval vysokou inhibici vůči všem testovaným bakteriálním kmenům a kvasinkám. Jeho antimikrobiální aktivita po zabudování do gelu výrazně klesla, přesto však výskyt inhibičních zón u jednotlivých MO byl zaznamenán. Naopak kombinace tymiánového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové měla za následek zvýšení antimikrobního účinku. Pouze v případě *E. coli* a *P. aeruginosa* byla velikost inhibičních zón menší. Gely s obsahem tymiánového esenciálního oleje a roztokem kyseliny mandlové prokázaly nejvyšší protimikrobní aktivitu vůči testovaným druhům kvasinek.

Podobné chování vykazoval i hřebíčkový esenciální olej, kdy antimikrobiální aktivita čistého oleje vykazovala vyšší aktivitu než po jeho přidavku do gelové kompozice. Například u *M. luteus*, *C. albicans* a *C. parapsilosis* výrazně klesla antimikrobní účinnost gelu oproti čistému esenciálnímu oleji. Po přidavku roztoku kyseliny mandlové společně s hřebíčkovým esenciálním olejem do gelu se téměř u všech testovaných mikroorganismů jeho antimikrobiální aktivita zvýšila, dokonce u vzorku testovanému vůči *C. parapsilosis* antimikrobní aktivity převýšila antimikrobní aktivitu čistého hřebíčkového esenciálního oleje (Obr. 16).



Obr. 16. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem hřebíčkového esenciálního oleje

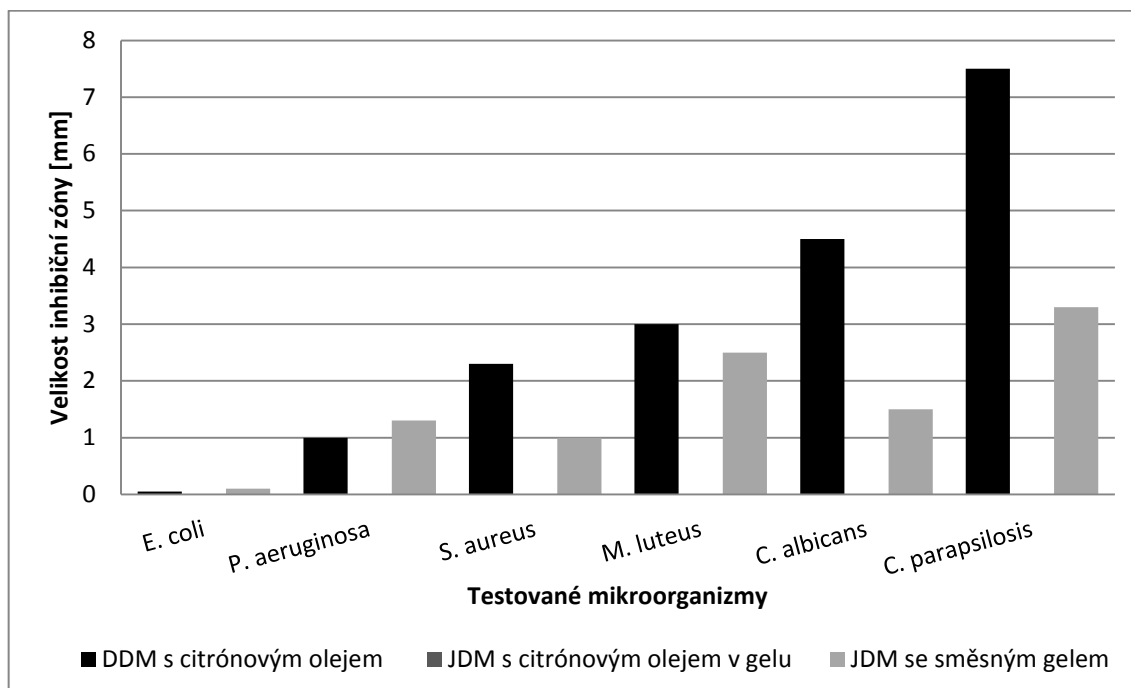
Disková difúzní metoda u testování čistého skořicového esenciálního oleje prokázala vysoké inhibiční účinky vůči všem testovaným MO. Naopak u jamkové difúzní metody, kdy byl skořicový esenciální olej přidán do gelové kompozice, byly antimikrobiální účinky těchto gelů minimální, dokonce v případě testování vůči *M. luteus* nebyly žádné. Opět po přidavku roztoku kyseliny mandlové do gelu s obsahem skořicového esenciálního oleje se jeho inhibiční aktivita výrazně zvýšila. Je zřejmé, že přidavek roztoku kyseliny mandlové do gelů s obsahem skořicového esenciálního oleje výrazně podporuje zvýšení antimikrobiální účinnosti gelů, jelikož v některých případech, jako např. u vzorků testovaných vůči *C. albicans*, měl tento směsný gel stejné inhibiční účinky jako čistý esenciální olej. U vzorků testovaných vůči *C. parapsilosis* měl tento gel téměř shodnou účinnost jako čistý esenciální olej. V ostatních případech, i když měl nižší inhibiční účinnost než čistý esenciální olej, přesto jeho antimikrobní účinky byly vyšší než u vzorků gelů s obsahem pouze esenciálního oleje (Obr. 17).



Obr. 17. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem skořicového esenciálního oleje

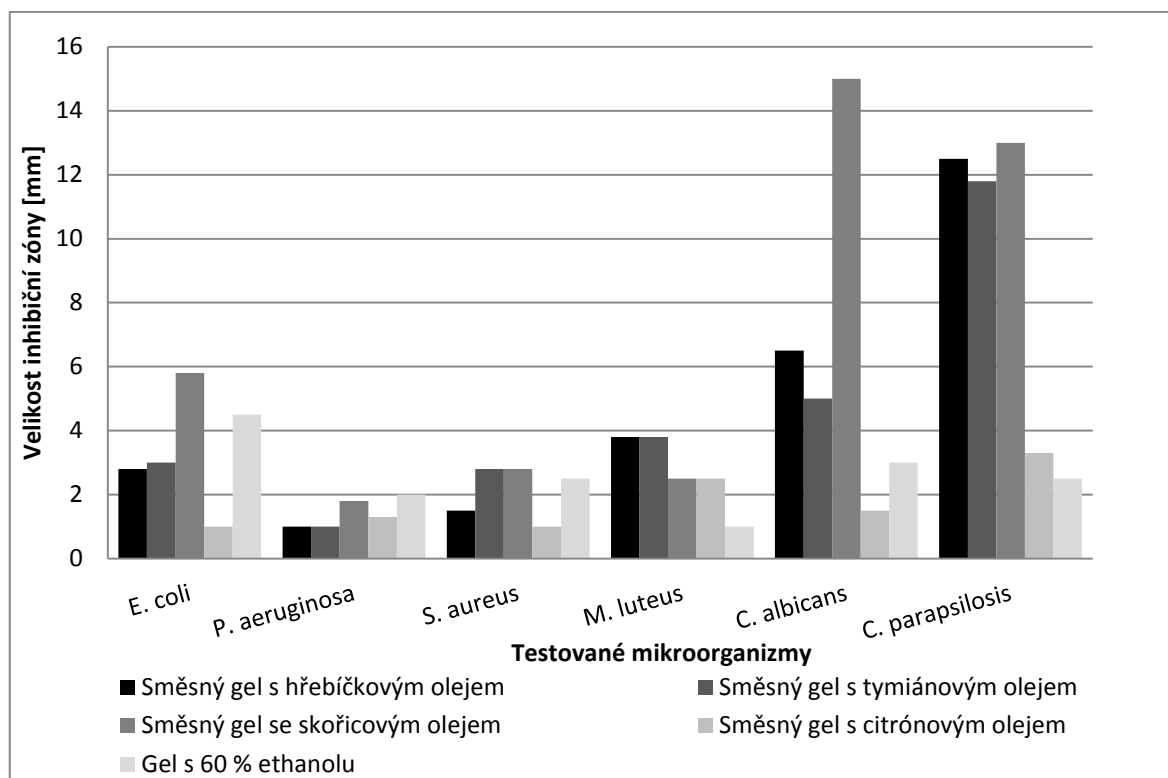
Testování citrónového esenciálního oleje pomocí diskové difúzní metody sice prokázalo antimikrobní aktivitu vůči testovaným skupinám MO, ale po jeho zapracování do gelu a testování pomocí jamkové difúzní metody inhibiční účinek prokázán již nebyl, a to ani u jednoho testovaného MO. Smísení těchto látek, tj. citrónového esenciálního oleje s roztokem kyseliny mandlové a jejich přidavků do gelové kompozice indikuje na fakt,

že mezi těmito látkami existuje synergický efekt, tzn. že se jejich antimikrobní aktivita výrazně zvýšila. V případě vzorků testovaných vůči *E. coli* a *P. aeruginosa* byl jejich antimikrobní účinek dokonce vyšší než antimikrobní aktivita samotného esenciálního oleje (Obr. 18).



Obr. 18. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem citronového esenciálního oleje

Pro ověření antimikrobiálního účinku vyrobených směsných gelů byl společně s námi vyrobenými gely testován i vzorek komerčního gelu obsahující 60 % ethanolu (SANYTOL). Testování proběhlo pomocí jamkové difúzní metody. Výsledky testování uvádí Obr. 19.



Obr. 19. Srovnání antimikrobiálních účinků směsných gelů a gelu s obsahem ethanolu pomocí jamkové difúzní metody

Jak je z obrázku patrné, ve všech případech testovaných vzorků byla prokázána jejich antimikrobiální účinnost. Nejlepších výsledků dosahoval gel s obsahem skořicového esenciálního oleje a 3 hm.% 10% roztoku kyseliny mandlové. Nejnižší hodnoty inhibice naopak vykazoval gel s obsahem citrónového esenciálního oleje a 3 hm.% 15% roztoku kyseliny mandlové. Komerční přípravek SANYTOL s 60 % ethanolu vykazoval v průměru nižší inhibiční účinky než námi vyrobené gely.

6.6 Antimikrobiální účinnost gelů za praktických podmínek

V neposlední řadě proběhlo testování námi vyrobených gelů za praktických podmínek, tzn. že tato metoda měla simulovat praktické použití gelů a stanovit pak jejich antimikrobiální účinnost. Testování bylo provedeno dle ČSN EN 1500 (kap. 5.3.12). Pro samotné testování byly vybrány 4 gely, které uvádí Tab. 42. Pro kontrolu a také pro následné srovnání byly pro testování použity i komerční antimikrobiální gely s obsahem ethanolu (45 a 60 %). Výsledky testování pak uvádí Tab. 43.

Tab. 43. Protimikrobní účinnost gelů testovaných za praktických podmínek

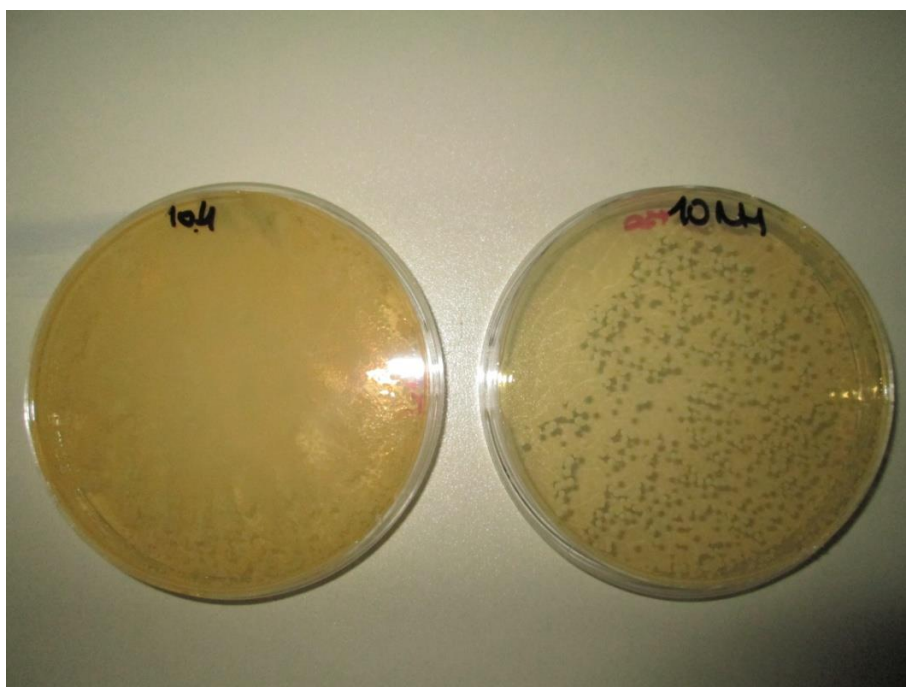
	Počet probandů									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Směsný gel s tymiánovým olejem	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+
Směsný gel s hřebíčkovým olejem	+	+	+	++	+	+	+	+++	+	+
Směsný gel se skořicovým olejem	++	+	+	+	+	+	+	++	+	++
Směsný gel s citrónovým olejem	+	+++	+++	+	++	+	+++	+	+	++
45 % EtOH	++	++	+	+	++	+	++	+++	+	++
60 % EtOH	++	++	++	++	+	+	++	+	+	++
Počáteční hodnoty u všech gelů	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn.: + mírný nárůst bakteriálního kmene, ++ střední nárůst bakteriálního kmene, +++ silný nárůst bakteriálního kmene, - žádné inhibiční zóny

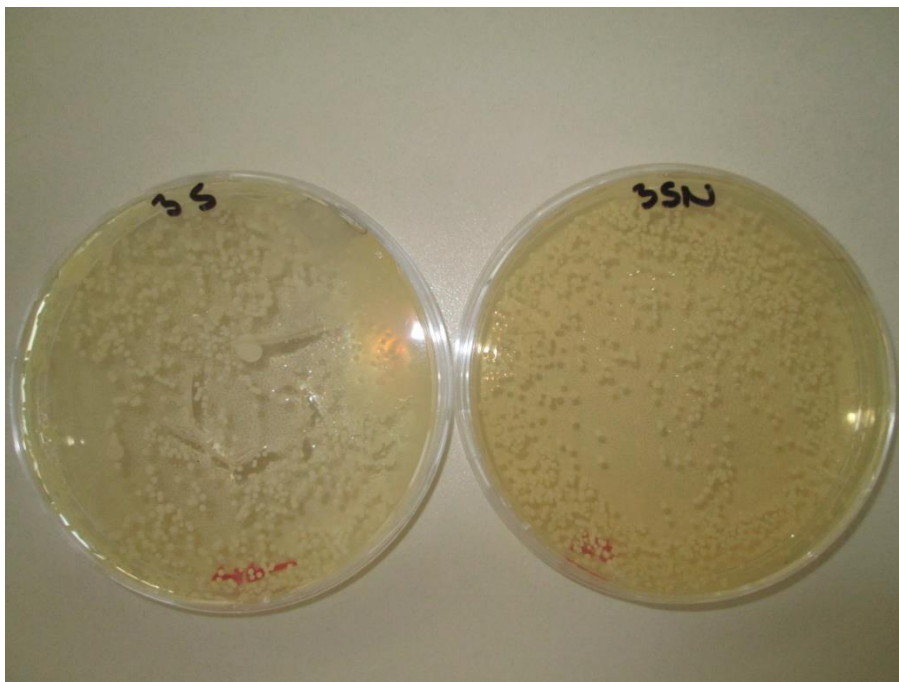
Jak je z tabulky patrné, nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval gel s obsahem 0,5 hm. % hřebíčkového esenciálního oleje a 3 hm. % 10% roztoku kyseliny mandlové a pH výsledného gelu 6,04. Dále pak gel s obsahem 0,5 hm. % hřebíčkového esenciálního oleje a 3 hm. % 10% roztoku kyseliny mandlové (pH gelu 6,33). Gel s obsahem 0,5 hm. % skořicového esenciálního oleje a 3 hm. % 10% roztoku kyseliny mandlové (pH gelu 5,77). Naopak nejhorší protimikrobní účinnost vykázal gel s obsahem 0,5 % citrónového esenciálního oleje a přídavkem 3 hm. % 15% roztoku kyseliny mandlové (pH výsledného gelu 5,67). Níže je pak přiložená i fotodokumentace, která dokumentuje výsledky před a po použití testovaných gelů za praktických podmínek (Obr. 20 – 25).



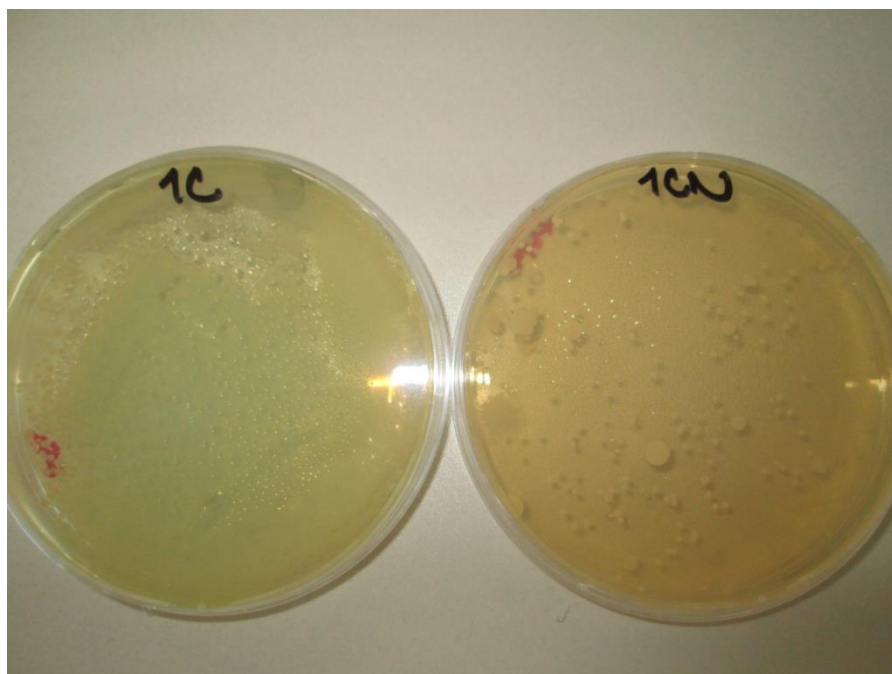
Obr. 20. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem tymiánového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo)



Obr. 21. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem hřebíčkového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo)



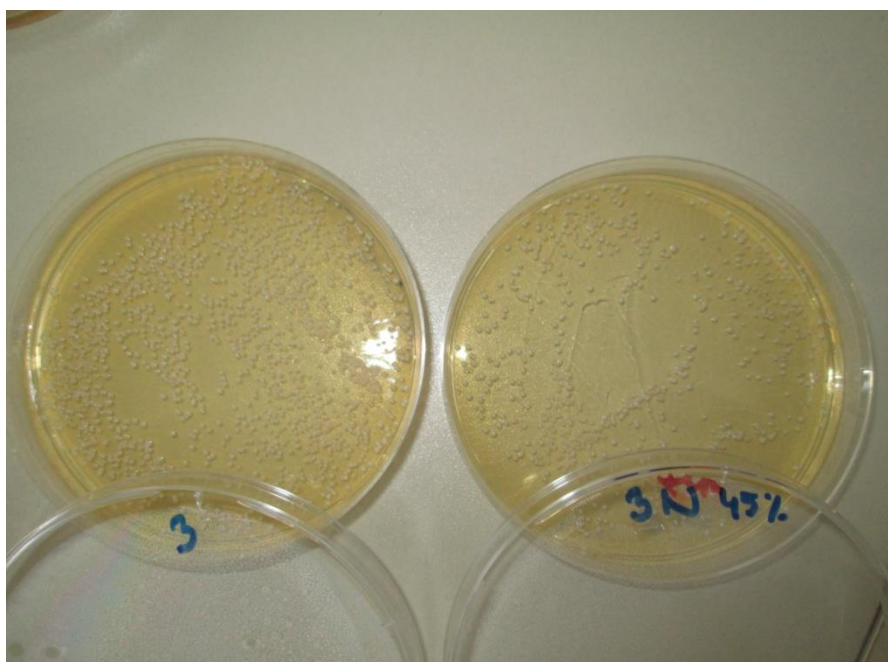
Obr. 22. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem skořicového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo)



Obr. 23. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem citronového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo)



Obr. 24. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem 60 % ethanolu testovaného za praktických podmínek (vpravo)



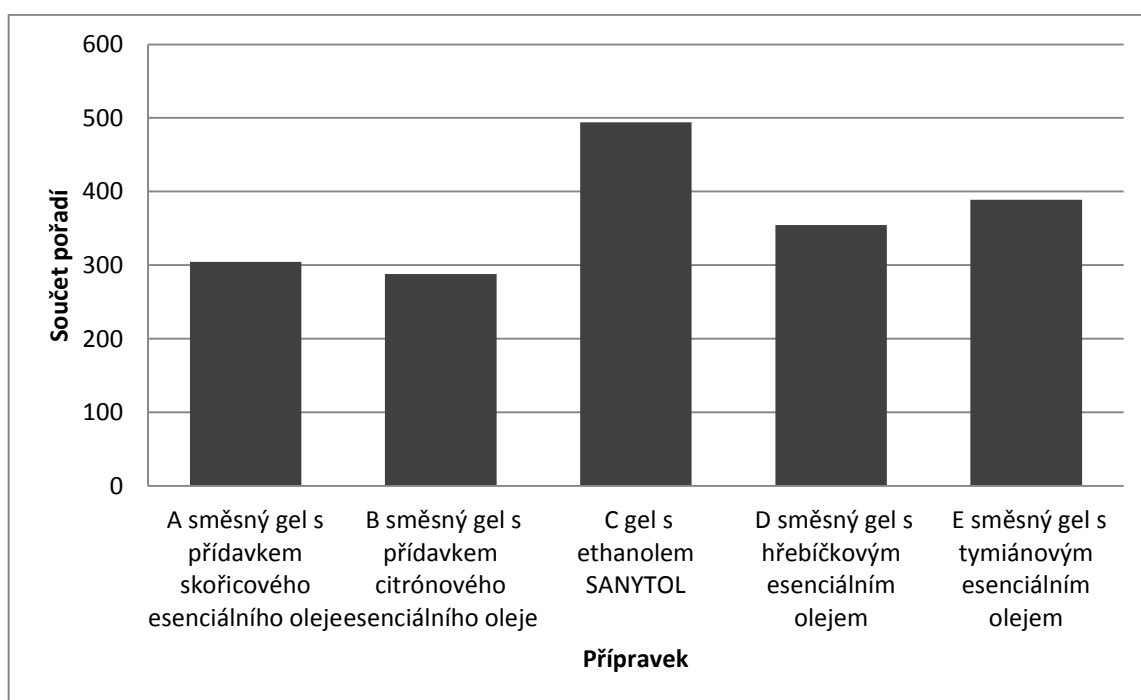
Obr. 25. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem 45 % ethanolu testovaného za praktických podmínek (vpravo)

Jak je z výsledků patrné, námi připravené gely s obsahem jak esenciálních olejů, tak roztokem kyseliny mandlové, vykazovaly za praktických podmínek v porovnání s jamkovou difúzní metodou odlišné výsledky. Toto je ale zcela přirozené, neboť na pokožce rukou se nevyskytují pouze mikroorganismy, které byly zahrnuty jako testovací, nýbrž jejich široká škála. Opět se zde ale prokázalo, že směsné gely vykazovaly daleko vyšší antimikrobiální aktivitu než komerční vzorky obsahující jako antimikrobiální látku ethanol.

6.7 Vyhodnocení sensorických znaků antimikrobiálních gelů

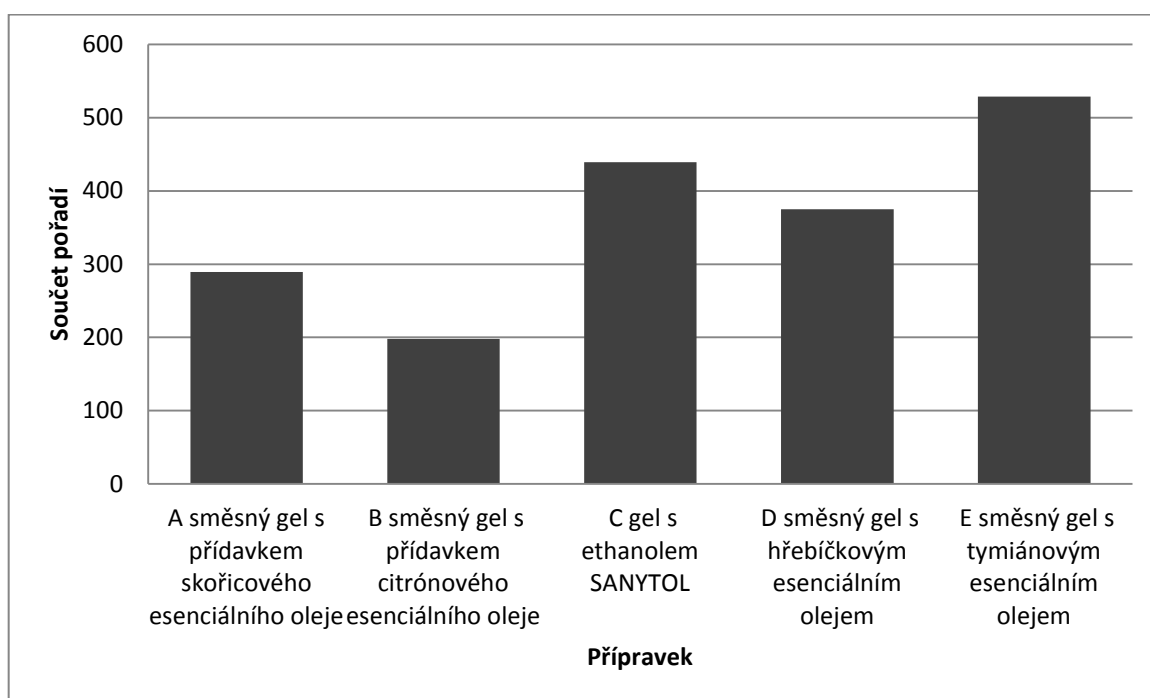
Vyhodnocení základních sensorických znaků proběhlo, jak již bylo zmíněno výše, vyplněním dotazníků a následně pak pomocí programu StatK25.

Prvním kritériem bylo hodnocení vzhledu a barvy gelu. Pomocí Kruskal-Wallisova testu, na základě součtu pořadí, bylo vyhodnoceno, který vzorek antimikrobiálního gelu je ve vzhledu a barvě pro hodnotitele nejlepší a který vzorek gelu je naopak dle hodnotitelů nejhorší (P III, Tab. 44). Z výsledků vyplývá, že za nejlepší byl označen vzorek B (směsný gel s přídavkem citrónového esenciálního oleje), dále vzorek A (směsný gel s přídavkem skořicového esenciálního oleje), poté vzorek D (směsný gel s přídavkem hřebíčkového esenciálního oleje) a vzorek E (směsný gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje). Nejhorše hodnoceným byl vzorek C, tj. komerční gel s etanolem SANYTOL (Obr. 26).



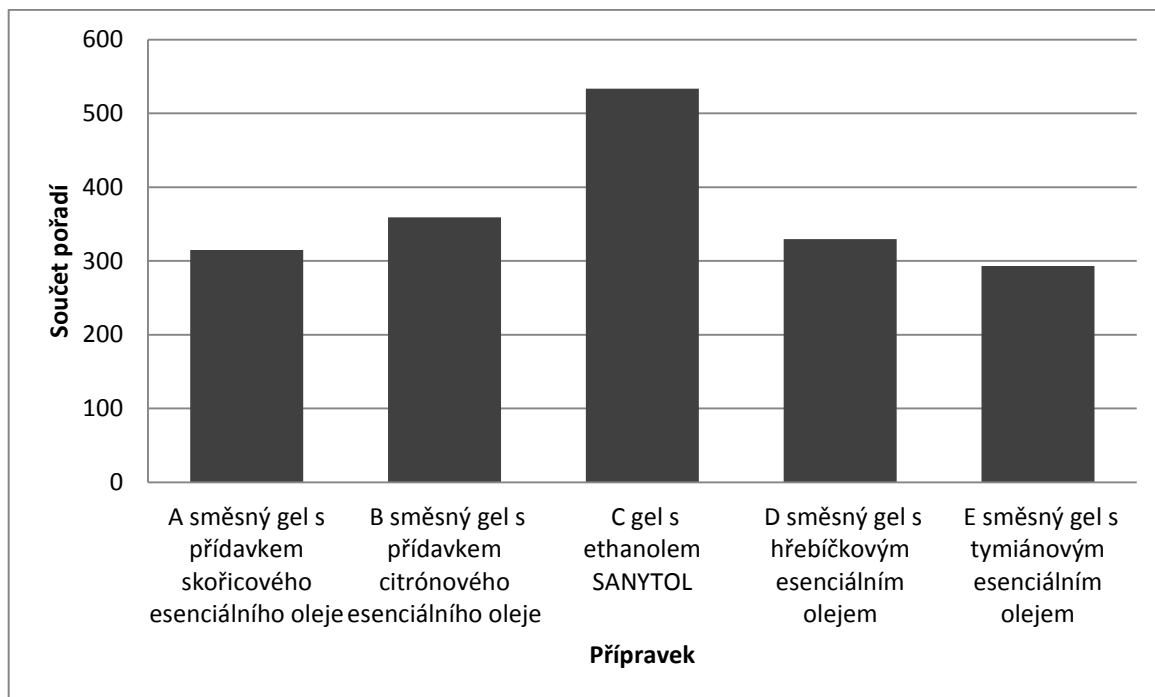
Obr. 26. Výsledky stupnicové zkoušky - vzhled a barva

Dalším parametrem hodnocení byla vůně. Opět byl i zde použit Kruskal-Wallisův test, podle kterého, na základě součtu pořadí (P III, Tab. 45), byl nejlépe hodnoceným vzorkem vzorek B (směsný gel s přidavkem citrónového esenciálního oleje), dále vzorek A (směsný gel s přidavkem skořicového esenciálního oleje), vzorek D (směsný gel s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje) a vzorek C (komerčně dostupný antimikrobiální gel SANYTOL). Za nejhorší, s ohledem na vůni, byl považován směsný gel s přidavkem tymiánového esenciálního oleje (vzorek E). Grafické zpracování výsledků je uvedeno na Obr. 27.



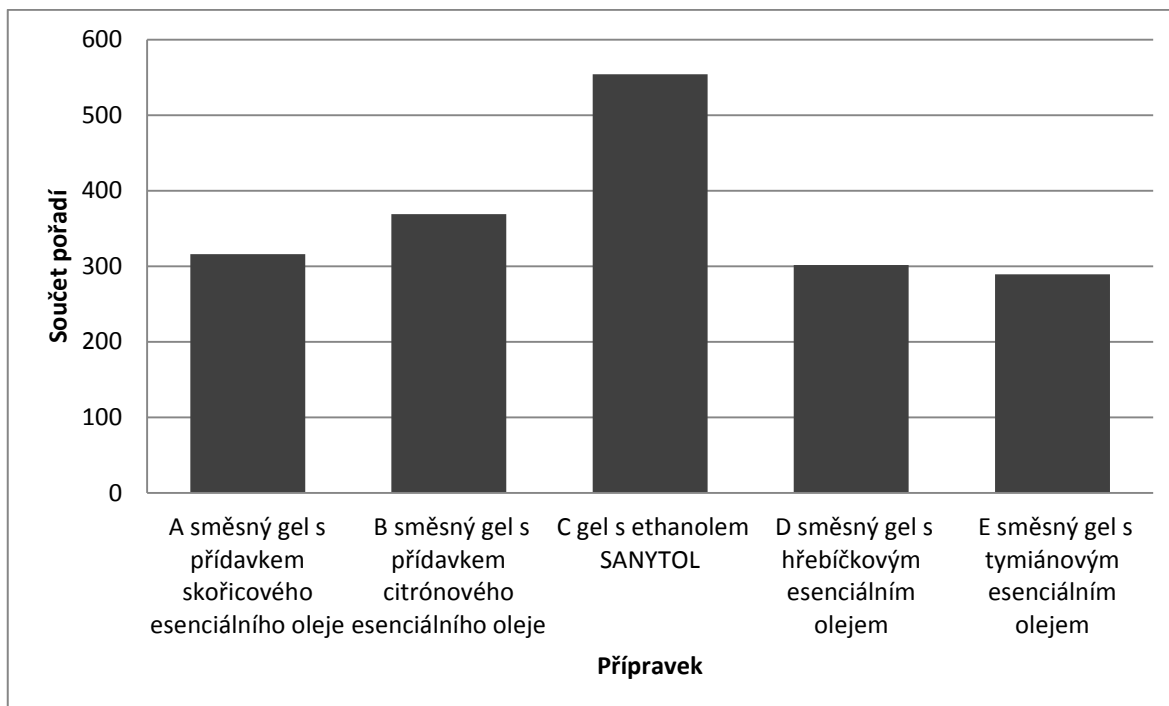
Obr. 27. Výsledky stupnicové zkoušky - vůně

Konzistence byla hodnocena opět dle Kruskal-Wallisova testu, kdy bylo na základě součtu pořadí určeno, který ze vzorků je v konzistenci nejlepší a který nejhorší (P III, Tab. 46). Jako nejlepší vzorek byl hodnocen vzorek E (směsný gel s přidavkem tymiánového esenciálního oleje), vzorek A (směsný gel s přidavkem skořicového esenciálního oleje), dále vzorek D (směsný gel s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje), vzorek B (směsný gel s přidavkem citrónového esenciálního oleje) a jako poslední vzorek C, gel s ethanolem. Grafické zpracování výsledků je opět znázorněno na Obr. 28.



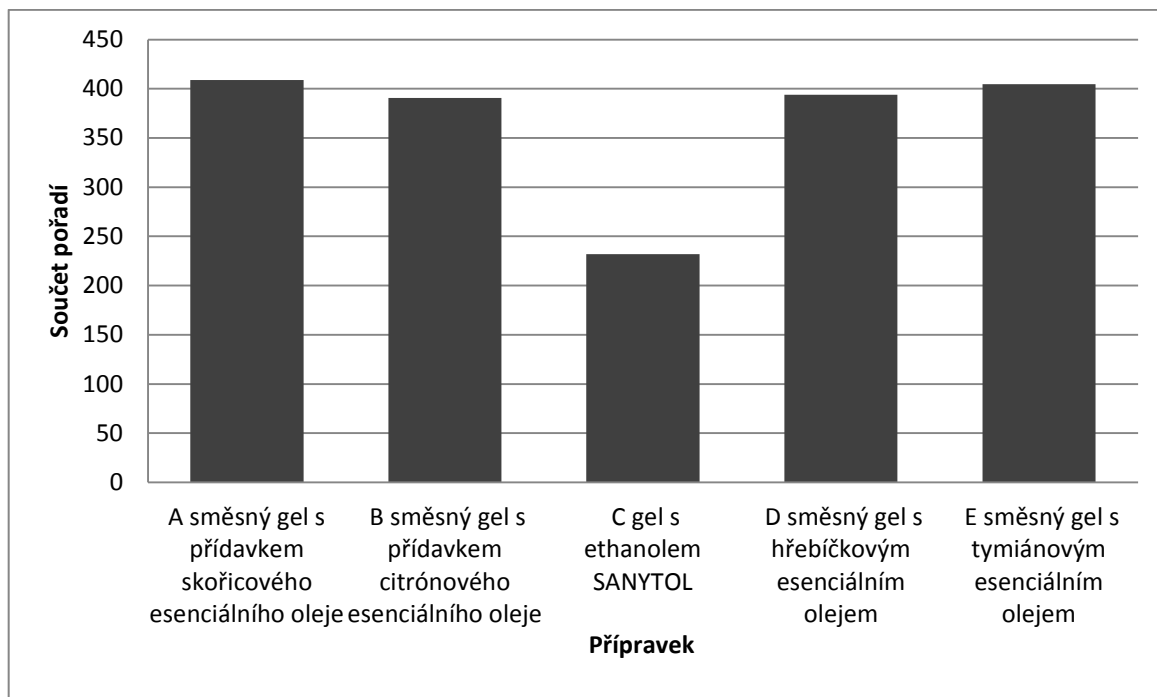
Obr. 28. Výsledky stupnicové zkoušky - konzistence

Stejně tak jako znaky předešlé, byla i roztíratelnost posuzována pomocí Kruskal-Wallisova testu, dle kterého bylo určeno, který ze vzorků je roztíratelný nejlépe a který naopak nejhůře (P III, Tab. 47). Hodnotitelsky byl tedy za nejlepší, tj. nejlépe roztíratelný, zvolen vzorek E (směsný gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje), dále pak vzorek D (směsný gel s přídavkem hřebíčkového esenciálního oleje), vzorek A (směsný gel s přídavkem skořicového esenciálního oleje) a vzorek B (směsný gel s přídavkem citrónového esenciálního oleje). Jako nejhůře roztíratelný byl pak hodnocen vzorek C – komerční gel SANYTOL. Grafické vyhodnocení výsledků testování roztíratelnosti uvádí pak Obr. 29.



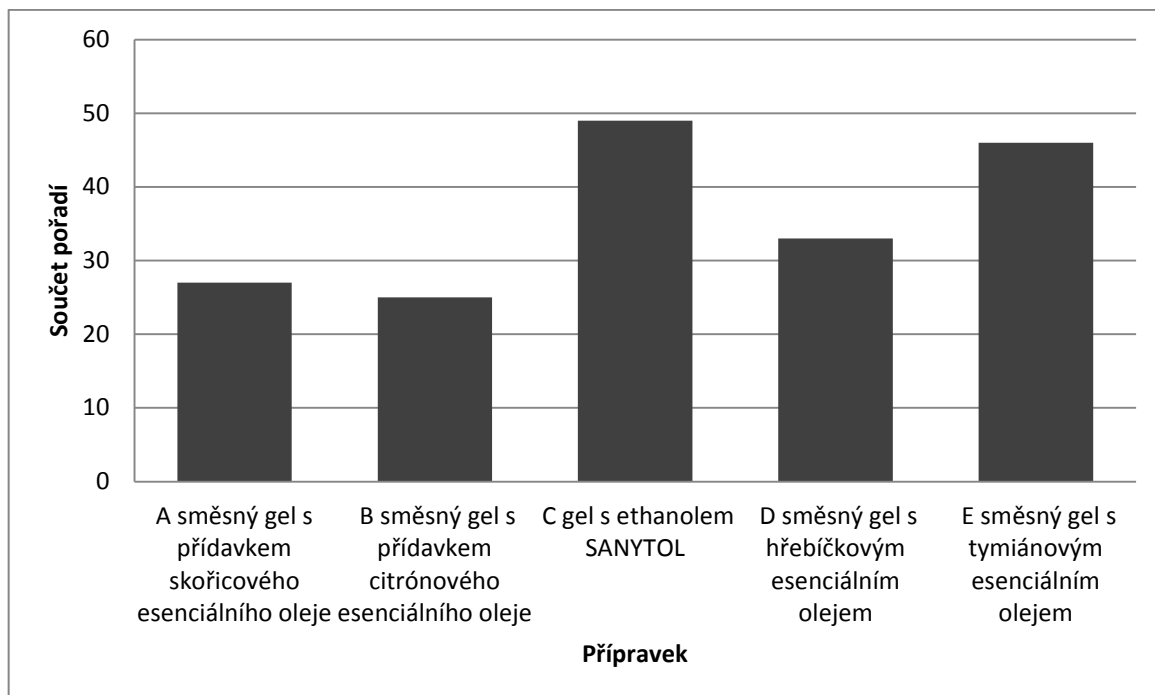
Obr. 29. Výsledky stupnicové zkoušky - roztíratelnost

Posledním sledovaným znakem testovaných vzorků gelů byla vstřebatelnost. I zde na zhodnocení výsledků byl použit Kruskal-Wallisův test, kdy na základě součtu pořadí bylo možné vzorky dle vstřebatelnosti seřadit tak, že nejlepší vstřebatelnost vykazoval vzorek C (komerční gel SANYTOL), dále vzorek B (směsný gel s přídavkem citrónového esenciálního oleje), následoval vzorek D (směsný gel s přídavkem hřebíčkového esenciálního oleje), vzorek E (směsný gel s přídavkem tymiánového esenciálního oleje). Za nejhůře vstřebatelný byl označen vzorek A (směsný gel s přídavkem skořicového esenciálního oleje). Výsledky byly opět přehledně zpracovány v příloze P III, Tab. 48 a také jej uvádí pak Obr. 30.



Obr. 30. Výsledky stupnicové zkoušky - vstřebatelnost

Pořadová zkouška byla vyhodnocena pomocí Friedmanova testu, kdy bylo s 95% spolehlivostí možné určit, že předložené vzorky se statisticky nelišily v preferencích, tzn. že si byly navzájem podobné. Tudíž se nepodařilo prokázat, že by vzorek komerčního gelu SANYTOL byl preferovaný před ostatními gely (P III, Tab. 49). Pouze na základě součtu pořadí jednotlivých vzorků u pořadové zkoušky lze říci, že nejlépe hodnocen byl vzorek B (směsný gel s přídavkem esenciálního citrónového oleje), dále vzorek A (směsný gel s přídavkem esenciálního skořicového oleje), na třetí pozici se umístil vzorek D (směsný gel s přídavkem esenciálního hřebíčkového oleje a na čtvrté vzorek E (směsný gel s přídavkem esenciálního tymiánového oleje). Nejhorše hodnocený byl komerční gel SANYTOL s 60 % ethanolu (vzorek C), a to pravděpodobně z důvodů absence vonné složky a také z důvodu velmi nízké viskozity. Výsledky pořadové zkoušky uvádí Obr. 31.



Obr. 31. Výsledky pořadové zkoušky

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na informace o základních gelotvorných látkách, jejich vlastnostech, způsobech přípravy gelů a možnostech jejich využití v kosmetickém průmyslu. Je zde věnována pozornost i nejužívanějším antimikrobiálním látkám, tj. alkoholům, které se v kosmetických dezinfekčních gelech hojně využívají a dále také látkám, které mohou být jejich adekvátní náhradou.

Praktická část je pak zaměřená na samotnou přípravu různých typů gelů s vybranými antimikrobiálními látkami (kyselina mandlová, hřebíčkový, tymiánový, skořicový a citrónový esenciální olej). V prvním kroku byla u těchto samotných látek studována jejich antimikrobní účinnost, i jejich účinné koncentrace. Následně byly antimikrobní vlastnosti studovány i v připravených gelech. Dále byly sledovány i reologické vlastnosti, resp. viskozita vytvořených gelů, jejich pH a stabilita. Byly vybrány nejučinnější koncentrace antimikrobních látek a tyto byly společně zapracovány do gelů, u kterých byly upravovány hodnoty jejich pH (tak, aby odpovídalo pH pokožky člověka), viskozita a hlavně antimikrobiální účinky, které byly stanovovány řadou mikrobiologických metod. Pro srovnání velikosti antimikrobního účinku byly, společně s našimi vyrobenými gely, testovány i gely zakoupené v komerční síti. Pro popis organoleptických vlastností vyrobených gelových formulací byla provedena senzorická analýza.

Z výsledků vyplývá, že směsné gely vykazují vyšší antimikrobiální účinek vůči komerčně dostupným dezinfekčním gelům na bázi ethanolu. Což se potvrdilo jednak u jamkové difúzní metody i u metody simulující praktické podmínky použití dezinfekčních gelů. Dále bylo pomocí výše zmiňovaných metod prokázáno, že antimikrobiální účinky esenciálních olejů v gelech podpořil přídavek roztoků kyseliny mandlové, které podpořila výslednou dezinfekční účinnost gelů.

Nejvyšší antimikrobiální účinek byl prokázán u gelu s přídavkem skořicového esenciálního oleje a desetiprocentním roztokem kyseliny mandlové. Podobných antimikrobiálních účinků dosahovaly také gely s přídavkem tymiánového a hřebíčkového esenciálního oleje a desetiprocentního roztoku kyseliny mandlové. Naopak nejmenší antimikrobní účinek byl prokázán u gelu s citrónovým esenciálním olejem a patnáctiprocentním roztokem kyseliny mandlové. Avšak právě u tohoto gelu byl nejvíce signifikantní synergický účinek kyseliny mandlové a esenciálního oleje, jelikož gel s obsahem samotného citrónového esenciálního oleje neprokazoval žádný inhibiční efekt, oproti tomu gel s přídavkem esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové ano.

Spolu s námi vyrobenými gely byly testovány i gely komerční. Výsledky z provedených mikrobiologických analýz ukazují, že námi vyrobené gely vykazují lepší antimikrobní účinnost než gely komerční, tj. gely, jejichž hlavní účinnou složkou byl ethanol.

Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že námi vyrobené gely byly lépe hodnoceny než komerční přípravky. Tento se vyskytoval na zadních přičkách i při hodnocení celkového vzhledu a barvy, konzistence a dokonce i roztíratelnosti. Jeho vstřebatelnost však byla hodnocena nejlépe.

I z hlediska preferencí se námi vyrobené směsné gely umístily na předních přičkách. Konkrétně nejlépe hodnoceným gelem byl gel s přidavkem citrónového esenciálního oleje a roztokem kyseliny mandlové, dále gel se skořicovým esenciálním olejem a přidavkem kyseliny mandlové, gel s hřebíčkovým esenciálním olejem a kyselinou mandlovou, gel s tymiánovým esenciálním olejem a kyselinou mandlovou a jako poslední byl v rámci preferencí hodnocen komerční gel SANYTOL s ethanolem.

Jak již bylo zmíněno výše, tak z hlediska antimikrobiální účinnosti vykazoval nejlepší účinnost gel se skořicovým esenciálním olejem a kyselinou mandlovou. Při sensorickém hodnocení však bylo prokázáno, konkrétně u zkoušky vstřebatelnosti, kdy byl gel aplikován na volární stranu předloktí, že dráždí pokožku, tzn. že způsobuje kontaktní iritační dermatitidu. Což bylo potvrzeno u 4 probandů z 12-ti. Naopak nejlépe hodnoceným gelem byl gel s obsahem citrónového esenciálního oleje a kyselinou mandlovou. Bohužel z hlediska antimikrobní účinnosti téměř propadl.

Gel s přidavkem hřebíčkového esenciálního oleje a přidavkem roztoku kyseliny mandlové lze hodnotit, jak z hlediska sensorické analýzy, tak hlavně velikosti protimikrobního účinku, jako nejlepší. Jedná se totiž o kompromis obou kvalitativních ukazatelů, přestože lepších výsledků dosahoval gel s obsahem skořicového esenciálního oleje a kyseliny mandlové, ten ale vykazoval navíc iritační účinky. Závěrem lze tedy říci, že gelové formulace s obsahem esenciálních olejů a kyseliny mandlové je možno využít jako spolehlivé prostředky denní hygieny pokožky rukou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. EUCERIN [online]. *Epidermis* – BEIERSDORF AG, 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.eucerin.cz/skin/epidermis.asp>
2. HARTMANN [online]. *HARTMANN* – RICO a. s, 2010 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.lecbarany.cz/clanky/vyznam-ph-pro-funkci-kozni-bariery>
3. JULÁK, JAROSLAV. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. Vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. ISBN 80-246-1270-4.
4. ORTH, Donald S. *Insights into cosmetic microbiology*. Vyd. 1. Carol Stream, IL: Allured books, c2010, 102 s. ISBN 978-193-2633-627.
5. WHO. *Guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge : clean care is safer care*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Patient Safety, c2009. ISBN 92-415-9790-9.
6. MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-716-9442-8.
7. *Normal Microbial Flora of the Human Body*. 196-201. Dostupné z: <http://202.120.143.134/Download/1531f207-c8b9-48d9-8ce9-8eddf9800e2.pdf>
8. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Grada, 2010, 223 s. ISBN 978-802-4731-704.
9. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy II*. Praha: Maxdorf, c2001, 303 s. ISBN 80-85912-25-2.
10. ORTH, Donald S. *Cosmetic and drug microbiology*. New York: Informa Healthcare, 2006, 375 s. ISBN 0-8493-7266-6.
11. KLABAN, Vladimír. *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*. 2. rozš. a přeprac. vyd. Gaudeamus, 2001, 416 s. ISBN 80-704-1687-4.
12. HOFFMAN, Peter. Skin Disinfection and Acupuncture. *ACUPUNCTURE IN MEDICINE* [online]. 2011, roč. 2011, č. 19, s. 112-116 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://acupmed.bmjournals.com/content/19/2/112.full.pdf+html>
13. JOHNSON, S.A. a P.A. GODDARD. Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xyleneol and triclosan. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2002, roč. 2002, č. 93, 336–344 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01691.x/pdf>

14. BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901-5214-7.
15. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 2013, 400 s. ISBN 978-80-7345-286-5.
16. LARSON, Elaine. Skin Hygiene and Infection Prevention: More of the Same or Different Approaches? *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1999, roč. 1999, č. 29, s. 1287-1294 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10524977>
17. ČSN EN 1500. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Hygienická dezinfekce rukou - Zkušební metoda a požadavky*. 02/1999. Evropská komise pro normalizaci.
18. AYLIFFE, G. A. J. A test for 'hygienic' hand disinfection. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1978, roč. 1978, č. 31, s. 923-928 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1145452/pdf/jclinpath00446-0011.pdf>
19. PITTET, Didier. Improving Adherence to Hand Hygiene Practice: A Multidisciplinary Approach. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2001, roč. 2001, č. 7 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631736/pdf/11294714.pdf>
20. KOHOUTOVÁ, Jarmila. Tredy v hygieně rukou. *Medicína pro praxi* [online]. 2012, roč. 2012, č. 9, s. 6-7 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: http://www.sneh.cz/_soubory/_clanky/63.pdf
21. O'LENICK, Anthony J. *Microorganisms and cosmetics*. Vyd. 1. Carol Stream, IL: Allured Business Media, c2009, 336 p. ISBN 19-326-3356-1.
22. J. MACDONALD, DUNCAN. *One plunge or two?—hand disinfection with alcohol gel*. *International Journal for Quality in Health Care* [online]. 2006, roč. 18, č. 2, 120 - 122 [cit. 2014-05-15]. DOI: 10.1093/intqhc. Dostupné z: http://intqhc.oxfordjournals.org/content/18/2/120.full.pdf?origin=publication_detail
23. ŠTÁVA, Z. A. L. JIRÁSEK. *Dermatovenerologie*. Praha: AVICENUM, 1977. ISBN 0804577.

24. BODE. *Hygiena rukou - výzva k akci*. Praha, 2007. Dostupné z: <http://www.bode.cz/dokumenty/servis/hygiena-rukou-vyzva-k-akci.pdf>
25. STULIK, Dusan a Valerie DORGE. *Solvent gels for the cleaning of works of art: the residue question*. Marina del Rey, CA, USA: Getty Conservation Institute, 2004. ISBN 08-923-6759-8.
26. DE NAVARRE, Maison G a Mitchell L SCHLOSSMAN. *The chemistry and manufacture of cosmetics*. 4th ed. Carol Stream, IL: AlluredBooks, V. <1-2>. ISBN 97819326334812.
27. ROMANOWSKI, Perry a Randy SCHUELLER. *Beginning cosmetic chemistry: practical knowledge for the cosmetic industry*. 3rd. ed. Carol Stream, IL: Allured books, VI, 531 p. ISBN 19-326-3353-7.
28. VYORALOVÁ, Simona. *Mytí a dezinfekce rukou na novorozenecké JIP* [online]. Zlín, 2006 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/myti-a-dezinfekce-rukou-na-novorozenecke-jip-278268>
29. FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Maxdorf, 2005, 341 s. ISBN 80-734-5046-1.
30. OSADA, Yoshihito a Kanji KAJIWARA. *Gels handbook*. San Diego: Academic Press, c2001. ISBN 01239496454.
31. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
32. NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz* [online]. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008 [cit. 2014-02-07]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.view.pdf>
33. BUCHMANN, Stephan. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker, 2001, 145 - 169. ISBN 0-8247-0292-1.
34. KLOUDA, Pavel. *Fyzikální chemie*. Ostrava, 1997, 179 s. ISBN 80-902-1552-1.
35. BĚLOBRÁDEK, Michal. *Kožní nemoci: repetitorium pro praxi*. Praha: Maxdorf, c2011, 215 s. ISBN 978-807-3452-216.
36. HOFFMAN, Allan S. *Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, vol. 64, s. 18-23 [cit. 2014-02-07]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.010.

37. ESHELMAN SCHOOL OF PHARMACY. *Common Gelling Agents* [online]. 2006 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <http://pharmlabs.unc.edu/labs/gels/agents.htm>
38. O Carbomeru. *Cosmetics Info: The Science & Safety Behind Your Favorite Products* [online]. 2014 [cit. 2014-02-07]. Dostupné z: <http://cosmeticsinfo.org/ingredient/carbomer-0>.
39. H. HOSMANI, Avinash. In the recent decades, there has been considerable interest in using Carbopol as an excipient in a diverse range of pharmaceutical applications. In: *Pharmaceutical Information: Articles and Blogs* [online]. College of Pharmacy, Karad. India., 2006, 2014 [cit. 2014-02-07]. Dostupné z: <http://www.pharmainfo.net/reviews/carbopol-and-its-pharmaceutical-significance-review>.
40. SANZ TABERNER, T, A MARTÍN-VILLODRE, J.M PLA - DELFINA a José Vicente HERRÁEZ. Consistency of Carbopol 971-P NF gels and influence of soluble and cross-linked PVP. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, vol. 233, 1-2, s. 43-50 [cit. 2014-02-07]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00937-1.
41. UNIVERZITA KARLOVA. *Výzkum hydrogelů* [online]. 2014 [cit. 2014-02-07]. Dostupné z: <http://kmf.troja.mff.cuni.cz/okno/vyzkum.php?idv=3>.
42. AL-MALAH, Kamal. *Rheological Properties of Carbomer Dispersions*. [online]. [cit. 2014-02-07]. Dostupné z: http://projekt.sik.se/nrs/Open_transactions/2006/NRS_AT_2006_vol14/Rheology%20of%20Suspensions/Al-Malah.pdf.
43. Carbomer characters. In: *Langfang Jutong Chemical Co., Ltd.* [online]. 2009, 2014 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.lfjthg.com/english/product.asp?action=show&productid=12&classid=2>
44. Carboxymethylcellulose. In: Reach information [online]. 2009 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.healthcare.reachinformation.com/Carboxymethyl%20cellulose.aspx>
45. The Carboxymethyl Cellulose (CMC) is produced by chemical modification of cellulose, the most abundant polymer in nature and a major component of wood and cotton. LAMBERTI. [online]. 2002, 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.lamberti.com/technologies/carboxymethylcellulose.cfm>

46. Carboxymethylcellulose. MP BIOMEDICALS. [online]. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02155493&country=56>
47. CHAPLIN, Martin. Carboxymethylcellulose (CMC). Water structure and science [online]. 2012, [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html>
48. BISWAL, D.R. a R.P. SINGH. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. Carbohydrate polymers [online]. 2004, roč. 2004, č. 57, s. 379-387 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861704001870>
49. LOTT, Joseph R., John W. MCALLISTER, Sara A. ARVIDSON, Frank S. BATES a Timothy P. LODGE. Fibrillar Structure of Methylcellulose Hydrogels. Biomacromolecules [online]. 2013-08-12, vol. 14, issue 8, s. 2484-2488 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1021/bm400694r. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400694r>
50. Methylcellulose. MP BIOMEDICALS. [online]. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02155493&country=56>
51. KIRK, Raymond E. *Encyclopedia of chemical technology*. [Volume] 4: Calcium compounds to chloramphenicol. New York: John Wiley & Sons, 1964.
52. Pavlínek, *Reologie*. (přednáška) Zlín: UTB
53. KIRK, Raymond E. *Encyclopedia of chemical technology*. [Volume] 2: Aluminium compounds to azo dyes. New York: John Wiley & Sons, 1963.
54. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy*. Praha: Maxdorf-Jessenius, 1995, vii, 224 s. ISBN 80-85912-00-7X-.
55. BOLEK, Silvestr. *Dezinfekce, sterilizace a režim v prevenci nozokomiálních nákaz*. Praha: AVICENUM, 1984.
56. MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Dezinfekce a sterilizace ve zdravotnictví: Aktuální přehled*. Praha: Grada, 1994. ISBN 80-716-9095-3.
57. MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Ochranná dezinfekce*. Vyd. 1. Praha: Společenstvo drobného podnikání, 118 s. ISBN 80-020-1559-2.
58. NATIONAL POLLUTANT INVENTORY. *Ethanol (ethyl alcohol)* [online]. Australia: Commonwealth of Australia, 2013 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.npi.gov.au/resource/ethanol-ethyl-alcohol>

59. VAN SCOTT, Eugene J., Chérie M. DITRE a Ruey J. YU. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. *Clinics in Dermatology* [online]. 1996, vol. 14, issue 2, s. 217-226 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/0738-081X(95)00157-B.
60. ELSNER, Peter a Howard I MAIBACH. *Cosmeceuticals*. Marcel Dekker, c2000, xi, 369 p. Cosmetic science and technology series, v. 23. ISBN 08-247-0305-7.
61. Mandelic Acid Information: *Mandelic Acid Treatment for Acne and Pimples, Melasma, Rosacea, Antiaging, Fine-Lines and Wrinkles, Hyperpigmentation skin, and Skin Lightening* [online]. 2011 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.mandelicacid.net/>
62. TAYLOR, Mark B. Summary of Mandelic Acid for the Improvement of Skin Conditions. *Cosmetic dermatology* [online]. 1997, 26 - 28 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.dermage.com.br/dermage/paginas/article.pdf>
63. CURVE, Annika. White Biotech Approach to Synthesize Mandelic Acid Using Microbes and Plants as a Source of Nitrilase. *ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.* [online]. 2011, roč. 2011, 2 (1), 191 - 200 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: http://www.academia.edu/695900/White_Biotech_Approach_to_Synthesize_Mandelic_Acid_Using_Microbes_and_Plants_as_a_Source_of_Nitrilase
64. EPHIDERM. *Anti-Acne Skincare Solution Featuring Mandelic Acid: The Science*. 2014. Dostupné z: <http://ephiderm.com/the-science/>
65. BUSINESS LINE, *Personal Care Industry Europe. Mandelic acid*: R.L. Chemicals Industries PVT, Ltd. [online]. [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: https://www.in-cosmetics.com/_novadocuments/43379?v=635230448081000000
66. MEDICAL COSMETIC. *MESO PEELINGS: MESO MANDELIC 45%*. 2012. Dostupné z: http://bidmybeauty.com/web/media/PashaClinicMayfair_Meso_Peels.pdf
67. WISEGEEK. *What Are the Medical Uses of Mandelic Acid?* [online]. U.S.A., 2003 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.wisegeek.com/what-are-the-medical-uses-of-mandelic-acid.htm>
68. BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, xvi, 648 p. ISBN 35-404-9338-7.
69. BAŞER, K a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, c2010. ISBN 14-200-6315-4.

70. LEUNG, Albert Y. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Wiley, c1980, xvi, 648 p. ISBN 04-710-4954-9.
71. KIRK, Raymond a Donald F. OTHMER. *Encyclopedia of chemical technology. [Volume] 14: Nomenclature to petroleum (Resources)*. New York: John Wiley & Sons, 1967.
72. BAUER, Kurt, Dorothea GARBE a Horst SURBURG. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties, and uses*. 4th, completely rev. ed. New York: WILEY-VCH, c2001. ISBN 35-273-0364-2.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AHA	α -hydroxykyseliny
BHA	β -hydroxykyseliny
CA	<i>Candida albicans</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Colony form units – kolonie tvořící jednotku
CMC	Karboxymethylcelulóza
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
DDM	Disková difúzní metoda
EC	<i>Escherichia coli</i>
EO	Esenciální olej
G ⁺	Gram-pozitivní bakterie
G ⁻	Gram-negativní bakterie
JDM	Jamková difúzní metoda
MC	Methylcelulóza
MHA	Müeller-Hinton agar
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
MO	Mikroorganismus
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	Tryptonový sójový agar
TSB	Tryptonový sójový bujón
RPM	Počet otáček

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Struktura epidermis [1]</i>	12
<i>Obr. 2. Závislost redukce bakteriální kontaminace na čase [20, s. 308].....</i>	18
<i>Obr. 3. Návod na správnou hygienickou dezinfekci rukou [24]</i>	19
<i>Obr. 4. Struktura carbomeru [38].....</i>	23
<i>Obr. 5. Závislost viskozity carbomerového gelu na pH [43]</i>	25
<i>Obr. 6. Struktura karboxymethylcelulózy [46].....</i>	26
<i>Obr. 7. Struktura methylcelulózy [50]</i>	27
<i>Obr. 8. Závislost viskozity na smykové deformaci [52]</i>	29
<i>Obr. 9. Vzorec kyseliny mandlové [63, s. 191 – 192]</i>	34
<i>Obr. 10. Struktura cinnamaldehydu [72, s. 118]</i>	39
<i>Obr. 11. Struktura tymolu (vlevo) a karvakrolu (vpravo) [72, s. 133]</i>	40
<i>Obr. 12. Vzorec eugenolu [72, s. 137].....</i>	41
<i>Obr. 13. Struktura citralu (vlevo) a limonenu (vpravo) [72, s. 52]</i>	42
<i>Obr. 14. Křivka 2. derivace titrační křivky v okolí bodu ekvivalence</i>	64
<i>Obr. 15. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem tymiánového esenciálního oleje</i>	77
<i>Obr. 16. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem hřebíčkového esenciálního oleje</i>	78
<i>Obr. 17. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem skořicového esenciálního oleje</i>	79
<i>Obr. 18. Srovnání antimikrobních účinků gelů s obsahem citronového esenciálního oleje</i>	80
<i>Obr. 19. Srovnání antimikrobních účinků směsných gelů a gelu s obsahem etanolu pomocí jamkové difúzní metody</i>	81
<i>Obr. 20. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem tymiánového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo).....</i>	83
<i>Obr. 21. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem hřebíčkového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo).....</i>	83

<i>Obr. 22. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem skořicového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo).....</i>	<i>84</i>
<i>Obr. 23. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem citronového esenciálního oleje a roztoku kyseliny mandlové testovaného za praktických podmínek (vpravo).....</i>	<i>84</i>
<i>Obr. 24. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem 60 % ethanolu testovaného za praktických podmínek (vpravo)</i>	<i>85</i>
<i>Obr. 25. Počáteční hodnoty (vlevo), inhibiční účinek gelu s obsahem 45 % ethanolu testovaného za praktických podmínek (vpravo)</i>	<i>85</i>
<i>Obr. 26. Výsledky stupnicové zkoušky - vzhled a barva</i>	<i>86</i>
<i>Obr. 27. Výsledky stupnicové zkoušky - vůně</i>	<i>87</i>
<i>Obr. 28. Výsledky stupnicové zkoušky - konzistence</i>	<i>88</i>
<i>Obr. 29. Výsledky stupnicové zkoušky - roztíratelnost</i>	<i>89</i>
<i>Obr. 30. Výsledky stupnicové zkoušky - vstřebatelnost</i>	<i>90</i>
<i>Obr. 31. Výsledky pořadové zkoušky</i>	<i>91</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Baktericidní a virucidní účinek ethanolu [53, s. 614]</i>	32
<i>Tab. 2. Klasifikace hydroxykyselin [60, s. 36]</i>	33
<i>Tab. 3. Receptury gelů s vybranými gelotvornými látkami při daných koncentracích</i>	47
<i>Tab. 4. Typy spindlu a jejich rozsahy pro měření viskozity</i>	48
<i>Tab. 5. Antimikrobiální gel s obsahem 0,1 hm.% carbomeru</i>	51
<i>Tab. 6. Antimikrobiální gel s obsahem 0,2 hm.% carbomeru</i>	51
<i>Tab. 7. Antimikrobiální gel s obsahem 0,4 hm.% carbomeru</i>	51
<i>Tab. 8. Přídavky 1M hydroxidu sodného do gelů o příslušném obsahu carbomeru</i>	51
<i>Tab. 9. Antimikrobiální gel s přídavkem esenciálních olejů</i>	52
<i>Tab. 10. Receptury antimikrobiálních gelů s přídavkem roztoku kyseliny mandlové a esenciálních olejů</i>	53
<i>Tab. 11. Receptury antimikrobiálních gelů s přídavkem roztoku kyseliny mandlové a esenciálních olejů</i>	53
<i>Tab. 12. Složení Nutrient agaru</i>	54
<i>Tab. 13. Složení Sabouraud Chloramphenicol agaru</i>	55
<i>Tab. 14. Složení Nutrient brothu</i>	55
<i>Tab. 15. Složení Müeller-Hinton agaru</i>	56
<i>Tab. 16. Složení tryptonového sójového bujónu</i>	56
<i>Tab. 17. Složení TSA</i>	56
<i>Tab. 18. Koncentrace roztoků kyseliny mandlové</i>	57
<i>Tab. 19. Vybrané směsné gely pro testování dle ČSN EN 1500</i>	59
<i>Tab. 20. Složení neutralizátoru</i>	60
<i>Tab. 21. Naměřené hodnoty pH a viskozity gelů s obsahem různých gelotvorných látek</i>	63
<i>Tab. 22. Hodnoty měření pH a viskozity carbomerových gelů</i>	64
<i>Tab. 23. Inhibiční účinky roztoků kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí diskové difúzní metody</i>	65
<i>Tab. 24. Inhibiční účinky esenciálních olejů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí diskové difúzní metody</i>	66
<i>Tab. 25. Hodnoty pH a viskozity u gelů s přídavkem esenciálních olejů</i>	67
<i>Tab. 26. Rámcové složení gelů s přídavkem roztoku kyseliny mandlové</i>	68

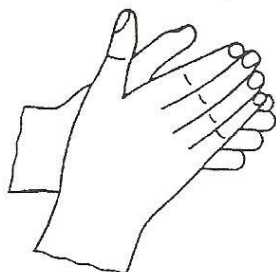
<i>Tab. 27. Hodnoty pH a senzorické zhodnocení viskozity gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové.....</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 28. Přesné přidavky 1M NaOH do gelů s obsahem roztoku kyseliny mandlové</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 29. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 30. Rámcové složení gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové.....</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 31. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s přidavkem roztoku kyseliny mandlové</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 32. Naměřené hodnoty pH a viskozity u gelů s obsahem 30 % ethanolu</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 33. Inhibiční účinky gelů s obsahem esenciálních olejů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 34. Inhibiční účinky gelů s kyselinou mandlovou na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 35. Inhibiční účinky gelů s kyselinou mandlovou na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 36. Inhibiční účinky gelů s ethanolem na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 37. Hodnoty pH a viskozity u směsných gelů s obsahem 3 hm.% 10% roztoku kyseliny mandlové.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 38. Hodnoty pH a viskozity u směsných gelů s obsahem s 3 hm.% 15% roztoku kyseliny mandlové.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 39. Inhibiční účinky směsných gelů s 3 hm.% 10% roztoku kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 40. Inhibiční účinky směsných gelů s 3 hm.% 15% roztoku kyseliny mandlové na vybraných bakteriálních kmenech pomocí jamkové difúzní metody</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 41. Inhibiční účinky směsných gelů na vybraných bakteriálních kmenech pomocí doplňkové metody</i>	<i>76</i>
<i>Tab. 42. Směsné gely s nejlepšími antimikrobiálními vlastnostmi</i>	<i>77</i>
<i>Tab. 43. Protimikrobní účinnost gelů testovaných za praktických podmínek</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 44. Vyhodnocení senzorické analýzy vzhledu a barvy antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test).....</i>	<i>111</i>
<i>Tab. 45. Vyhodnocení senzorické analýzy vůně antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)</i>	<i>111</i>

<i>Tab. 46. Vyhodnocení sensorické analýzy konzistence antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test).....</i>	<i>111</i>
<i>Tab. 47. Vyhodnocení sensorické analýzy roztíratelnosti antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test).....</i>	<i>112</i>
<i>Tab. 48. Vyhodnocení sensorické analýzy vstřebatelnosti antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test).....</i>	<i>112</i>
<i>Tab. 49. Vyhodnocení pořadové zkoušky u vzorků antimikrobiálních gelů (Friedmanův test)</i>	<i>112</i>

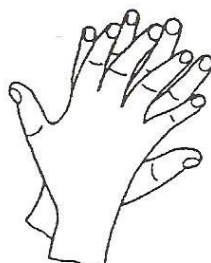
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I.....	108
Příloha P II.....	109
Příloha P III.....	111

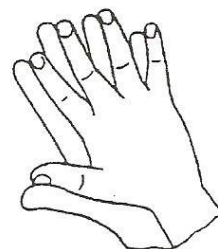
PŘÍLOHA P I: STANDARDNÍ POSTUP DEZINFEKCE RUKOU



Krok 1
Dlaně k sobě



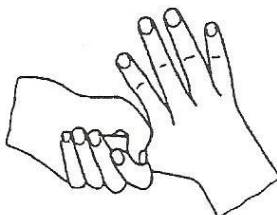
Krok 2
Pravá dlaň přes
levý hřbet a levá dlaň
přes pravý hřbet



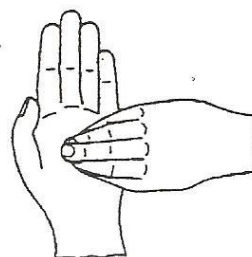
Krok 3
Dlaně k sobě
s propletenými
prsty



Krok 4
Sevřít zadní strany
prstů do opačné
dlaně



Krok 5
Otáčením mnout pravý
palec v sevření levé
dlaně a opačně



Krok 6
Otáčením mnout
sevřené prsty
pravé ruky v levé
dlani a opačně

PŘÍLOHA P II: DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ

Univerzita Tomáše Baťi ve Zlíně

Fakulta technologická

DOTAZNÍK PRO HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH GELŮ

Jméno a příjmení:

Datum:

Podpis:

.....

Úkol 1. Ohodnoťte jednotlivé znaky (vzhled a barva, vůně, konzistence, roztíratelnost, vstřebatelnost) předložených vzorků gelů dle příslušné stupnice.

	Vzhled a barva	Vůně	Konzistence	Roztíratelnost	Vstřebatelnost
A					
B					
C					
D					
E					

Úkol 2. Seřadte předložené vzorky gelů dle vašich preferencí (1 – nejlepší, 5 – nejhorší). Jedná se o zkoušku s nucenou volbou, tzn., že každý vzorek musí mít přidělené jiné číslo.

	A	B	C	D	E
Preference					

Stupnice:

Vzhled - barva a vůně

1. **Vynikající** – vzhled typický pro přípravek daného typu, transparentní, přítomnost bublin
2. **Velmi dobrý** – vzhled stále optimální, transparentní, mírná přítomnost bublin
3. **Dobrá** – vzhled stále transparentní nebo jemně zakalený, bez bublin
4. **Méně dobrý** – vzhled odlišný, jemně nažloutlý, zakalený, bez bublin
5. **Nevyhovující** – vzhled výrazně odlišný od transparentního, výrazný zákal a zabarvení, bez přítomnosti bublin

Vůně

1. **Vynikající** – vůně bez cizích příměsí
2. **Velmi dobrá** – příjemná vůně
3. **Dobrá** – mírná přítomnost cizích pachů
4. **Méně dobrá** – značná přítomnost cizích pachů
5. **Nevyhovující** – výrazná přítomnost cizích pachů

Konzistence

1. Přípravek má odpovídající konzistenci antimikrobiálních gelů, homogenní
2. Přípravek má velmi dobrou konzistenci, s mírně viditelnými kapičkami olejové fáze
3. Přípravek má dobrou konzistenci, je mírně řidký, s mírně oddělujícími kapičkami olejové fáze
4. Přípravek má méně dobrou konzistenci, je mírně řidký, s viditelnými shluky olejové fáze
5. Přípravek má velmi špatnou konzistenci, je velmi rozbředlý, nehomogenní s oddělujícími se fázemi

Roztíratelnost

1. Roztíratelnost je typická pro daný typ přípravku, optimální
2. Přípravek je velmi dobře roztíratelný, mírně tekutý
3. Přípravek je hůře roztíratelný, mírně tekutý
4. Přípravek je obtížně roztíratelný, tekutý
5. Přípravek je špatně roztíratelný, tekutý

Vstřebatelnost

1. Přípravek je výborně a rychle vstřebatelný, nezanechává lepivý charakter
2. Přípravek je velmi dobře vstřebatelný, bez tvorby lepivého filmu
3. Přípravek je vstřebatelný, zanechávající mírně lepivý dojem
4. Přípravek je hůře vstřebatelný, s tvorbou lepivého dojmu
5. Přípravek je nevstřebatelný, s velmi lepivým dojmem

PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY SENZORICKÉ ANALÝZY

Tab. 44. *Vyhodnocení senzorické analýzy vzhledu a barvy antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)*

Vzorek	Kategorie					Součet pořadí
	1.	2.	3.	4.	5.	
A	4	4	3	1	0	304,50
B	3	6	3	0	0	288,00
C	0	4	4	4	0	494,00
D	2	6	2	1	1	354,50
E	2	3	7	0	0	389,00

Tab. 45. *Vyhodnocení senzorické analýzy vůně antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)*

Vzorek	Kategorie					Součet pořadí
	1.	2.	3.	4.	5.	
A	3	6	3	0	0	289,50
B	6	6	0	0	0	198,00
C	4	0	2	4	2	439,00
D	2	4	4	2	0	375,00
E	1	0	4	7	0	528,50

Tab. 46. *Vyhodnocení senzorické analýzy konzistence antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)*

Vzorek	Kategorie					Součet pořadí
	1.	2.	3.	4.	5.	
A	6	4	2	0	0	315,00
B	4	6	2	0	0	359,00
C	3	0	2	3	4	533,50
D	5	6	0	1	0	329,50
E	7	3	2	0	0	293,00

Tab. 47. Vyhodnocení sensorické analýzy roztíratelnosti antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)

Vzorek	Kategorie					Součet pořadí
	1.	2.	3.	4.	5.	
A	8	4	0	0	0	316,00
B	6	6	0	0	0	369,00
C	2	4	0	4	2	554,00
D	9	2	0	1	0	301,50
E	9	3	0	0	0	289,50

Tab. 48. Vyhodnocení sensorické analýzy vstřebatelnosti antimikrobiálních gelů (Kruskall-Wallisův test)

Vzorek	Kategorie					Součet pořadí
	1.	2.	3.	4.	5.	
A	3	5	3	1	0	409,00
B	4	4	3	0	1	390,50
C	9	2	0	1	0	232,00
D	4	4	2	2	0	394,00
E	3	6	1	1	1	404,50

Tab. 49. Vyhodnocení pořadové zkoušky u vzorků antimikrobiálních gelů (Friedmanův test)

Hodnotitelé	Vzorek				
	A	B	C	D	E
1	2	1	5	4	3
2	4	2	5	1	3
3	1	5	3	2	4
4	1	3	5	2	4
5	4	5	1	2	3
6	1	3	2	4	5
7	2	1	5	3	4
8	2	1	5	3	4
9	3	1	5	4	2
10	2	1	4	3	5
11	3	1	5	2	4
12	2	1	4	3	5
Součet pořadí	27	25	49	33	46