

KONZERVAČNÍ PŘÍSAKY V KOSMETICE

Andrea Bednaříková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea BEDNAŘÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T10141**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Konzervační přísady v kosmetice**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. V úvodní části se věnujte mikroorganismům, které mohou kontaminovat kosmetické přípravky.
3. V další části se věnujte konzervačním látkám, které se využívají v kosmetických přípravcích.
4. Dále se zaměřte na faktory ovlivňující výběr vhodného konzervačního systému a na metody hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetických produktů.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte modelové vzorky kosmetických přípravků s použitím komerčních konzervačních látek.
2. U všech vzorků proveďte zkoušku účinnosti konzervace s gram pozitivními bakteriemi.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. GEIS, P. A. **Cosmetic Microbiology: A Practical Approach**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 295 p. ISBN 978-0-8493-1453-7.
2. ORTH, D. S., DENYER, S. P., KABARA, J. J. **Cosmetic and Drug Microbiology**. New York: Informa Health Care, 2006. 375 p. ISBN 978-0-8493-7266-7.
3. SALVADOR, A., CHISVERT, A. **Analysis of Cosmetic Products**. Oxford: Elsevier, 2007. 487 p. ISBN 978-0-444-52260-3.
4. GOLDMAN, E., GREEN, L. H. **Practical Handbook of Microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 2009. 852 p. ISBN 978-0-8493-9365-5.
5. BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. New York: Informa Healthcare, 2009. 869 p. ISBN 978-1-4200-6963-1.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

18. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 18. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: BEDNARIKOVÁ ANDREA

Obor: TVT KD

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, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 24.5.2013

Bednarikova

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

(2) Diplomová, bakalářská a rigorózní práce odezvaná uchazečem k obhajobě musí být též nejméně třetí pracovištěm školy, před konáním obhajoby zveřejněny a umístěny veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracovního úřadu školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může se zveřejněním práce setkat na své náklady výpůjčkově, copy nebo rozmnožením.

(3) Má-li ze odezvaním práce autor vztáhnout se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

¹⁾ Zákon č. 121/2001 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 1.

(4) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, uživatelem nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k výuce na učebně díla vytvořené žáky nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školské dílo).

²⁾ Zákon č. 121/2001 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). Oprávněný autor školního díla udělí souhlas bez výhradu důvodu, mohou se tyto osoby domáhat náhrady chybného provedení jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 vstoupí nabytím účinnosti.

(2) Nemá-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 vyjádření jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíží k užití vyjádření dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Práce se zabývá problematikou konzervace kosmetických přípravků. Nejprve jsou charakterizovány druhy mikroorganismů kontaminující kosmetické prostředky, dále příčiny mikrobiální kontaminace a také možnosti konzervace kosmetických přípravků.

Cílem práce bylo prověřit účinnost komerčních konzervačních přísad Versatil, tedy jejich schopnost zajistit bezpečnost a stabilitu při kontaminaci gram pozitivními bakteriemi *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*.

Klíčová slova: mikrobiální kontaminace, konzervační látky, účinnost konzervantů

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with preservation of cosmetic products. At first, microbial species contaminating cosmetic products are characterised, then the sources of microbial contamination and the possibilities of cosmetic products preservation are reviewed.

The aim of the thesis was to evaluate the efficiency of commercial preservatives Versatil by examining their ability to provide sufficient safety and stability of cosmetic products inoculated with Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: microbial contamination, cosmetic preservatives, preservative efficiency

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce, kterou byla RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D. za rady a pomoc při zpracování práce i ochotnou spolupráci při plnění praktické části.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že všechny použité literární zdroje byly citovány.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH.....	12
1.1 BAKTERIE.....	12
1.1.1 Bakteriální buňka	12
1.1.2 Rozdělení bakterií na základě Gramova barvení	13
1.1.3 Grampozitivní bakterie.....	14
1.1.3.1 Rod Staphylococcus.....	14
1.1.3.2 Rod Bacillus.....	15
1.2 PLÍSNĚ A KVASINKY	16
1.3 KONTAMINACE KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ	16
2 KONZERVACE KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ.....	19
2.1 KONZERVANTY V KOSMETICE	19
2.1.1 Syntetické konzervanty	21
2.1.2 Přírodní konzervanty	21
2.1.3 Antioxidanty.....	22
3 CHARAKTERISTIKA KONZERVAČNÍCH LÁTEK.....	23
3.1 ORGANICKÉ KYSELINY, JEJICH SOLI A ESTERY	23
3.1.1 Kyselina sorbová	23
3.1.1.1 Sorbát draselný	23
3.1.2 Kyselina benzoová	24
3.1.2.1 Parabeny.....	24
3.2 ALDEHYDOVÉ A FORMALDEHYDOVÉ KONZERVANTY	25
3.3 ALKOHOLOVÉ DERIVÁTY	25
3.3.1 Fenoxyetanol	25
3.4 OSTATNÍ KONZERVAČNÍ LÁTKY.....	26
3.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝBĚR VHODNÉHO KONZERVAČNÍHO SYSTÉMU.....	26
3.6 METODY HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ OCHRANY KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 MATERIÁL A METODY	30
4.1 ZÁTĚŽOVÝ TEST ÚČINNOSTI KONZERVAČNÍCH LÁTEK	30
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	30
4.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	31
4.4 POSTUP PRÁCE.....	31
4.4.1 Příprava pleťové vody	31
4.4.2 Příprava neutralizačního roztoku	32
4.4.3 Příprava ředícího roztoku	32
4.4.4 4.4.4. Příprava kultivačního média TSA agar (Soyabean Casein Digest Agar)	33
4.4.5 Příprava inokula	33
4.4.6 Provedení odběru vzorku	33

5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL SL PROTI BAKTERII <i>BACILLUS SUBTILLIS</i> SUBSP. <i>SPIZIZENII</i> CCM 4062.....	36
5.2	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL SL PROTI BAKTERII <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i> CCM 3953.....	38
5.3	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL PC PROTI BAKTERII <i>BACILLUS SUBTILLIS</i> SUBSP. <i>SPIZIZENII</i> CCM 4062.....	40
5.4	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL PC PROTI BAKTERII <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i> CCM 3953.....	41
5.5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL BP PROTI BAKTERII <i>BACILLUS SUBTILLIS</i> SUBSP. <i>SPIZIZENII</i> CCM 4062.....	42
5.6	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ÚČINNOSTI KONZERVANTU VERSATIL BP PROTI BAKTERII <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i> CCM 3953.....	43
	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51

ÚVOD

Práce se zabývá problematikou konzervace kosmetických prostředků, která je důležitá z hlediska ochrany zdraví spotřebitele a zajištění stability prostředků. Konzervační látky jsou přidávány do kosmetických prostředků, aby bránily jejich znehodnocení a mikrobiální kontaminaci. Mezi běžně používané konzervační přísady patří estery kyseliny parahydroxybenzoové (parabeny), alkoholy, chlorované deriváty, deriváty močoviny a mnohé další látky.

Cílem konzervace kosmetického prostředku je zabránit kontaminaci a degradaci výrobku nejen během výroby, ale i po dobu užívání. Mikrobiální kontaminace může způsobit rozklad prostředku (zánik emulze), změnu barvy, zápach a další nežádoucí projevy. Při styku s kůží může dojít k podráždění a jiným problémům způsobených kontaminací patogenními mikroorganismy.

Konzervace kosmetických prostředků je velmi důležitá pro stabilitu prostředků a ochranu spotřebitele před mikroorganismy. Bez konzervace by většina prostředků, s výjimkou prostředků s vyšším obsahem alkoholu, byla kontaminována. Konzervační látky většinou nebývají přidávány samostatně, ale ve směsích, kvůli pokrytí širšího spektra mikroorganismů. Musí být schopny zastavit množení a růst většiny zejména patogenních mikroorganismů.

Není povoleno prodávat výrobky kontaminované nebo ohrožené kontaminací. Výroba musí být v souladu s hygienickými předpisy, jinak dochází ke zhoršení kvality výrobku a ohrožení spotřebitele. Každá země má své vlastní předpisy pro výrobu kosmetiky a uvedení na trh zahrnující povolené množství nepatogenních mikroorganismů ve finálním produktu.

Konzervační látky jsou jedny z nejkontroverznějších kosmetických přísad. Jsou zodpovědné za většinu nežádoucích projevů na kůži. Jejich množství v kosmetickém prostředku nesmí překročit povolenou koncentraci a jsou nejčastější příčinou vzniku kontaktní dermatitidy.

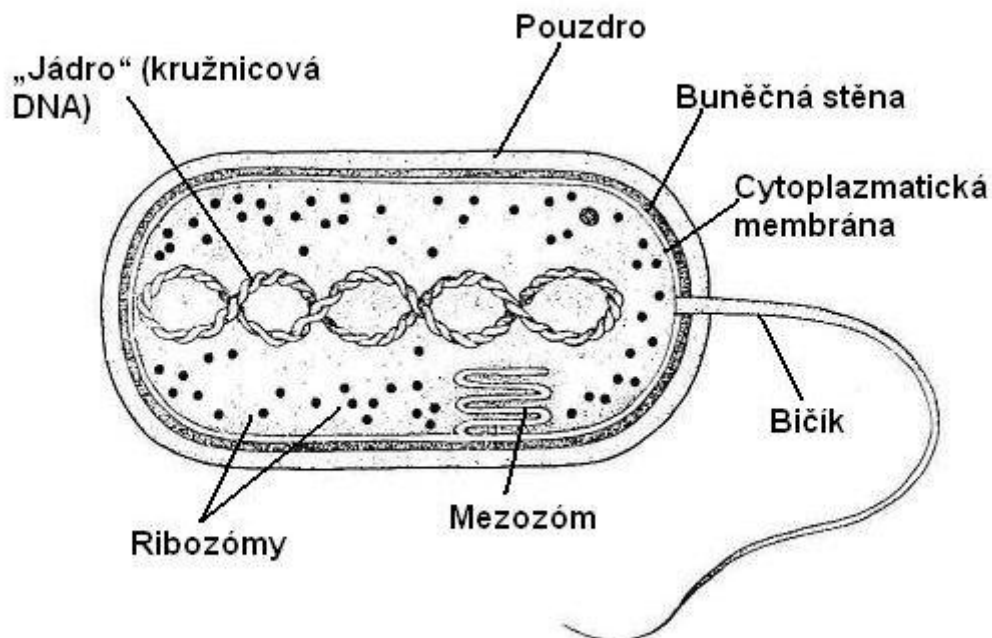
Praktická část této práce se zabývá testováním účinku konzervačních látek proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* v připravených vzorcích pleťových vod. Testovány byly tři druhy komerčních konzervačních látek ve třech různých koncentracích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

1.1 Bakterie

Bakterie hrají významnou roli v ekosystému. Jsou velmi důležité jak pro biochemické cykly, tak pro zachování homeostázy prostředí. Bakterie jsou téměř všudypřítomné, proto nepřekvapí, že se vyskytují i v celé řadě kosmetických výrobních závodů. Mnohé bakterie vykazují značnou odolnost k podmínkám prostředí, tedy i například k působení dezinfekčních látek. Dobrá ochrana výrobku a čistota výrobního prostředí pomáhá zabránit kontaminaci, nicméně je nezbytné mikrobiologickou kvalitu výrobků kontrolovat. [1, 24]



Obr. 1 : Buňka bakterie [2]

1.1.1 Bakteriální buňka

Bakterie patří mezi prokaryotické organizmy, které na rozdíl od eukaryot postrádají membránové organely. Přestože jsou bakterie jednoduché organizmy, jejich buňky se mohou vyskytovat v několika tvarech; nejčastější je kulovitý tvar (koky), dále mohou mít tvar tyčinkovitý, spirálovitý nebo vláknitý. Bakteriální buňka je řádově menší než buňka eukaryotických mikroorganismů. Rozměr buněk bakterií se pohybuje v rozmezí desítek až stovek nanometrů. Struktura bakteriální buňky je znázorněna na obrázku 1.

Buněčná stěna a plazmatická membrána obklopují buňku, některým buňkám chybí buněčná stěna, avšak všechny mají cytoplazmatickou membránu.

Genetický materiál je uložen v jádru, které není obklopeno jadernou membránou jako u eukaryotických organismů. Ribozomy jsou rozptýleny volně v cytoplazmě. Jedinou organelou vystupující z povrchu buňky je bičík, který je přítomen pouze u některých bakterií. Buněčnou stěnu obklopují kapsule, pili nebo fimbrie, které umožňují bakteriím přichycení k povrchu. [1, 25, 26]

1.1.2 Rozdělení bakterií na základě Gramova barvení

Grampozitivní a gramnegativní buněčné stěny jsou definovány podle zbarvení buňky a fyziologické struktury. Technika Gramova barvení je založena na rozdílném zbarvení buněk bakterií; některé buňky se zbarví růžově, ostatní nachově. [1, 27]

Při provedení Gramova barvení se nejprve nanese suspenze bakterií na sklíčko a zafixuje plamenem, poté se přidá roztok krystalové violeti, který se ponechá na sklíčku přibližně minutu a opláchně se vodou. Bakterie absorbují barvivo a zbarví se nachově. Dále se na sklíčko přidá jod, který působí jako mořidlo. Následně se směs opláchně acetonem nebo etanolem, aby došlo k odstranění barviva. Nakonec se provede dobarvení safraninem, při němž dojde ke zbarvení do růžova. Pokud krystalová violet není odstraněna acetonem, pak zbarvení safraninem není viditelné. Pokud je krystalová violet vymyta, jsou bakterie bezbarvé, dokud není přidán safranin. Nachově zbarvené bakterie se nazývají grampozitivní, zatímco růžově zbarvené jsou gramnegativní bakterie. [1, 30, 31]

Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií vykazuje značné rozdíly. Základem buněčné stěny bakterií je peptidoglykan. Peptidoglykan (murein) je polymer složený ze dvou aminosacharidů a několika peptidových řetězců (tetrapeptidů). Peptidoglykan zajišťuje tuhost, pevnost a ochranu proti tlaku a působení vnějších vlivů. V grampozitivních buňkách spojuje D-alanin a L-lysin v tetrapeptidu most tvořený pentaglycinem, lysin a alanin gramnegativních buněk je spojen přímo. Vrstva peptidoglykanu grampozitivních bakterií je tlustší než u gramnegativních bakterií. Gramnegativní bakterie mají však buněčnou stěnu složitější, protože kromě tenké vrstvy peptidoglykanu je její součástí i vnější membrána. Tato membrána je tvořena z dvojvrstvy fosfolipidů podobně jako membrána cytoplazmatická a je příčinou vyšší odolnosti gramnegativních bakterií k některým vnějším vlivům. [1, 27]

1.1.3 Grampozitivní bakterie

1.1.3.1 Rod *Staphylococcus*

Tyto grampozitivní bakterie jsou fakultativně anaerobní nepohyblivé mikroorganismy.

[1, 60] Kolonie jsou obvykle neprůhledné, mohou být bílé nebo krémové, žluté až žlutooranžové. Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C. Bakterie rodu *Staphylococcus* patří mezi všudypřítomné, buňky se vyskytují jednotlivě nebo v nepravidelných shlucích. Můžeme je najít na kůži, kožních žlázách a sliznicích teplokrevných obratlovců. Dále jsou často izolovány z různých potravin živočišného původu a z nejrůznějších zdrojů v prostředí, jako je půda, voda, písek a prach. Některé druhy jsou oportunně patogenní až patogenní pro člověka i zvířata, nebo produkují extracelulární toxiny, případně jsou patogenní jen pro zvířata. Koaguláza pozitivní stafylokoky mohou být patogenní pro člověka nebo zvířata. Koaguláza negativní stafylokoky byly považovány za nepatogenní, ale v současnosti jsou považovány za podmíněné patogeny, které mohou vyvolat onemocnění u oslabeného jedince.

[3, 241]

Staphylococcus aureus je jedním z nejnebezpečnějších druhů bakterií, protože může způsobovat řadu vážných a těžce léčitelných onemocnění. [4, 24] Produkuje toxiny, které způsobují hemolýzu červených krvinek. Dále také produkují různé enzymy, jako například proteázy, lipázy, koagulázy. [1, 60] Infekce ostatními druhy rodu *Staphylococcus* jsou typické spíše pro živočichy, ne pro člověka. Jméno *aureus*, což je latinský výraz pro „zlato“, charakterizuje růst bakterie ve velkých žlutých koloniích.

Staphylococcus aureus žije na kůži a sliznicích teplokrevných živočichů. Lidé jsou jedním z primárních nositelů. Zejména nosní membrány poskytují ideální prostředí pro kolonizaci stafylokoky, protože jsou teplé a vlhké. Nalézají se také na mnoha dalších lokalitách, také v přítomnosti vody a na téměř každém povrchu. *S. aureus* je extrémně odolný, roste v širokém teplotním rozsahu. Pokud podmínky pro růst nejsou příznivé, může být několik let ve stavu dormance. Jedním z důvodů odolnosti je tloušťka buněčné stěny, která je v porovnání s ostatními bakteriemi velmi silná. Tloušťka a vlastnosti buněčné stěny jsou příčinou ztíženého prostupu antimikrobiálních látek do buněk *S. aureus*, což je jeden z mnoha důvodů obtížné léčby onemocnění, které tento mikroorganismus způsobuje.

Většina zdravých jedinců, jejichž kůže je kolonizována bakterií *Staphylococcus aureus*, není infikována díky kožní bariéře, která tvoří přirozenou ochranu proti prostupu mikroor-

ganizmů do těla jedince. Porušení kůže v důsledku zranění však poskytuje možnost vstupu těchto bakterií do organismu. [4, 26, 28]

1.1.3.2 Rod *Bacillus*

Zástupci rodu *Bacillus* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní bakterie tyčinkovitého tvaru uspořádané ve dvojicích nebo v řetězcích s optimální teplotou růstu 15 – 55 °C. Někteří zástupci produkují pigmenty nebo tvoří pouzdra. Několik druhů je patogenních pro obratlovce nebo bezobratlé, mohou způsobit potravinové otravy. [3, 234] Do tohoto rodu patří různorodé a komerčně užitečné skupiny mikroorganismů. Metabolická diverzita spolu s nízkou patogenitou, vede k jejich použití v celé řadě průmyslových procesů. Jsou široce rozšířené v půdě, ve vzduchu a vodě, kde se účastní mnoha chemických přeměn. [5, 1] Metabolismus se adaptuje na nedostatek živin mnoha různými způsoby, nejčastěji vylučováním hydrolytických enzymů a produkcí endospor odolných proti teplu a záření, které mohou přežívat ve stavu dormance mnoho let, ne-li dokonce století. Sporulace a další metabolické změny na konci exponenciálního růstu, jsou velmi důležité v produktivitě buněk. [5, 3] Rod *Bacillus* tvoří oválné nebo kulaté spory, které jsou přítomny v půdě, ve vodě a na rostlinách. Sporami mohou být kontaminovány i kosmetické přípravky a tato kontaminace může mít vážné zdravotní následky. Některé druhy patří mezi běžné producenty antibiotik. Řada druhů rodu *Bacillus* je patogenní, například *B. anthracis* je původcem antraxu, spory mohou způsobit kožní choroby, které vstupují do kůže řeznými ranami a odřeninami. [1, 60, 61]

Bacillus subtilis

Jedná se o pohyblivé bakterie tyčinkovitého tvaru. [6, 7] Jsou to všudypřítomné půdní bakterie, které mohou být z půdy snadno izolovány. Buňky *B. subtilis* jsou unikátní pro svou schopnost zvolit jeden ze tří odlišných genetických programů, pokud mají v prostředí nedostatek živin, nebo pokud buněčná hustota poklesne pod kritickou hodnotu. Pro přežití v těchto nepříznivých podmínkách mohou buňky vstoupit do stacionární fáze růstu, pro kterou je typická tvorba jednotlivých pohyblivých buněk (buňky v exponenciální fázi růstu jsou zpravidla nepohyblivé a tvoří řetězky). Druhou možností je vznik metabolicky inaktivních endospor. [8, preface] *Bacillus subtilis* je schopný tvořit endospory, které jsou schopny růstu v příznivých podmínkách prostředí. [7, 57] Třetí strategií pro adaptaci na nepříznivé podmínky prostředí je navození stavu kompetence. Kompetence je stav, při

kterém může dojít k přijetí cizorodé DNA z prostředí, která může být využita jako zdroj nových genů. [8, preface]

1.2 Plísně a kvasinky

Jedná se o eukaryotické organizmy, které jsou řazeny mezi houby (*Fungi*). Obsahují organely obklopené membránou, zejména jádro, které obsahuje chromozomy. Ostatní membránové organely zahrnují mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a lyzozomy. Termín organela vyjadřuje podobnost orgánů živočichů s těmito vnitřními buněčnými strukturami, které zajišťují specifické funkce. [1, 62] Nejdůležitější komplexní struktura buněk je cytoplazma, která tvoří prostředí pro buněčné organely a místo pro biochemické procesy. [1, 63]

Fungi jsou typické kontaminanty kosmetických prostředků s vyšším obsahem vody a nižšími hodnotami pH, jako jsou například roztoky a krémy. [1, 62] Kosmetické prostředky skladované ve vlhké koupelně mohou být tedy ohroženy kontaminací těmito mikroorganismy. Z tohoto důvodu jsou pro bezpečnost kosmetických prostředků velmi důležité právě fungicidní vlastnosti konzervačních látek. [1, 68,69]

1.3 Kontaminace kosmetických prostředků

K primární kontaminaci dochází při výrobě produktu. Často bývá způsobena gramnegativními bakteriemi. K zabránění primární kontaminace během výroby a plnění je nutné poskytnout čisté pracovní prostředí. Výrobu v celkově čistých podmínkách lze zajistit sterilizací vody a surovin, mytím výrobního zařízení, školením pracovníků o čistotě práce a instalací zařízení jako jsou prachové filtry ve ventilaci a odvlhčovače. Dále je nutné dodržování správné výrobní praxe. Nehygienická výroba vede ke kontaminaci patogenními i nepatogenními mikroorganismy, ke zhoršení kvality produktu a následně k iritaci kůže spotřebitele. Určité množství nepatogenních mikroorganismů ve výrobku je povoleno, povolené množství závisí na legislativě jednotlivých zemí. Koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* jsou příklady patogenních bakterií, které se nesmí vyskytovat v kosmetických prostředcích.

Sekundární kontaminace vzniká během používání přípravku spotřebitelem. Bývá výsledkem kontaminace gram pozitivními bakteriemi přítomnými na ruce a v prostředí. Spotřebitelé mohou ohrozit kvalitu výrobků skladováním v nepříjemných podmínkách, například v mokré sprše nebo vlhké koupelně. [9, 200] Mezi tyto výrobky patří řasenky, oční stíny, šampony, pleťové vody a pudry. Používáním kosmetických přípravků může také dojít ke styku výrobku se slinami, vodou, nebo špinavými rukama, což vede k mikrobiální kontaminaci. [1, 164]

Kontaminace může být zřejmá na první pohled povlakem plísní na povrchu produktu, nebo změnou barvy, zápachem, popřípadě rozkladem emulzního systému. [10] Zakalení čiré kapaliny představuje viditelnou degradaci výrobku, ale rizikem jsou neprůhledné výrobky typu emulzí. Mikrobiální kontaminace také může měnit vzhled produktu obsahem pigmentů. Důležitým kvalitativním parametrem jsou vonné látky, z nichž mohou vznikat účinkem mikrobů těkavé organické sloučeniny jako je skatol, indol nebo sirovodík. [1, 165]

Mikrobiální kontaminace způsobuje nejen organoleptické změny, jako zápach, změny viskozity a barvy, ale může také ohrozit spotřebitele. [11, 212] Lze říci, že kažení kosmetických prostředků může vést k mikrobiální infekci spotřebitele. Protože mnohé konzervační látky způsobují alergickou kontaktní dermatitidu, výrobci používají konzervanty v nejnižších možných koncentracích, bez ztráty antimikrobiálního účinku. Doporučení pro koncentrace konzervantů se liší v závislosti na legislativě jednotlivých zemí. Navíc je v zákonech obecný nedostatek informací o tom, zda konzervační látky používat samostatně, nebo v kombinaci s jinými konzervanty. Kombinace různých konzervačních látek může mít potenciálně synergické nebo doplňkové účinky proti mikroorganismům, a to má několik výhod. Za prvé, se koncentrace potřebné pro dostatečné zabezpečení a uchování vlastností kosmetických přípravků mohou snížit. Vývoj alergické kontaktní dermatitidy je závislý na dávce konzervantů, proto může snížení koncentrace potenciálně vést ke snížení počtu alergických reakcí. Za druhé, vhodně zvolené kombinace konzervačních látek jsou účinné proti širšímu spektru mikroorganismů. [12]

Koncentrace konzervantů hraje důležitou roli a je limitována dvěma hodnotami: MIC (minimální inhibiční koncentrace), která je nejnižší koncentrací antimikrobiální látky, při které nedochází k růstu daného mikroorganismu a MBC (minimální baktericidní koncentrace), která je nejnižší koncentrací zajišťující usmrcení buněk konkrétního mikroorganismu.

Koncentrace konzervační látky a také četnost použití této látky v kosmetických přípravcích je velmi důležitá. Alergické reakce se totiž mohou objevit jak po první aplikaci, tak i po letech používání kosmetiky obsahující konkrétní konzervační látku. [11, 212]

Zdravotní riziko pro spotřebitele představuje především kosmetika s vysokým obsahem vody, která je náchylnější k mikrobiální kontaminaci, respektive poskytuje kontaminujícím mikroorganismům vhodnější podmínky pro růst a množení. [13]

Ačkoli je kosmetika občas kontaminována mikroorganismy způsobujícími kažení výrobku, největší hrozbou kontaminace je pochopitelně přítomnost patogenů, které mohou ohrozit zdraví spotřebitele. Nelze opomenout ani oportunně patogenní mikroorganismy, které mohou být příčinou onemocnění, pokud nastanou určité podmínky, například u osob s oslabenou imunitou, poraněnou či popálenou kůží a podobně. [1, 112]

2 KONZERVACE KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ

Konzervační látky jsou přidávány do kosmetických prostředků ze dvou důvodů: prvním je ochrana proti mikrobiálnímu kažení a tedy prodloužení doby trvanlivosti přípravků, druhým důvodem je ochrana zdraví spotřebitele před potenciální infekcí. [14] Konzervační látky jsou součástí kosmetických přípravků, které mají jako základ vodu nebo vodu v zevní fázi (emulzní systémy typu olej/voda, tzn. nemastné krémy). [15]

Kosmetika nemusí být sterilní, ale musí být přiměřeně chráněna před mikrobiální kontaminací a znehodnocením. [1, 112] Některé kosmetické přípravky obsahují větší množství konzervačních látek než je potřebné k udržení stability výrobku. [12]

Pro úspěšnou konzervaci musí být brány v úvahu všechny aspekty vývoje kosmetického prostředku, od návrhu přes výrobu, až po spotřebitelské využití a likvidaci. Výrobky obsahují širokou škálu kosmetických přísad, obsahují čisté přísady jako chemikálie a přísady, u nichž není známo přesné složení, například rostlinné extrakty. U všech přísad však musí být zajištěna dostatečná mikrobiologická kvalita. [1, 164]

Na obalu kosmetického prostředku musí být mimo jiné vyznačeno datum minimální trvanlivosti. Buď je vyznačen měsíc a rok, nebo den, měsíc a rok. Pokud je to nutné, měly by tyto informace být podle potřeby doplněny údajem o podmínkách, které musí být splněny pro zajištění uvedené trvanlivosti. [11, 214] EU zavedla označení „spotřebujte nejlépe do data“ a „doba po otevření“. Výrobky s trvanlivostí do 30 měsíců musí být označeny nejlépe datem a výrobky s trvanlivostí delší než 30 měsíců jsou označovány symbolem otevřeného kelímku s počtem měsíců, po které je výrobek bezpečný. [11, 8]

Lidem trpícím alergiemi se doporučuje vyhnout se přípravkům obsahujícím alergenní přísady. Každý výrobek musí obsahovat seznam všech složek na etiketě nebo přiloženém letáku. [13]

2.1 Konzervanty v kosmetice

Použití konzervačních látek závisí na předpisech v jednotlivých zemích. Zejména je důležitá bezpečnost, konzervanty nesmí ohrozit zdraví spotřebitele, podráždit pokožku, nebo jinak nepříznivě ovlivňovat místo aplikace. Dále je nezbytná kontrola rozpustnosti, závislosti účinku na pH, barvy a zápachu a jejich snášenlivost s ostatními surovinami v kosmetickém prostředku. Použití některých konzervantů je omezeno pouze pro mýdla, šampony a jiné produkty, které jsou po použití opláchnuty, tzv. rinse off prostředky.

Ne všechny antimikrobiální látky mohou být použity v kosmetických prostředcích vzhledem k tomu, že některé mají nežádoucí vlastnosti. Obecně lze říci, že antimikrobiální látky mohou být použity buď jako látky konzervační, nebo jako látky dezinfekční. Konzervanty by měly splňovat řadu požadavků. Především se jedná o:

- Účinnost proti mnoha druhům mikroorganismů
- Rozpustnost ve vodě nebo jednoduché rozpouštění v běžně používaných kosmetických ingrediencích
- Vysoká bezpečnost, neiritabilita
- Neutrální, neměnicí pH výrobku
- Nesmí snižovat účinek ostatních přísad
- Nesmí mít nepříznivý efekt na vzhled produktu
- Stabilita při vysoké teplotě a změně pH
- Snadná dostupnost
- Nízká cena a ekonomické využití

[9, 202]

Žádná konzervační látka nesplňuje všechny uvedené požadavky, především požadavek na širokospektrý účinek. Z tohoto důvodu nejsou do výrobku obvykle přidávány jednotlivé konzervační látky, ale jejich směsi.

Vzhledem k neustálému nárůstu různých surovin používaných v kosmetice a nedostatku komplexních předpisů pro použití konzervačních látek v kosmetice, je často nutné spoléhat na farmaceutické a potravinářské předpisy a lékopisy. Ale zatímco pro potraviny a farmaceutické látky jsou definována mnohá omezení, kosmetické produkty podléhají pouze kosmetické vyhlášce EU. [11, 213]

Kromě pozitivních ochranných účinků konzervačních látek v kosmetice, jsou předmětem zájmu také jejich nežádoucí účinky, protože některé z těchto látek mohou mít škodlivé účinky na lidské zdraví. Aby byla zajištěna vysoká úroveň ochrany lidského zdraví, jsou kosmetické přípravky regulovány a kontrolovány po celém světě. Konzervační látky povolené v rámci ČR a EU jsou uvedeny v příloze č. 6 Vyhlášky 448/2009 Sb. o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky, kde jsou uvedeny omezení, požadavky, štítek varování a maximální přípustná koncentrace. [16]

V poslední době se značně zvyšuje zájem spotřebitelů o kosmetické přípravky bez konzervačních látek nebo s konzervačními látkami přírodního původu. Ochrany kosmetického prostředku lze docílit i vhodnou formulací přísad. Některé kosmetické přísady mají samy o sobě antimikrobní účinek, dále lze upravit vlastnosti prostředku tak, aby bránily množení mikroorganismů (úprava pH, úprava vodní aktivity kosmetického prostředku a podobně). [14] Konzervační látky nemusí být přidány do výrobků obsahujících vysoké koncentrace etanolu (20 % a vyšší). [17, 698]

2.1.1 Syntetické konzervanty

Potenciální konzervační látky jsou shrnuty v rozsáhlých seznamech, které nerozlišují míru účinnosti daných sloučenin. Jen málo konzervačních látek nabízí uspokojivou účinnost pro běžné použití. [1, 169] Většina konzervantů je účinná pouze pro určitou skupinu mikroorganismů, buď pro bakterie, plísně, nebo kvasinky. Účinnost lze rozšířit kombinací jednotlivých látek, směsi konzervantů pak vykazují širokospektrý účinek potřebný k zachování bezpečnosti produktu. Mnohé z těchto konzervačních látek lze označit jako syntetické konzervanty vyrobené chemickou syntézou.

2.1.2 Přírodní konzervanty

Konzervanty mohou být i přírodní povahy, ale tyto látky mají obecně nižší aktivitu a užší spektrum působení ve srovnání s konzervanty syntetickými. Často jsou tyto přírodní konzervanty založeny na antioxidační aktivitě chránící oleje a tuky před žluknutím. [10] Jejich použití je omezené z důvodu ztráty aktivity začleněním do kompozice produktu a vlivem pH. Přírodní materiály, spíše známé jako účinné složky, je obtížné začlenit do kompozice kvůli jejich konzistenci. Některé takzvaně přírodní nebo přírodně upravené konzervanty se staly komerčními. [1, 172] Přírodní konzervační látky zahrnují rostlinné extrakty, esenciální oleje a vitaminy. Některé vonné látky používané v kosmetice mají antimikrobiální aktivitu, ale jsou často používány v tak nízkých koncentracích, že je účinek nepatrný. Mnoho olejových extraktů má také antimikrobiální účinky, ale opět je nutné použít vysoké koncentrace k zajištění efektivní konzervace. Esenciální oleje a vonné přísady se skládají z mnoha různých chemických komponent, z nichž některé jsou vysoce alergenní. [13]

V předcházejícím textu bylo uvedeno, že mnohé přírodní konzervační látky fungují na principu zamezení oxidace tuků a olejů. Látkám s antioxidačním účinkem je tedy věnována následující podkapitola.

2.1.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky schopné inhibovat oxidační reakce, čímž se zabrání oxidačnímu žluknutí tuků, olejů, vosků, surfaktantů, parfémů a jiných složek kosmetických prostředků. Jsou obvykle reprezentovány redukčními činidly nebo volnými radikály. Jako antioxidanty v kosmetických prostředcích se uplatňují kyselina citronová, galová a její estery. Také vitaminy mohou působit jako antioxidanty, například retinol a jeho prekurzory, tokoferol a askorbová kyselina, nebo vitaminové deriváty jako retinyl acetát, retinyl palmitát, askorbyl palmitát, askorbyl fosfát hořečnatý a tokoferol acetát. Konzervační schopnost přírodních antioxidantů je obvykle nižší než u syntetických konzervantů, naopak jejich výhodou je nepřítomnost vedlejších toxických účinků. [11, 217]

3 CHARAKTERISTIKA KONZERVAČNÍCH LÁTEK

Velké množství konzervačních látek může být rozděleno do několika skupin podle funkční skupiny jejich molekulární struktury. [11, 214] Mezi nejčastěji používané konzervační přísady patří následující skupiny látek.

3.1 Organické kyseliny, jejich soli a estery

Mezi organické kyseliny používané jako konzervační látky patří například kyselina sorbová, salicylová, propionová, jejich soli a také kyselina benzoová, její soli a estery. [3, 215]

3.1.1 Kyselina sorbová

Kyselina sorbová se vyskytuje v přírodě jako součást rostlin, je obsažena v brusinkách, jahodách a rybízu, lze ji připravit i synteticky kondenzací krotionaldehydu s kyselinou malonovou. Jedná se o bílý krystalický prášek, prakticky bez zápachu se slabě kyselou chutí. [18, 282]

Kyselina sorbová je účinná v rozsahu pH 4 – 5,5 a slabě účinná do pH 9. Vykazuje silné fungicidní a slabé baktericidní účinky. Používá se nejen v kosmetických přípravcích, ale také v potravinářském, farmaceutickém a technickém průmyslu. [19] V kosmetických přípravcích bývá zastoupena v 0,2 % koncentraci, zejména v přípravcích obsahující mastné kyseliny a polyoxyethylenové estery. [18, 283] Bývá také často používána v kombinaci s kyselinou benzoovou v různých typech produktů. Kyselina sorbová je více používána než jiné organické kyseliny díky své fyziologické neškodnosti a organoleptické neutralitě. [20, 37]

3.1.1.1 Sorbát draselný

Draselná sůl kyseliny sorbové má nižší účinek než kyselina sorbová. Podobně jako sorbová kyselina je sorbát používán jako inhibitor růstu plísní a kvasinek, zejména když je žádoucí použití konzervační látky s dobrou rozpustností ve vodě. Účinek sorbátu draselného je závislý na pH. [18, 283, 284] Používá se častěji než kyselina sorbová, díky vyšší stabilitě a rozpustnosti. Inhibiční aktivita je stejná jako v případě kyseliny sorbové, ale obvykle je do výrobků přidáváno o 25 % více sorbátu k dosažení stejného efektu. [20, 38]

3.1.2 Kyselina benzoová

Kyselina benzoová je stabilní při nízkém pH, optimální pH účinnosti je 2 – 5. Účinnost ztrácí v přítomnosti proteinů a glycerolu. Kyselina benzoová pokrývá široké spektrum mikroorganismů, grampozitivní a gramnegativní bakterie, kvasinky i plísně. V kosmetických přípravcích se používá v koncentracích do 0,1%. Používá se také ke konzervaci potravin, zejména jako inhibitor růstu kvasinek a plísní v kyselých potravinách. [20] Stejně jako kyselina sorbová je kyselina benzoová nejčastěji přidávána do výrobků v podobě ve vodě rozpustných sodných a draselných solí. [21, 185] Antimikrobiální účinek benzoové kyseliny je založen na inhibici enzymatických reakcí mikrobiálních buněk. Kromě inaktivace enzymů také působí v buněčné stěně. [22, 177]

3.1.2.1 Parabeny

Parabeny jsou alkylestery p-hydroxybenzoové kyseliny, mezi které lze zahrnout metylparaben, etylparaben, propylparaben, butylparaben, a benzylparaben. Estery kyseliny p-hydroxybenzoové a její soli jsou široce používány jako konzervační přísady v kosmetických přípravcích, hygienických potřebách, potravinách a léčivech. [23] Nejpoužívanější je metylparaben a propylparaben. Metylparaben je více rozpustný ve vodě, ale méně účinný proti plísním než propylparaben. Rovnováhy v účinnosti se docílí vytvořením směsi. Z chemického hlediska se jedná o bílé prášky se slabým zápachem, dobře rozpustné ve vodě při pokojové teplotě. [24, 151]

Parabeny jsou běžně používané díky své nízké toxicitě a efektivní konzervační aktivitě, zvláště proti kvasinkám a plísním. [11, 215] Jejich antimikrobiální aktivita je obecně selektivní, takže jejich směsi, nebo směsi s jinými typy konzervačních látek zajišťují antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů. [25] Antimikrobiální aktivita parabenů roste s počtem uhlíků alkylového řetězce, zatímco jejich rozpustnost ve vodě s rostoucím řetězcem klesá. Konzervační účinnost lze zvýšit také přidáním glykolu ve 2 - 5 % koncentraci, nebo použitím parabenů v kombinaci s jinými antimikrobiálními látkami. Naopak je aktivita parabenů snížena v přítomnosti neionických tenzidů. [26, 749] Aktivita parabenů je na pH nezávislá, jsou účinné při podstatně nižších koncentracích, než jsou potřebné pro účinnost slabých kyselin. [27, 72]

Výhodou parabenů je jejich účinnost při vyšších hodnotách pH, v rozmezí od 3 do 8, stabilita při změně teploty, dokonce i při sterilizaci vodní parou. [24, 151]

3.2 Aldehydové a formaldehydové konzervanty

Nejběžněji používané jsou aldehydy a formaldehydy jako oxymetylen nebo formalin. Jsou to levné konzervační látky s vyšší rozpustností ve vodě než v olejích a tucích, používané ve vodných formulacích (šampony, kondicionéry, sprchové gely, tekutá mýdla a koupelové pěny). Nicméně formaldehyd, který je bezbarvý, štiplavě páchnoucí, iritující plyn, může způsobit slzení očí, pálení v očích a krku, nevolnost, dýchací obtíže, alergie a při vysokých koncentracích může vyvolat bolest hlavy a astmatický záchvat. Kosmetika a toaletní potřeby obsahující formaldehyd jako konzervant, jsou prodávány v EU s následujícími omezeními: prostředky ústní hygieny nesmí obsahovat více než 0,1 %, zatímco kosmetika a toaletní potřeby, které se neužívají vnitřně, nesmí obsahovat více než 0,2 %, s výjimkou aerosolových sprejů, kde jsou zakázány. Tato omezení platí, když je formaldehyd použit jako konzervant, ale pokud jsou použity jako nehtová tužidla, může dosahovat koncentrace 5 %. [11, 215]

Ačkoli formaldehyd, používaný především v šamponech a koupelových pěnách, patří mezi oblíbené konzervační látky, jeho užívání klesá. [28]

Omezení platí také pro konzervanty, které ve vodných roztocích uvolňují formaldehyd (donory formaldehydu), jako je imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, hydroxymethylglycinát sodný a benzylhemiformal. Všechny tyto látky jsou regulovány na základě množství uvolněného formaldehydu, vyjadřující maximum povolené koncentrace, shodné s koncentrací uvolněného formaldehydu. [11, 215]

3.3 Alkoholové deriváty

Do této skupiny patří fenoxyetanol, fenoxisopropanol, dichlorobenzyl alkohol, benzyl alkohol, chlorobutanol a další látky. [11, 216]

3.3.1 Fenoxyetanol

Je jednou ze složek konzervantů Versatil PC a Versatil BP použitých v praktické části bakalářské práce. Je účinný zejména proti bakteriím a plísním. Používá se v rozsahu koncentrací 0,5 – 1,5 % při pH 2 – 10. [1, 182, 263] Některé konzervační látky mohou mít v kombinaci s fenoxyetanolem snížený účinek. [12]

3.4 Ostatní konzervační látky

Mezi další skupiny látek s antimikrobiálním účinkem se řadí aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli, imidazolové deriváty a další látky. [11, 216]

3.5 Faktory ovlivňující výběr vhodného konzervačního systému

Efektivní konzervace kosmetiky není jednoduchý proces, při kterém se přidá jedna nebo více konzervačních přísad do výrobku. Aby byla konzervace úspěšná, je nutné zvážit celou řadu faktorů, které mají vliv na účinnost a stabilitu zahrnující celkové chemické a fyzikální vlastnosti, specifické přísady, konzervační účinnost a stabilitu, balení výrobku, výrobní procesy a materiály, předpokládané užívání zákazníkem. [1, 167] Každý jednotlivý kosmetický výrobek vyžaduje individuální přístup při výběru vhodného konzervačního systému. Mezi důležité faktory ovlivňující výběr a dávkování konzervační látky patří, kromě typu produktu a základu, také snášenlivost s ostatními přísadami a doba trvanlivosti. Žádný typ konzervační látky není vhodný pro všechny typy produktů. Tyto faktory lze využít k usnadnění konzervace, ale na druhou stranu mohou být příčinou snížení účinnosti konzervační látky (konzervačního systému). Chemické a fyzikální vlastnosti kosmetických prostředků přímo souvisí s účinností konzervačních látek a stabilitou výrobku. Jednou ze zásadních vlastností je pH produktu; přestože vysoce kyselé nebo zásadité prostředí zabraňuje mikrobiální kontaminaci, relativně malé změny v rozsahu pH, způsobí mikrobiální růst a tím ovlivní účinek konzervantů a stabilitu produktu. [1, 168]

Odolnost kosmetického prostředku vůči mikrobiální kontaminaci, závisí kromě účinku přidaných konzervačních látek, na mnoha faktorech, jako je dávkování, vodní aktivita, nebo přítomnost chelatačních látek, které zvyšují účinek některých konzervantů.

Vodní aktivita, je definována jako obsah dostupné vody, tedy vody, kterou je mikroorganismus schopen využít pro růst, množení a biochemické pochody v buňce. Výrobky s nízkou vodní aktivitou jsou bezpečné i bez přídavku konzervačních látek, ale mnoho kosmetických přípravků, jako jsou krémy, pleťové vody, šampony, kondicionéry a tekutá mýdla, mají vysokou vodní aktivitu a proto je chemická ochrana nutná [13].

Chelatační činidla reagují s ionty kovů v buněčné stěně mikroorganismů, čímž zvyšují schopnost konzervantů pronikat přes buněčnou stěnu a usmrtit mikroorganismus. Jedním

z nejčastěji používaných chelatačních činidel je etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). [13]

3.6 Metody hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetických přípravků

Kromě maximálního počtu mikroorganismů povoleného v konečném produktu, je také důležité, aby byl konzervační systém dlouhodobě účinný proti mikrobiální kontaminaci. Tento účinek lze dokázat pomocí zátěžového testu, při kterém je výrobek cíleně kontaminován mikroorganismy a sleduje se jeho schopnost bránit přítomným kontaminujícím mikroorganismům v růstu. [13]

Principem zátěžových (přeživacích) testů je vnesení standardních kultur různých mikroorganismů (bakterií, kvasinek, plísní) do zkoušeného kosmetického výrobku a sledování míry jejich inaktivace působením použitých druhů a koncentrací konzervačních látek při daném složení a fyzikálních vlastnostech výrobku [29].

Zátěžové testy jsou většinou dlouhodobé, nejčastěji 28-denní, po tuto dobu se v určených intervalech sleduje počet buněk v zaočkovaném vzorku. Má-li být zajištěna dostatečná ochrana výrobku, je nutné tento test provést. Zkušební test je velmi pracný a náročný, zejména pokud je testováno několik různých konzervantů v různých koncentracích [13].

Při provedení testu je třeba brát v úvahu řadu faktorů. Velmi důležitá je příprava inokula bakterií, kterým je testovaný kosmetický prostředek zaočkován. Postup přípravy inokula určuje fyziologický stav buněk, který má přímý vliv na výsledky jakéhokoli testu účinnosti. Kosmetické přípravky jsou zaočkovány určitou mikrobiální kulturou. Tyto kultury je nutné udržovat, tedy přeočkovávat na vhodných médiích, aby byla zajištěna jejich životaschopnost, odolnost a stabilita vlastností. Standardní podmínky pro přípravu a skladování mikroorganismů jsou nezbytné pro reprodukovatelné výsledky.

Inokulum mikroorganismu pro zátěžový test by mělo být standardizováno a je tedy nutné znát počet buněk v inokulu, respektive počet kolonie tvořících jednotek na 1 ml inokula (colony forming units, CFU/ml). [1, 113, 114]

Kosmetické prostředky zpravidla obsahují značné množství různých přísad, z nichž kterákoli může teoreticky snižovat či úplně blokovat účinnost konzervační látky. Kosmetické prostředky v závislosti na svém složení vykazují velkou nebo malou polaritu, různou hodnotu HLB a různý obsah neionických surfaktantů, polymerů a humektantů. Je složité před-

vídat účinek konzervantů s ohledem na složky výrobku, stejně tak odhadnout potřebné množství konzervační látky. Každý výrobek musí být tedy individuálně testován inokulací mikroorganismů, aby byl ověřen konzervační účinek.

V případě, že jednotlivé faktory, které ovlivňují účinnost konzervačních látek, jsou známy a kosmetika se skládá z ingrediencí, které nezpůsobují významnou inaktivaci konzervantu (např. oleje s nízkou polaritou a surfaktanty s nízkou HLB), je možné redukovat množství konzervačních látek v kosmetickém prostředí. Na druhou stranu, pokud se kosmetika skládá z přísad se silným inaktivačním účinkem (oleje s vysokou polaritou, vysoká HLB surfaktantů a polyetylen glykol), množství konzervantů musí vzrůst. Další látky jako humektanty, například 1,3-butylenglykol, mají mikrobistatický účinek proti bakteriím. Pokud jsou použity v kombinaci s vhodnými konzervanty, dochází k synergickému účinku a výsledná koncentrace konzervační látky může být nižší. [9, 206]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Zátěžový test účinnosti konzervačních látek

Byl proveden 28 denní test ke zhodnocení účinku konzervačních látek přidanych do vzorku pleťové vody. K provedení testu účinnosti byly použity grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Nejdříve bylo připraveno inokulum každého ze zvolených mikroorganismů. Dále byly připravené zakonzervované vzorky pleťové vody kontaminovány grampozitivními bakteriemi *B. subtilis* a *S. aureus*. Během 28 dnů byla sledována schopnost konzervačních látek zabránit množení těchto bakterií ve vzorku, případně snížit jejich počet. Odběry vzorků byly provedeny po 7, 14 a 28 dnech, kdy bylo odebráno 500 µl vzorku a smícháno s připraveným neutralizačním roztokem. Dále bylo provedeno ředění v ředícím roztoku a odebraný vzorek byl kultivován na vhodné pevné půdě při optimální teplotě růstu použitých mikroorganismů. Výsledky byly vyhodnoceny na základě počtu kolonií na miskách, pro každý vzorek byla vypočítána hodnota CFU/ml (počet kolonie tvořících jednotek na 1 ml vzorku) a vypočtené hodnoty byly graficky znázorněny.

4.2 Použité chemikálie

Flavol KDA, Enapol a.s.

Spolapon AES, Enapol a.s.

Novethix™ L-10 Polymer, Lubrizol

Kyselina citronová

Tween 40, Himedia

TSA (Soyasean Casein Digest Agar), Himedia

Casein Enzyme Hydrolyste, Himedia

NaCl (LachNer)

Versatil PC, Drstraetmans

Složení: Fenoxyetanol, Kaprylyglykol

Versatil SL, Drstraetmans

Složení: Levulinát sodný, sorbát draselný, voda

Versatil BP, Drstraetmans

Složení: Fenoxyetanol, Kyselina benzoová

4.3 Přístroje a pomůcky

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Automatické mikropipety Biohit a Nichipet

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Denzitometr Unimed, Česká republika

Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko

Laboratorní sklo (kádinky, tyčinky, sterilní misky, sterilní zkumavky, odměrná baňka)

Laboratorní pomůcky (plastové zkumavky a hokejky, kličky, sterilní špičky na mikropipety)

pH metr

Plynový kahan

Vortex Heidolph REAX top, Německo

Vysokorychlostní mixer Heidolph RZR 2020

4.4 Postup práce

4.4.1 Příprava pleťové vody

K provedení testu účinnosti konzervačních látek byly připraveny vzorky pleťové vody podle následující receptury:

Voda	80 %
Tween 40	8,9 %
SLES	8,9 %
Cocamidopropyl betain	1,8 %
Novethix	0,4 %

Do kádinky bylo na 100 g vzorku naváženo :

Novethix	8,9 g
Tween 40	12,71g

SLES	6,67g
Cocamidopropyl betain	1,6g
Voda	70,12 g

Dále byly do vzorků přidány tři druhy konzervačních látek Versatil PC, Versatil SL a Versatil BP ve třech různých koncentracích v rozmezí doporučeném výrobcem. Versatil PC je vhodné použít v koncentracích 0,8 – 1%, Versatil SL 1 – 2 % a Versatil BP

0,5 – 1 %. Pro Versatil PC byly zvoleny koncentrace 0,8 %; 0,9 % a 1%. Pro konzervant Versatil SL byly zvoleny následující koncentrace: 1%; 1,5 %; 2 %. Konzervant Versatil BP byl použit v koncentracích 0,5 %; 0,75 % a 1%. Jednotlivé konzervační přísady byly přidávány do vzorků pleťových vod zvlášť, aby mohla být prověřena antimikrobiální účinnost každého z použitých konzervantů. Následně byla směs homogenizována vysokorychlostním mixérem Heidolph RZR 2020. Problém tvořil špatně se rozpouštějící polymer Novethix, proto se nejdříve nechal nabobtnat a poté byl přidán do směsi. Na závěr bylo upraveno pH na hodnotu 5,5 pomocí 30% roztoku kyseliny citronové. pH bylo upraveno u všech vzorků, přestože Versatil PC je na pH nezávislý, Versatil SL je účinný při pH menším než 6 a Versatil BP je účinný v rozsahu pH 4 – 6. Na závěr byly vzorky převedeny do plastových zkumavek o objemu 10 ml a uchovány k dalšímu použití.

4.4.2 Příprava neutralizačního roztoku

Neutralizační roztok byl připraven z následujících surovin:

Eugonic LT 100 Brook Base (Himedia)

Tween 80 (Himedia)

Destilovaná voda

Do láhve o objemu 400 ml bylo naváženo 12,96 g přísady Eugonic Brook Base. Dále byla připravena směs vody a přísady Tween 80 ve vodní lázni, aby došlo k úplnému rozpuštění. Všechny přísady byly smíchány a následně byl roztok sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.4.3 Příprava ředícího roztoku

Ředící roztok se skládal z:

Casein Enzyme Hydrolyste (Himedia)

NaCl (LachNer)

Destilované vody

Z těchto přísad bylo připraveno 200 ml roztoku, který byl sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.4.4 4.4.4. Příprava kultivačního média TSA agar (Soyabean Casein Digest Agar)

Složení kultivačního média:

TSA agar (HiMedia)

Destilovaná voda

Bylo naváženo 16 g TSA agaru do skleněné lahve a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Následně bylo připravené médium sterilizováno v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut.

4.4.5 Příprava inokula

K provedení testu byly zvoleny grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062. Z připraveného křížového roztěru byl odebrán vzorek mikroorganismů a zaočkován do ředícího roztoku. Následně byla provedena potřebná ředění, kdy byl pomocí denzitometru upraven zákal suspenze na hodnotu 1. stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Takto bylo připraveno inokulum pro *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Dále byly inokulem zaočkovány vzorky pleťových vod připravených v plastových zkumavkách, do každé zkumavky bylo přidáno 100 µl inokula.

4.4.6 Provedení odběru vzorku

Odběry vzorků byly provedeny v čase 0 a dále po 7, 14 a 28 dnech. Odběr vzorku v čase 0 byl použit ke stanovení počtu buněk zaočkových do vzorku pleťové vody, tedy počtu buněk ve vzorku na začátku testu. Bylo odebráno 0,1 ml inokula a smícháno s 10 ml ředícího roztoku. Po důkladném promíchání na vortexu bylo odebráno 0,1 ml vzorku a přeneseno do 2. zkumavky s 10 ml ředícího roztoku. Takto byly provedeny čtyři ředění.

Odběr vzorků po 7, 14 a 28 dnech byl proveden následujícím způsobem. Nejdříve byly provedeny tři ředění. 0,5 ml vzorku bylo smícháno se 4,5 ml neutralizačního roztoku a směs byla homogenizována na vortexu. Dále bylo z neutralizačního roztoku odebráno 0,5

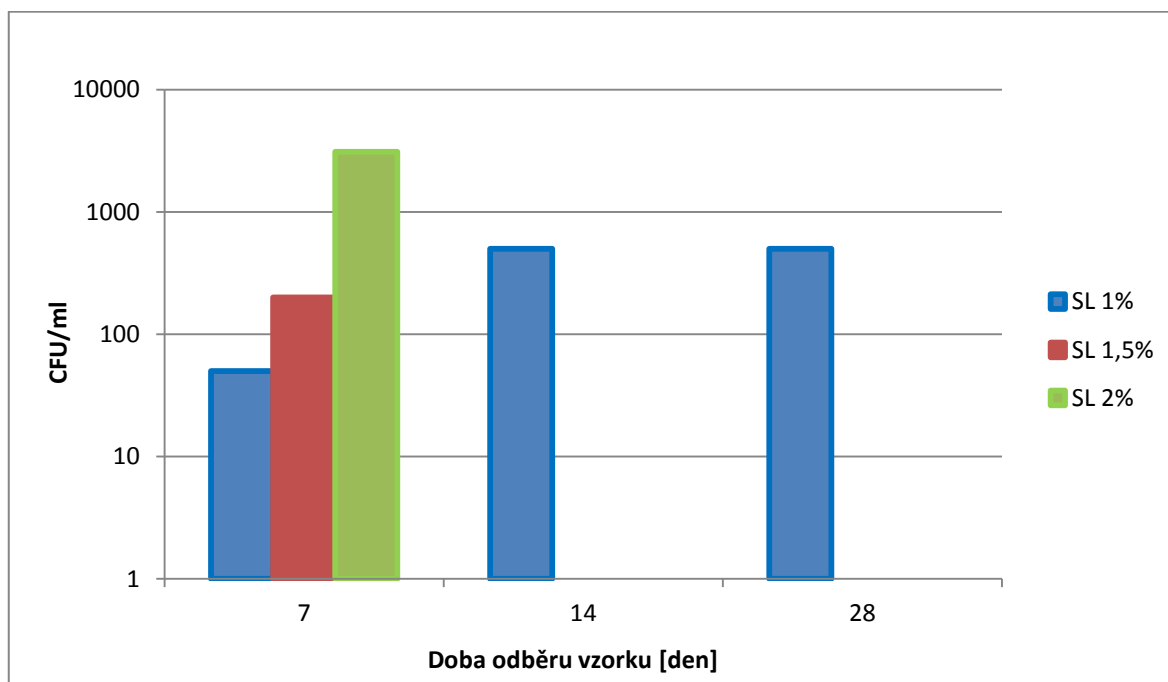
ml vzorku a smícháno se 4,5 ml ředícího roztoku, stejným způsobem bylo provedeno i třetí ředění. Následně bylo mikropipetou odebráno 100 μ l vzorku na misku s TSA agarem, kde byl vzorek rozetřen pomocí sterilní hokejky. Misky byly 48 hodin kultivovány v termostatu při optimální teplotě růstu použitých mikroorganismů, tedy 30 °C pro *B. subtilis* a 37 °C pro *S. aureus*. Po 48 hodinách kultivace byly spočítány kolonie bakterií *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*, poté byla vypočtena hodnota CFU/ml. Výsledky byly zpracovány graficky, na základě vypočtených hodnot byl vyhodnocen antimikrobiální účinek použitých konzervantů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro praktickou část bakalářské práce byly připraveny vzorky pleťových vod, do kterých byly přidávány komerční konzervační prostředky Versatil SL, Versatil PC a Versatil BP. Základem konzervantu Versatil SL je levulinát sodný a draselná sůl kyseliny sorbové (sorbát draselný). Antimikrobiální složkou Versatilu PC je fenoxyetanol a kaprylyglykol, fenoxyetanol je i složkou posledního testovaného konzervantu Versatil BP, který kromě této látky obsahuje i kyselinu benzoovou. Konzervační látky byly do pleťových vod přidávány ve třech různých koncentracích a vzorky pleťových vod byly následně zaočkovány gram-pozitivními bakteriemi *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062.

Hodnocení účinnosti konzervačních látek bylo provedeno pomocí zátěžového testu konzervace, během kterého byl sledován počet životaschopných buněk v jednotlivých vzorcích pleťových vod. Počet buněk ve vzorcích byl stanoven v čase 0 (množství buněk zaočkovaných do vzorku na počátku testu) a dále po 7, 14 a 28 dnech skladování. V následujících kapitolách jsou hodnoceny výsledky tohoto testu pro jednotlivé konzervační látky a mikroorganismy.

5.1 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil SL proti bakterii *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



Obr. 2: Počet buněk *Bacillus subtilis* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL

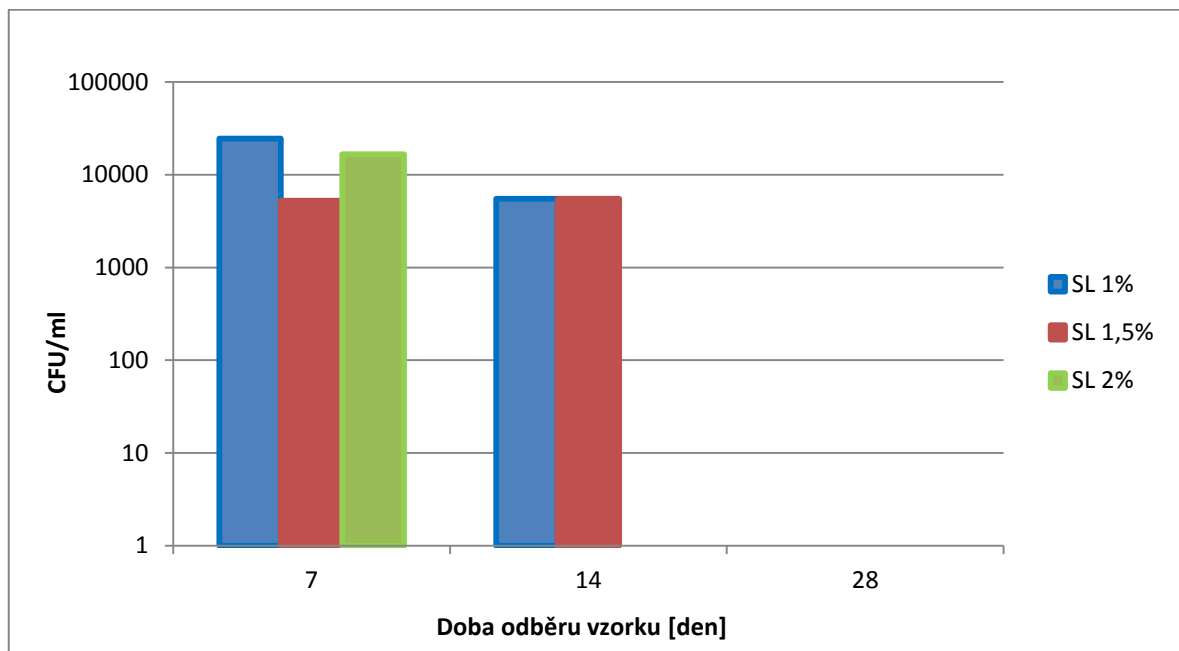
Výsledky zátěžového testu jsou graficky znázorněny na obrázku 2. Versatil SL byl testován v koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %. Do grafu byly vyneseny hodnoty CFU/ml získané po 7, 14 a 28 dnech skladování. Počet buněk ve vzorku odebraném v čase 0, tedy počet buněk vnesených do vzorku pleťových vod, byl stanoven výsevem základního inokula *B. subtilis*. Z počtu buněk v inokulu byl následně vypočítán počáteční počet buněk ve vzorku pleťových vod. V čase 0 byly hodnoty CFU/ml ve vzorcích $1,4 \cdot 10^5$. Po 7 dnech počet kolonií ve vzorku klesl u všech použitých koncentrací. V případě 1% koncentrace klesl počet buněk bakterií ve vzorku na hodnotu 50 CFU/ml, u 1,5% koncentrace došlo ke snížení počtu buněk bakterií na hodnotu 200 CFU/ml a pro 2% koncentraci byl počet buněk stanoven na 3100 CFU/ml. Při dalších odběrech vzorků se počet kolonií postupně snižoval až na nulovou hodnotu. Pouze u vzorku obsahující konzervant o 1% koncentraci se počet kolonií zvýšil při druhém odběru 14. den od zahájení testu na hodnotu 500 CFU/ml a dále zůstal stabilní. 1% koncentrace tedy není vhodná pro konzervaci pleťové vody o daném složení. Přesto je konzervant Versatil SL účinný proti bakterii *Bacillus subtilis*, protože došlo ke

snížení počtu buněk ve vzorcích pleťových vod. Kritéria pro hodnocení účinnosti konzervačních látek jsou uvedeny v České technické normě ČSN EN ISO 11930: Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Tato norma uvádí dvě kritéria pro hodnocení. Jestliže kosmetický přípravek splňuje kritérium A, mikrobiologické riziko je považováno za tolerovatelné a výrobek splňuje požadavky této normy bez dalšího odvodnění. Pokud přípravek splňuje kritérium B, analýza mikrobiologického rizika musí prokázat existenci kontrolních faktorů nesouvisejících se složením výrobku; na příklad ochranné balení (přítomnost pumpičky) poskytuje vyšší úroveň ochrany než nádobka s víčkem. To je považováno za ochranný prostředek pro snížení rizika a přípravek pak splňuje normu na základě kritéria B a mikrobiologické riziko je tolerovatelné.

Podle kritéria A musí dojít ke snížení počtu bakterií nejméně o 3 logaritnické řády po 7, 14 a 28 dnech skladování kosmetického prostředku, zároveň nesmí dojít k žádnému zvýšení počtu od předchozího stanovení. Podle kritéria B musí dojít ke snížení počtu bakterií ve vzorku nejméně o 3 logaritnické řády po 14 a 28 dnech a opět není přípustné zvýšení počtu buněk od předchozího stanovení. V této normě je odchylka 0,5 log od stanovených kritérií považována přijatelnou [30].

Podle výše uvedených kritérií by výrobek konzervovaný Versatilem SL splňoval normu dle kritéria B, vzhledem k tomu, že při prvním odběru nebylo dosaženo požadovaného snížení o 3 logaritnické řády, v následujících odběrech byla ale tato podmínka dodržena při použití Versatilu SL v koncentraci 1,5 a 2 %.

5.2 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil SL proti bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Obr. 3: Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL

Výsledky inhibičního působení konzervantu Versatil SL na bakterii *Staphylococcus aureus* jsou uvedeny na obrázku 3. Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorku odebíraném v čase 0 byl $4,75 \cdot 10^5$. Pokud jde o účinnost konzervantu Versatil SL o koncentraci 1% lze konstatovat, že počet buněk ve vzorcích pleťových vod se během 28 denního testu postupně snižoval. Po 7 dnech byl počet buněk stanoven na $2,4 \cdot 10^4$ CFU/ml, po 14 dnech počet klesl na hodnotu $5,5 \cdot 10^3$ a dále klesal až na nulovou hodnotu. Přestože byl pozorován postupný pokles hodnot CFU/ml, nebylo dosaženo snížení o 3 logaritmičké řády v čase 7 a 14 dní a tento konzervant tudíž nespĺňuje požadavky kladené normou ČSN EN ISO 11930. [30]

Počet buněk ve vzorku konzervovaném Versatil SL o koncentraci 1,5 % se po 14 dnech mírně zvýšil z hodnoty $5,3 \cdot 10^3$ CFU/ml stanovené po 7 dnech, na hodnotu $5,5 \cdot 10^3$ CFU/ml a následně klesl na nulovou hodnotu.

Versatil SL v nejvyšší testované koncentraci 2 % byl hodnocen jako účinný, došlo ke snížení počtu kolonií po 7 dnech na $1,6 \cdot 10^4$ CFU/ml, dále po 14 dnech na nulovou hodnotu a

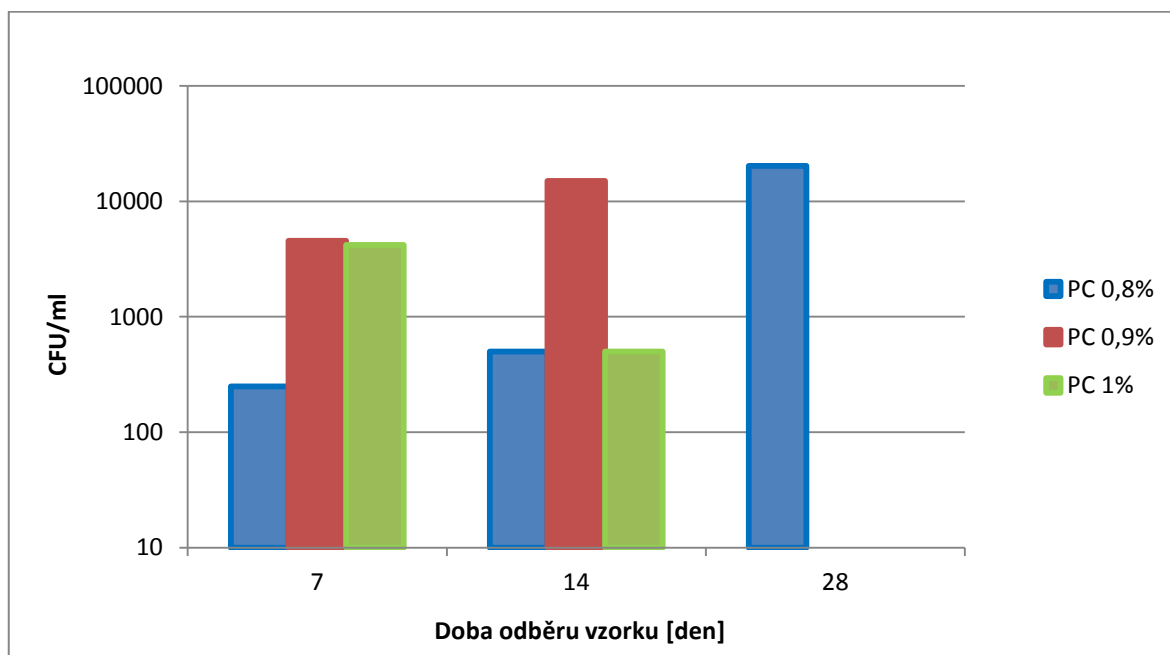
zůstal stabilní. Ve srovnání s požadavky kladenými ISO normou, lze v tomto případě považovat 2% Versatil SL jako účinný vůči *S. aureus* v pleťové vodě a takto zakonzervovaný přípravek by splňoval kritérium B.

Účinnou látkou obsaženou v komerčním preparátu Versatil SL je sorbát draselný. Tato sůl kyseliny sorbové má obecně nižší antimikrobiální účinnost než samotná kyselina a sorbát draselný je velmi účinný především pro inhibici růstu mikroskopických hub. Přesto však má i baktericidní účinky. Podle některých autorů je tato látka efektivní i vůči gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou obecně odolnější k antimikrobním látkám než bakterie grampozitivní. [19]

Ve srovnání s výsledky pro *Bacillus subtilis*, byl Versatil SL méně účinný vůči bakterii *Staphylococcus aureus*. Tento mikroorganismus se však vyznačuje značnou tolerancí k vnějším podmínkám a není výjimečný ani vznik rezistence k antimikrobiálně působícím látkám. Navíc může produkovat celou řadu enzymů, které se mohou podílet na změnách složení kosmetického prostředku, což ovlivňuje i aktivitu přidané konzervační látky. [19], [31]

Na základě výsledků získaných v této práci lze pro konkrétní použité složení pleťové vody doporučit Versatil SL v nejvyšší testované koncentraci 2 %. Pleťová voda o tomto složení splňuje pro oba testované mikroorganismy kritérium B dané normou ČSN EN ISO 11930. Úroveň ochrany takové pleťové vody by byla tedy přijatelná, pokud by existovaly další kontrolní faktory nevztahující se ke složení výrobku, například použití ochranného obalu.

5.3 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil PC proti bakterii *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

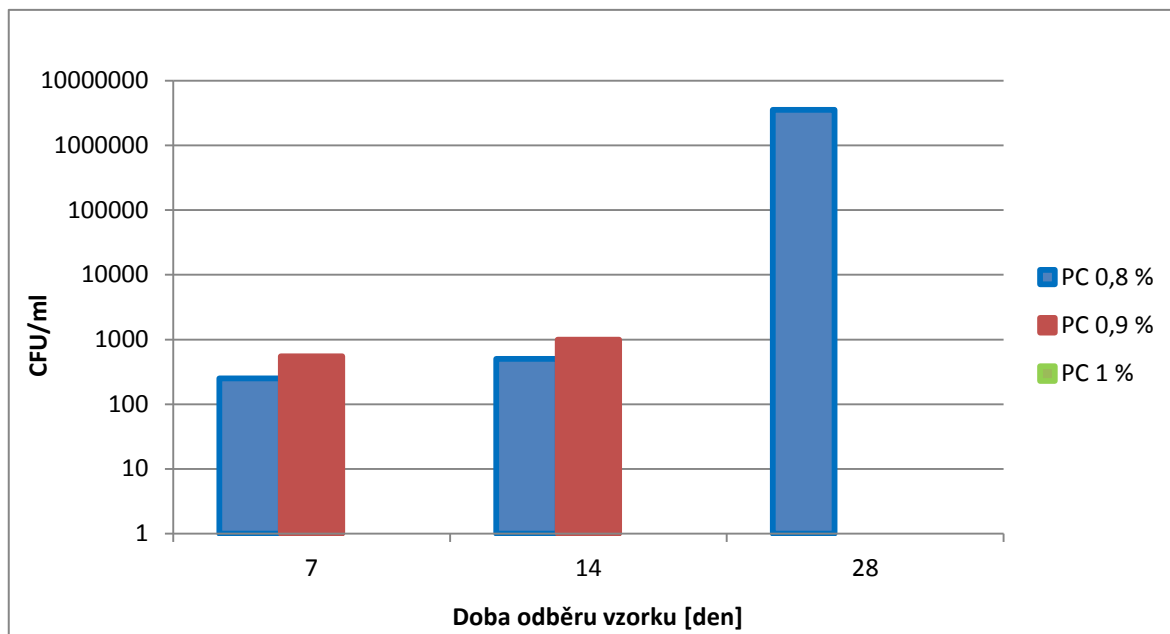


Obr. 4: Počet buněk *Bacillus subtilis* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC

Výsledky stanovení počtu buněk ve vzorcích pleťových vod s konzervantem Versatil PC jsou graficky znázorněny na obrázku 4. V čase 0 byly hodnoty CFU/ml ve vzorcích $1,4 \cdot 10^5$. V případě 0,8% koncentrace konzervantu došlo nejprve ke snížení počtu buněk bakterií ve vzorku odebraném po 7 dnech na hodnotu 250 CFU/ml, následně při odběru vzorku po 14 dnech došlo k nárůstu počtu buněk na hodnotu 500 CFU/ml. Poté došlo k velkému nárůstu buněk bakterií ve vzorku na hodnotu $2 \cdot 10^4$ CFU/ml. U 0,9% koncentrace byl průběh podobný jako u 0,8% koncentrace, počet buněk po 7 dnech dosahoval hodnoty $4,5 \cdot 10^3$ CFU/ml a po 14 dnech $1,5 \cdot 10^4$ CFU/ml. V posledním odběru však už byl počet buněk ve vzorku téměř nulový. V případě 1% koncentrace došlo nejprve k poklesu na hodnotu $4,2 \cdot 10^3$ CFU/ml po 7 dnech a 500 CFU/ml po 14 dnech, poté se počet buněk bakterií ve vzorku postupně snižoval až na nulovou hodnotu.

Ve dvou nižších testovaných koncentracích tedy tento konzervant nesplňuje kritéria stanovené normou ČSN EN ISO 11930: Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. V nejvyšší testované koncentraci 1 % byl konzervant Versatil PC dostatečně účinný, aby pleťová voda splňovala kritérium B dle výše uvedené normy.

5.4 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil PC proti bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Obr. 5: Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC

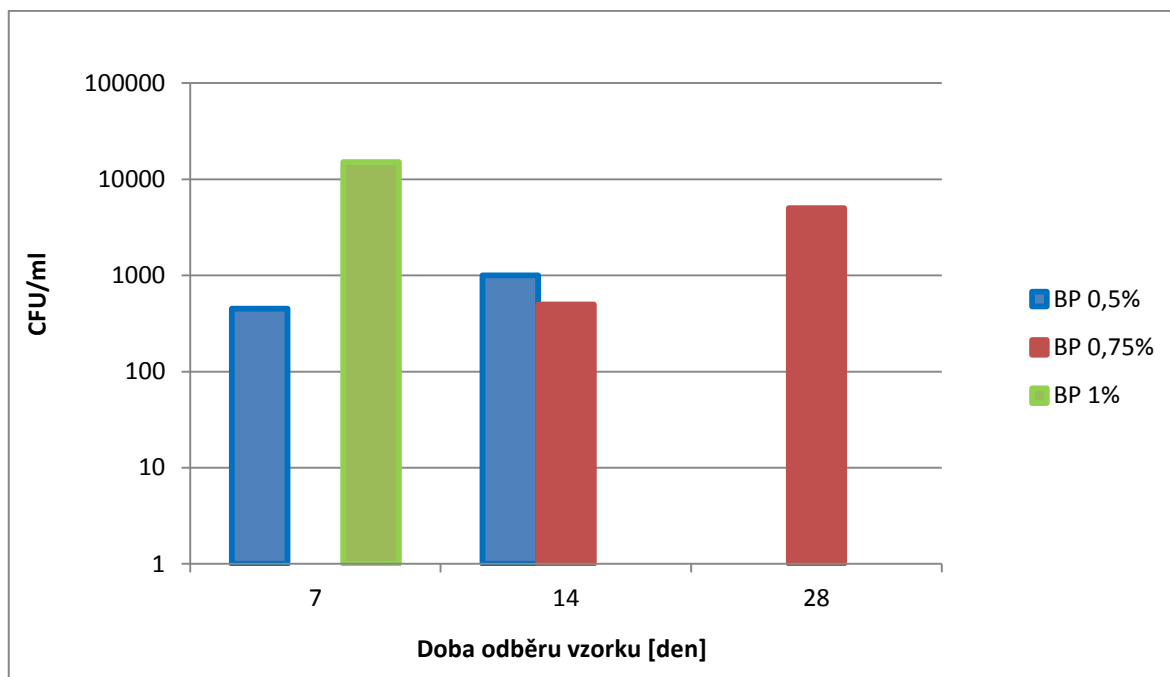
Výsledky zátěžového testu konzervace pleťových vod s konzervantem Versatil PC jsou uvedeny na obrázku 5. Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorku odebíraném v čase 0 byl $4,75 \cdot 10^5$. U vzorku o koncentraci konzervantu 0,8% se počet buněk bakterie *S. aureus* postupně zvyšoval. Po 7 dnech byl počet stanoven na 250 CFU/ml, poté došlo k mírnému nárůstu na hodnotu 500 CFU/ml. Po dalších 14 dnech se počet buněk prudce zvýšil na hodnotu $3,5 \cdot 10^6$ CFU/ml. Průběh testu pro konzervant Versatil PC o 0,9% koncentraci byl podobný jako v případě 0,8% koncentrace. Počet buněk se opět postupně zvyšoval, nejdříve nabýval hodnoty 550 CFU/ml a po 14 dnech 1000 CFU/ml. Během posledního odběru po 28 dnech ale došlo k inhibici bakterie *S. aureus* a ke snížení počtu buněk až na nulovou hodnotu. Pro nejvyšší testovanou koncentraci Versatilu PC 1 % byla zjištěna vysoká účinnost této konzervační látky a během testu nebyl detekován růst *S. aureus* v těchto vzorcích pleťových vod.

Kritéria specifikovaná v normě ČSN EN ISO 11930 nebyla splněna v případě použití Versatilu PC o koncentraci 0,8 a 0,9 %. V obou vzorcích vod docházelo k postupnému

zvyšování počtu buněk během skladování vzorků. Přestože v případě 0,9% koncentrace nebyl po 28 dnech prokázán růst *S. aureus*, nelze tento způsob konzervace dané pleťové vody považovat za bezpečný a vyhovující. V nejvyšší testované koncentraci však Versatil PC splnil požadavky kladené na účinnou konzervaci a lze jej tedy pro tyto účely použít. V této koncentraci navíc Versatil PC vyhovoval i v případě *Bacillus subtilis*, přestože zde bylo splněno pouze kritérium B.

Ve složení komerčního konzervantu Versatil PC je obsažen fenoxyetanol a kaprylyl glykol. Fenoxyetanol je účinný zejména proti bakteriím a plísním. Používá se v rozsahu koncentrací 0,5 – 1,5 % při pH 2 – 10. [19], [32] V této bakalářské práci měl poměrně dobré antibakteriální účinky. V literatuře se však uvádí nízká účinnost vůči gramnegativním bakteriím a bylo by tedy potřebné provést zátěžový test tohoto konzervantu i na gramnegativních bakteriích. [1, 264]

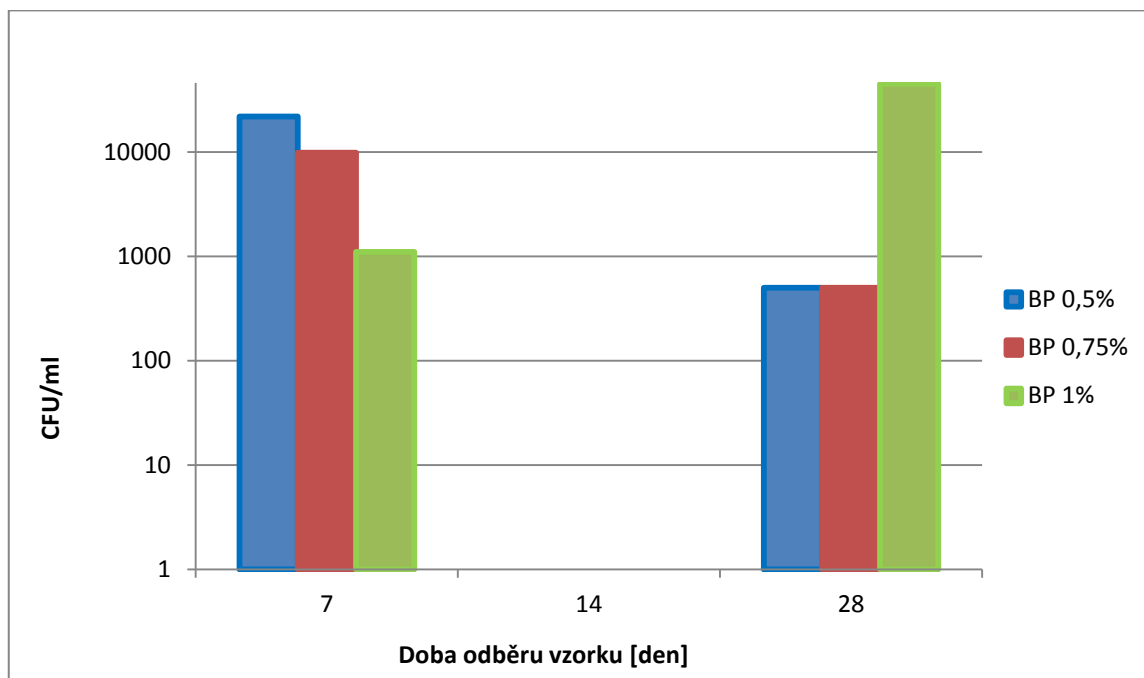
5.5 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil BP proti bakteri *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



Obr. 6: Počet buněk *Bacillus subtilis* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP

Vliv přidavku konzervantu Versatil BP na bakterii *Bacillus subtilis* je uveden na obrázku 6. V čase 0 byly hodnoty CFU/ml ve vzorcích $1,4 \cdot 10^5$. Konzervant Versatil BP je nejúčinnější v 1% koncentraci, kdy došlo již po 14 dnech ke snížení počtu buněk z hodnoty $1,5 \cdot 10^4$ CFU/ml na nulovou hodnotu a počet se dále nezvyšoval. Naopak v případě 0,75% koncentrace počet buněk postupně narůstal. V odběru vzorku po 14 dnech se vyskytovalo 500 CFU/ml, následně se počet zvýšil na 5000 CFU/ml. Více účinný je daný konzervant v 0,5% koncentraci, přestože po 14 dnech došlo k mírnému nárůstu počtu buněk ze 450 CFU/ml na hodnotu 1000 CFU/ml ve vzorku, při posledním odběru vzorku byl počet buněk nulový. Konzervant Versatil BP je nejúčinnější v 1% koncentraci, kdy byla zjištěna značná schopnost tohoto konzervantu inhibovat růst *B. subtilis*. Z hlediska legislativy by bylo možné použití této koncentrace díky splnění kritéria B.

5.6 Vyhodnocení výsledků účinnosti konzervantu Versatil BP proti bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Obr. 7: Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP

Výsledky zátěžového testu jsou graficky znázorněny na obrázku 7. Počet buněk *Staphylococcus aureus* ve vzorku odebíraném v čase 0 byl $4,75 \cdot 10^5$. Ve všech testovaných koncentracích došlo po 7 dnech ke snížení počtu buněk *S. aureus* ve vzorcích pleťových vod. Po 14 dnech skladování byl pozorován značný pokles počtu buněk ve všech vzorcích a hodnoty CFU/ml byly téměř nulové. Efekt konzervantu Versatil BP však nebyl dostatečný po celou dobu testování, po 28 dnech došlo k prudkému nárůstu počtu buněk ve všech vzorcích.

Testovaný konzervant Versatil BP ztrácel svoji účinnost s narůstající délkou skladování. Snížení účinnosti konzervantu mohlo být způsobeno interakcemi konzervačních látek se složkami pleťové vody. Nelze vyloučit ani adaptaci testovaných mikroorganismů k antimikrobním látkám obsaženým ve Versatilu BP.

Testované konzervační přísady Versatil SL, Versatil PC a Versatil PC měly v pleťových vodách inhibiční účinky na testované grampozitivní bakterie. Jejich účinek však závisel na použité koncentraci. Nejúčinnějším konzervantem byl Versatil SL, který v koncentraci 2 % splňoval požadavky na dostatečnou mikrobiologickou bezpečnost dané normou ČSN EN ISO 11930: Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Je nutné dodat, že konzervační látka musí zajistit bezpečnost nejen vůči grampozitivním bakteriím, ale i vůči gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním. Proto by pro výsledné doporučení Versatilu SL bylo nutné provést zátěžové testy i se zástupci těchto mikroorganismů.

ZÁVĚR

Konzervační přísady jsou přidávány do kosmetických přípravků za účelem zabezpečení stability a zdravotní nezávadnosti výrobku po dobu minimální trvanlivosti. Ke zvýšení antimikrobiálního účinku a pokrytí širokého spektra mikroorganismů se do výrobků přidávají směsi konzervačních látek.

Samotné konzervační přísady nezajišťují dostatečnou antimikrobiální ochranu kosmetických přípravků. Mimo jiné je nutné dodržovat správnou výrobní praxi v hygienických podmínkách, dále správnou manipulaci s kosmetickým přípravkem a jeho uskladnění.

Na antimikrobiální ochraně kosmetických přípravků se podílí, kromě konzervačních přísad, také další přísady, jako například tenzidy. Konzervační přísady jsou spolu s vonnými látkami považovány za největší alergeny v kosmetice, alergické reakce mohou vyvolávat také látky přírodní povahy, u kterých není známo jejich přesné složení.

Cílem práce bylo zhodnotit antimikrobiální účinnost komerčních konzervačních přísad proti grampozitivním bakteriím. K provedení testu byl zvolen komerční konzervační prostředek Versatil SL, Versatil PC, Versatil BP a grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Účinek těchto konzervačních látek byl zkoumán ve třech různých koncentracích.

Výsledky získané pro jednotlivé konzervační látky se lišily v závislosti na použité koncentraci a druhu mikroorganismu, kterým byly pleťové vody zaočkovány. Jako nejúspěšnější se jeví konzervant Versatil SL, u něhož došlo ke snížení počtu obou testovaných grampozitivních bakterií, a hodnoty dále zůstaly stabilní. Ostatní konzervační přísady by bylo vhodné použít buď ve vyšších koncentracích, nebo v kombinaci s další antimikrobiální složkou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PHILIP A. GEIS, Ph.D. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*. Second Edition. New York: Taylor Francis, 2006.
- [2] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie*. [online]. [cit. 2013-05-13].
Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.help.htm
- [3] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [4] FREEMAN-COOK, Lisa a Kevin D. FREEMAN-COOK. *Staphylococcus aureus infekce*. InfoBase Publishing, 2006. ISBN 1438101686, 9781438101682.
- [5] HARWOOD, Colin R. *Bacillus*. New York: Plenum Press, c1989, xvii, 414 p. ISBN 03-064-3137-8.
- [6] ROMEO, Tony. *Bacterial biofilms*. Berlin: Springer, 2008. ISBN 9783540754183 3540754180.
- [7] PARISH, J. *Developmental biology of prokaryotes*. Berkeley: University of California Press, 1979, xii, 297 p. ISBN 05-200-4016-3.
- [8] GRAUMANN, Peter. *Bacillus: cellular and molecular biology*. 2. ed. Norfolk: Caister Acad. Press. ISBN 19-044-5597-2.
- [9] TAKEO MITSUI. *New Cosmetic Science*. Amsterdam: Elsevier, 1997. ISBN 0 444 82654 8.
- [10] How to Use Preservatives in Cosmetics. [online]. [cit. 2013-05-19]. Dostupné z: <http://www.makingcosmetics.com/articles/01-how-to-use-preservatives-in-cosmetics.pdf>
- [11] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT SANÍA. *Analysis of cosmetic products*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, xvii, 487 s. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [12] LUNDOV, M. D., J. D. JOHANSEN, C. ZACHARIAE, L. MOESBY a Maria LLOMPART. Low-level efficacy of cosmetic preservatives. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2011, vol. 33, issue 2, s. 190-196 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2010.00619.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2010.00619.x>

- [13] LUNDOV, Michael Dyrgaard, Lise MOESBY, Claus ZACHARIAE, Jeanne Duus JOHANSEN a Maria LLOMPART. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis* [online]. 2009, vol. 60, issue 2, s. 70-78 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2008.01501.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.2008.01501.x>
- [14] DEMTZOS, C. et al. Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* 31, no. 3 (June 2009): 163 – 175. *Academic Search Complete*, EBSCO-host (acceded April 21, 2013). Dostupné z: <http://web.ebscohost.com.proxy.k.utb.cz/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=21f5242c-27b7-4ebc-8fc3-0d80e3275d1b%40sessionmgr111&hid=126>
- [15] MACHOVCOVÁ, A. *Skryté a neočekávané alergenů v kosmetických přípravcích*. Dermatologická praxe [online]. 2007, č. 1 [cit. 2008-10-05], s. 6-9. Dostupné z WWW:
www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=2564&magazine_id=11
- [16] SANCHEZ-PRADO, Lucia, J. Pablo LAMAS, Marta LORES, Carmen GARCIA-JARES a Maria LLOMPART. Simultaneous In-Cell Derivatization Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Multiclass Preservatives in Leave-On Cosmetics. *Analytical Chemistry* [online]. 2010-11-15, vol. 82, issue 22, s. 9384-9392 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1021/ac101985h. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac101985h>
- [17] BAREL, A, Marc PAYE a Howard I MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2009, xvi, 869 p. ISBN 14-200-6963-2.
- [18] RIETSCHER, Robert L, Joseph F FOWLER a Alexander A FISHER. *Fisher's contact dermatitis*. 6th ed. / . Maidenhead: McGraw-Hill Education, distributor, 2008, 862 p., 16 p. ISBN 1550093789.
- [19] ORTH, D. S., J. J. KABARA, S. P. DENYER a S. K. TAN. *Cosmetic and drug microbiology* :. New York: Informa healthcare, 2006, 375 s. ISBN 08-493-7266-6.
- [20] MARIA M. THERON, Maria M.J. *Organic acids and food preservation*. Boca Raton: Taylor, 2010. ISBN 14-200-7843-7.

- [21] LUND, Barbara M, Tony C BAIRD-PARKER a G GOULD. *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 2000, 2 v. ISBN 08-342-1323-0.
- [22] LÜCK, Erich a Martin JAGER. *Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects*. 2nd rev. and enl. ed. New York: Springer, c1997, xxv, 260 p. ISBN 03-876-1138-X.
- [23] HU, P., X. CHEN, R. J. WHITENER, E. T. BODER, J. O. JONES, A. POROLLO, J. CHEN a L. ZHAO. Effects of Parabens on Adipocyte Differentiation. *Toxicological Sciences* [online]. 2013-01-04, vol. 131, issue 1, s. 56-70 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1093/toxsci/kfs262.
Dostupné z: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfs262>
- [24] NEELIMA GARG, K. *Laboratory manual of food microbiology*. New Delhi: International Publishing House Pvt. Ltd, 2010. ISBN 93-805-7801-6.
- [25] Maria Llompert, et al. "Analysis of multi-class preservatives in leave-on and rinse-off cosmetics by matrix solid-phase dispersion." *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 401, no. 10 (January 30, 2012): 3293-3304. *Academic Search Complete*, EBSCOhost (accessed April 23, 2013).
- [26] DAVID B. TROY, David B.editor. *Remington: The science and practice of pharmacy*. 21st ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, 2005. ISBN 07-817-4673-6.
- [27] GOULD, Edited by N.J. Russell and G.W. a Grahame W. GOULD. *Food preservatives*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic, 2003. ISBN 03-064-7736-X.
- [28] HERMAN E. JASS29 Platz Drive, Skillman, NJ 08558, *Formaldehyd*, Kapitola 15, pp 229-236
- [29] Státní zdravotní ústav: *Účinnost konzervace kosmetiky*. [online]. [cit. 2013-05-18]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky>
- [30] ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012.
- [31] DAVIDSON, P., Michael, SOFOS, N. John a Alfred, Larry BRANEN. *Antimicrobials in Food*, 3rd.ed. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2005. ISBN 978-0-8247-4037-5.

- [32] LANGMAIER, Ferdinand. Základy kosmetických výrob. Zlín: UTB-Academia Centrum Zlín, 2011. ISBN 80-7318-016-2.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU	Odhad životaschopných buněk v 1ml vzorku (colony forming units)
ČR	Česká republika
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
EU	Evropská Unie
Flavol KDA	Cocamidopropyl betain; amfoterní, povrchově aktivní látka
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha (hydrophilic-lipophilic balance)
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
Novethix	Polymer
SLES	Lauryl ether sulfát sodný
Spolapon AES	Lauryl ether sulfát sodný
Tween 40	Neionogenní tenzid, polysorbát

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 : Buňka bakterie [2]</i>	<i>12</i>
<i>Obr. 2: Počet buněk Bacillus subtilis ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL.....</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 3: Počet buněk Staphylococcus aureus ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL.....</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 4: Počet buněk Bacillus subtilis ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC.....</i>	<i>40</i>
<i>Obr. 5: Počet buněk Staphylococcus aureus ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC.....</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 6: Počet buněk Bacillus subtilis ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP</i>	<i>42</i>
<i>Obr. 7: Počet buněk Staphylococcus aureus ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP</i>	<i>43</i>