

Monoacylglyceroly jako antimikrobiální přísady v kosmetických přípravcích

Bc. Martina Fridrichová

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. Martina Fridrichová**
Osobní číslo: **T12403**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Monoacylglyceroly jako antimikrobiální přísady v kosmetických přípravcích**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Mikrobiální kontaminace kosmetických prostředků
2. Antimikrobiální přísady potlačující růst mikroorganismů v kosmetických prostředcích.
3. Monoacylglyceroly.
4. Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů.

Praktická část

1. Příprava modelových vzorků kosmetických prostředků s použitím různých antimikrobiálních látek.
2. Testování antimikrobiální ochrany jednotlivých vzorků kosmetických prostředků.
3. Diskuze výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York: InformaHealthcare, 2009. 869 p. ISBN 978-1-4200-6963-1.
2. SALVADOR, A., CHISVERT, A. Analysis of Cosmetic Products. Oxford: Elsevier, 2007. 487 p. ISBN 978-0-444-52260-3.
3. ORTH, D. S., DENYER, S. P., KABARA, J. J. Cosmetic and Drug Microbiology. New York: InformaHealth Care, 2006. 375 p. ISBN 978-0-8493-7266-7.
4. GUNSTONE, F. D. The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9
5. WHITEHURST, R. J. Emulsifiers in Food Technology. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1802-4.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky


Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

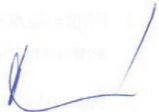
Termín odevzdání diplomové práce:

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: FRIDRICHOVA MARTINA

Obor: ITDK

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 23. 5. 2014



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 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 teč 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.

²⁾ 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, užíje-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 vzdělávacímu 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 užit 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 jim 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na antimikrobní účinky netradičních antimikrobiálních přísad v kosmetických prostředcích. Jako netradiční antimikrobní přísady byly studovány monoacylglyceroly, konkrétně MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$), MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) a MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). Pro srovnání byly testovány také dvě běžně používané syntetické konzervační látky, methylparaben a propylparaben. Ke stanovení účinnosti konzervace sloužil 28 denní zátěžový test, a jako doplňující metoda také měření optické denzity. Indikátorové mikroorganismy představovaly gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Z monoacylglycerolů vykazovaly nejlepší antimikrobní účinky MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) a MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). Parabeny měli obecně lepší antimikrobiální účinky než monoacylglyceroly.

Klíčová slova: monoacylglyceroly, parabeny, kosmetické přípravky, antimikrobiální aktivity, bakterie

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on antimicrobial effects of untraditional antimicrobial ingredients in cosmetic preparations. As untraditional antimicrobial ingredient monoacylglycerols were studied, particularly MAG of capric acid ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$), MAG of undecane acid ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) and MAG of lauric acid ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). To make a comparison two commonly used synthetic preserving agents, methylparaben and propylparaben, were tested. Twenty-eight day challenge test to state the impact of preservation was made, and as a supplement method also the optical density measurement. Indicator microorganisms were represented by Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

The best antimicrobial effects of monoacylglycerols were analysed at MAG undecane acid ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) and at lauric acid ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). The antimicrobial effects of parabens were generally better than these of monoacylglycerol.

Key words: monoacylglycerols, parabens, cosmetic preparations, antimicrobial activity, bacteria

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali při sepisování mé diplomové práce. Především děkuji vedoucí práce RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D. za cenné rady, konzultace, věcné připomínky a věnovaný čas při zpracovávání diplomové práce. Kolektivu mikrobiologické laboratoře FT UTB děkuji za ochotu a vytvoření příjemných pracovních podmínek. Mé poděkování patří také mé rodině a blízkým za jejich neutuchající podporu po celou dobu studia.

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

Ve Zlíně:

Podpis:

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	12
1.1 PŘÍPRAVKY K ČIŠTĚNÍ PLETI.....	13
1.2 KONTAMINACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	15
1.2.1 Primární kontaminace	16
1.2.2 Sekundární kontaminace	17
2 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH	18
2.1 BAKTERIE.....	19
2.1.1 Grampozitivní bakterie.....	19
2.1.2 Gramnegativní bakterie	21
2.2 REZISTENCE MIKROORGANIZMŮ.....	24
3 KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	25
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝBĚR KONZERVAČNÍHO SYSTÉMU	26
3.2 POŽADAVKY NA KONZERVAČNÍ LÁTKY	28
3.3 MECHANIZMUS PŮSOBNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK	29
3.4 KONZERVACE BEZ KONZERVAČNÍCH LÁTEK.....	30
4 ANTIMIKROBIÁLNÍ PŘÍSADY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH	31
4.1 ORGANICKÉ KYSELINY	31
4.1.1 Kyselina benzoová (INCI: Benzoic acid)	32
4.1.2 Kyselina sorbová (INCI: Sorbic acid).....	33
4.2 PARABENY (INCI: PARABENS).....	33
4.3 ALKOHOLY (INCI: ALCOHOLS).....	35
4.3.1 Benzyl alkohol (INCI: Benzyl alkohol)	35
4.3.2 Fenoxietanol (INCI: Phenoxyethanol)	36
4.4 DONORY FORMALDEHYDU	36
4.4.1 Diazolidinyl urea (INCI: Diazolidinyl urea)	37
4.4.2 Imidazolidinyl urea (INCI: Imidazolidinyl urea)	37
4.4.3 DMDM Hydantoin (INCI: DMDM hydantoin)	38
4.4.4 Bronopol (INCI: 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol).....	38
5 MONOACYLGLYCEROLY	40
5.1 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ	40
5.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ	41
5.2.1 Antimikrobiální působení na bakterie	43
5.3 KOŽNÍ REAKCE NA ANTIMIKROBIÁLNÍ PŘÍSADY	44
6 CÍLE PRÁCE	47
II PRAKTICKÁ ČÁST	48
7 MATERIÁL A METODY	49
7.1 MATERIÁL.....	49
7.1.1 Mikroorganismy.....	49
7.1.2 Kultivační média	49

7.1.3	Ředící roztok	50
7.1.4	Antimikrobní látky	50
7.1.5	Pleťová voda	51
7.1.6	Laboratorní sklo a plasty	52
7.1.7	Dekontaminace použitého materiálu	52
7.1.8	Přístroje a vybavení	52
7.2	METODY	53
7.2.1	Příprava inokula	53
7.2.2	Zátěžový test účinnosti konzervace	53
7.2.3	Měření optické denzity (OD)	55
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
8.1	VLIV VYBRANÝCH MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST BAKTERIÍ	57
8.1.1	Vliv monoacylglycerolů na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	57
8.1.2	Vliv monoacylglycerolů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	61
8.1.3	Vliv monoacylglycerolů na růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	63
8.2	VLIV VYBRANÝCH PARABENŮ NA RŮST BAKTERIÍ	64
8.2.1	Vliv parabenů na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	65
8.2.2	Vliv parabenů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	66
8.2.3	Vliv parabenů na růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	67
8.3	CITLIVOST VYBRANÝCH BAKTERIÍ NA JEDNOTLIVÉ ANTIMIKROBNÍ LÁTKY	68
8.4	DOPLNĚKOVÉ STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY MAG A PARABENŮ	70
8.4.1	Antimikrobní aktivita monoacylglycerolů	70
8.4.2	Antimikrobní aktivita parabenů	72
8.5	ZHODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ OCHRANY	74
	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	80
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	90
	SEZNAM OBRÁZKŮ	92
	SEZNAM TABULEK	93
	SEZNAM PŘÍLOH	94

ÚVOD

Problematika konzervování kosmetických prostředků je v popředí zájmu mnoha kosmetických firem, průmyslu i vědy. Prvotním požadavkem na kosmetické výrobky je bezpochyby zdravotní nezávadnost a stabilita. Hlavním úkolem je tedy nalézt co nejvhodnější formu ochrany. Konzervace kosmetických prostředků má za cíl zejména snahu potlačit růst a množení nežádoucí mikroflóry, která by představovala určité riziko ohrožení spotřebitele. V kosmetických přípravcích tvoří konzervační látky jednu z nejkontroverznějších přísad. Tyto látky jsou příčinnou většiny nežádoucích projevů na kůži, vzniklých po aplikaci kosmetického přípravku. Z tohoto důvodu jsou neustále hledány nové látky, které by dostatečně chránily výrobek před mikrobiální aktivitou, a zároveň neiritovali pokožku. Veškeré antimikrobiální přísady musí splňovat celou řadu požadavků, které jsou na ně kladeny a najít látku, která by všem těmto požadavkům vyhovovala je tak prakticky nemožné.

Převratným objevem v hledání ideálních antimikrobních látek bylo prokázání inhibičních účinků monoacylglycerolů na některé bakterie, které jsou častými kontaminanty kosmetiky. Monoacylglyceroly jsou organismem dobře snášeny, protože se jedná o látky přirozeně se vyskytující v lidském organismu jakožto meziprodukt metabolismu tuků. Výhodou použití monoacylglycerolů v kosmetických přípravcích mohou být i jejich emulgační vlastnosti, a tím podpora stability emulzních systémů.

Převážná část práce je zaměřena právě na studii účinků monoacylglycerolů jako antimikrobních přísad v pleťové vodě. Vybrány byly monoacylglyceroly lišící se typem a charakterem navázané mastné kyseliny. Pro srovnání byl stejný test prováděn i na dvou zástupcích nejběžněji se používající skupiny konzervačních látek, a to alkylesterech kyseliny para-hydroxybenzoové. Cílem experimentu bylo vyhodnocení antimikrobních účinků jednotlivých monoacylglycerolů a parabenů na vybrané zástupce grampozitivních a gramnegativních bakterií v modelovém vzorku pleťové vody. Záměrem bylo také zhodnocení antimikrobiální ochrany pleťových vod a zjištění, zda mohou být parabeny nahrazeny monoacylglyceroly jakožto šetrnější antimikrobní přísadou.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Kosmetickým přípravkem dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem je čistit, parfemovat, měnit jejich vzhled, chránit je, udržovat v dobrém stavu nebo upravovat tělesné pachy. [1] Jedná se o směsi nejrůznějších látek přírodního nebo syntetického původu. Existuje více než deset tisíc druhů surovin používaných k výrobě kosmetických přípravků. Vlastnosti surovin a jejich technologické zpracování přímo ovlivňují konečnou formu výrobku. Kosmetické výrobky jsou disperzní systémy, tedy systémy dvou nebo více látek, z nich část tvoří disperzní prostředí, v kterém jsou dispergovány ostatní látky. Příkladem takových systému jsou roztoky, gely, suspenze, emulze aj. Kosmetické přípravky je možné rozdělit hned z několika hledisek, nejčastěji například dle fyzikální formy přípravku a dle účelu použití. [2, s. 42, 128, 146]

Rozdělení dle účelu použití:

1. Přípravky kosmeticko-hygienické:
 - a) ke koupelím, mytí a čištění: voda, pleťové vody, mýdla
 - b) s dezodoračními, antiperspiračními nebo dezinfekčními účinky, přípravky pro intimní hygienu;
 - c) tělové lotiony, krémy, oleje, pudry;
 - d) ochranné opalovací prostředky.
2. Speciální přípravky k péči o pleť obličeje:
 - a) ochranné;
 - b) regenerační a tonizační (včetně masek).
3. Speciální přípravky k péči o ruce a nehty:
 - a) ochranné;
 - b) regenerační.
4. Přípravky dekorativní kosmetiky:
 - a) určené k vytváření barevných efektů na kůži a nehtech, ke krytí vzhledových vad;
 - b) přípravky bělicí;
 - c) depilační přípravky a přípravky k holení.
5. Přípravky vlasové kosmetiky.

6. Kolínské vody a parfémy. [2, s. 42]

Vzhledem k zaměření praktické části práce bude blíže popsána kategorie přípravků kosmeticko-hygienických ke koupelím, mytí a čištění, konkrétně pak pleťové vody.

1.1 Přípravky k čištění pleti

U přípravků určených k čištění je nejdůležitější funkcí míra čistícího účinku. Lidská pokožka, především pleť obličeje je denně vystavena negativním vlivům prostředí. Usazuje se na ní prach, saze, kyselé plyny a výfukové zplodiny. Kůže sama se podílí na udržování tělesné čistoty procesem tzv. samočištění. Je pokryta hydrolipidovým filmem, který je tvořen produkty mazových a potních žláz, i olupujícími a rozpadajícími se buňkami *stratum corneum*. Tento film poskytuje určitou míru izolace, chrání pokožku před nadbytečným úbytkem vody, částečně před ultrafialovým zářením a v neposlední řadě vytváří přirozenou obranu proti patogenním mikroorganismům. Dále také přitahuje a zadržuje nečistoty a škodliviny z životního prostředí. Zachycené nečistoty jsou v kožním filmu soustřeďovány a následně dochází k mikrobiálnímu rozkladu jejich organických složek, posléze se ulpělé nečistoty odloučí současně s nejsvrchnější vrstvou pokožky. Tento proces čištění je však nepostačující a použitím pouhé vody nelze dosáhnout požadovaného výsledku, protože voda má omezenou schopnost rozpouštět a odstraňovat lipoidní složky. Z tohoto důvodu jsou do přípravků přidávány povrchově aktivní látky. Tyto snižují povrchové napětí mezi pokožkou a ochranným kožním filmem s nečistotami, ten se uvolní, převede do emulze nebo pěny, která se poté odstraní vodou. Další žádoucí vlastností je také maximální šetrnost ke kůži vyjádřená mírou odmaštění, alkalizace, iritace apod. [2, s. 45], [3, s. 35–36], [4, s. 11]

Mezi přípravky k čištění pleti se řadí i pleťové vody, jež lze zařadit mezi přípravky na vodném základě. Pleťové vody jsou klasifikovány jako emulze. Existuje několik typů emulzí, které slouží jako vehikulum kosmetických či farmaceutických prostředků. Pleťové vody představují emulze prvního typu, tedy olej ve vodě (o/v). Obecné složení pro emulze typu o/v je uvedeno v tabulce 1. Podle složení se pleťové vody dělí na pleťové vody bez alkoholu a pleťové vody s alkoholem. Pleťové vody bez alkoholu jsou vodné roztoky extraktů z léčivých rostlin a vodné roztoky vonných silic. Kromě čistícího účinku mají i hydratační a zklidňující účinky a jsou vhodné zejména pro suchou a citlivou pleť. Pleťové vody s alkoholem obsahují většinou do 20 % alkoholu, s vyšším obsahem se vykytují jen zřídka. Kromě čistícího účinku mají tyto vody i účinky dezinfekční a adstringentní. Vhod-

né jsou pro mastnou a smíšenou pleť. S obsahem alkoholu se zlepšuje smáčivost a tím i čistící účinek. [4, s. 11 – 13], [5, s. 71]

Tab. 1. Obecné složení emulzí typu o/v [5, s. 72]

Složky		Obsah [%]
Vodná fáze	Deionizovaná voda	60,00 – 90,00
	Humektanty	2,00 – 7,00
	Konzervační látky	0,05 – 0,50
	Emulgátor	0,25 – 2,50
	Zahušřovadla	0,10 – 1,00
	Emolienty	0,50 – 2,00
	Chelatační činidla	0,05 – 0,20
Olejová fáze	Oleje, silikony, estery atd.	3,00 – 15,00
	Emulgátor	2,00 – 5,00
	Aktivní látky	dle nařízení
	Antioxidanty	0,05 – 0,50
	Parfém/esenciální oleje	0,10 – 2,00
	Barviva	dle potřeby
	Konzervační látky	0,05 – 1,00
	Regulátory pH	dle potřeby

Nejdůležitější složkou emulzí jsou emulgátory, které slouží v kosmetických kompozicích ke smísení nemísitelných fází a dosažení vyšší stability. Ačkoliv jsou všechny emulze nestabilní a po čase se systém opět rozdělí na výchozí počet fází, výběr správného emulgátoru může zajistit potřebnou dobu zachování stability systému. Významným požadavkem pro emulgátory v kosmetických kompozicích je, aby se příliš pevně nevázaly na pokožku, nýbrž aby je bylo možno z ošetřovaného povrchu snadno uvolnit. Další složkou jsou emolien-

ty neboli zvláčňující látky a humektanty neboli zvlhčující látky. Emolienty zvláčňují pokožku a mají vliv na aplikaci a transport aktivních látek do kůže. Humektanty, obvykle glykoly nebo polyoly, mají schopnost snižovat rychlost evaporace vody. Zahušťující látky slouží k úpravě viskozity emulze a mohou také podpořit stabilitu emulze, zejména při vyšších teplotách. Velmi významnou složkou kosmetických přípravků jsou také konzervační látky, které zabraňují nežádoucím chemickým přeměnám nebo rozkladu složek v důsledku mikroorganismů. [5, s. 72, 73], [6, s. 25, 27], [7, s. 82, 83]; Konzervaci kosmetických přípravků a konzervačním látkám bude věnována kapitola 3 a 4.

1.2 Kontaminace kosmetických přípravků

Kosmetické přípravky by měly být za běžných podmínek používání bezpečné. Zejména by za žádných okolností neměly představovat riziko pro lidské zdraví. Aby byla zajištěna bezpečnost kosmetických přípravků uváděných na trh, měly by být vyráběny v souladu se správnou výrobní praxí a znalostí bezpečnosti přísad, které obsahují. [1] Kosmetické přípravky jsou regulovány a kontrolovány po celém světě. V České republice provádí dozor nad kosmetickými přípravky orgány ochrany veřejného zdraví. Na regulaci kosmetických prostředků se vztahuje § 25 - § 29 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích [1], [8].

Kosmetické přípravky (KP) stejně jako mnohé jiné výrobky mohou podléhat riziku mikrobiální kontaminace. Přítomnost mikroorganismů v KP je nežádoucí, a pokud se začnou v konečném výrobku množit, může se projevit několika způsoby:

- změna organoleptických vlastností – zákal, zápach, změna barvy
- změna konzistence – v případě, kdy mikroorganismy napadnou emulgující látku, mohou emulzní přípravky ztratit stabilitu a změni se jejich fyzikálně-chemické vlastnosti
- změna struktury a ztráta aktivity účinných látek

Kromě výše uvedených změn existuje také nebezpečí podráždění pokožky, vzniku infekce a potenciální ohrožení zdraví spotřebitele. [2, s. 166,169], [9 s. 164], [10, s. 73], [11, s. 14] Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA–Food and Drug Administration) nevyžaduje, aby byla kosmetika sterilní, ale vyžaduje, aby se v ní nevyskytovaly patogenní mikroorganiz-

my. Příkladem patogenních mikroorganismů nežádoucích v KP může být *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Ostatní mikroorganismy mohou být přítomny do určitého množství. Pro účely specifikace mikrobiální kontaminace se kosmetické prostředky rozdělují do dvou kategorií. Do první kategorie spadají výrobky speciálně určené pro děti do 3 let a výrobky používané v oblasti očí a na sliznicích. Do druhé kategorie se pak řadí všechny ostatní výrobky. Pro prostředky z první kategorie by neměl celkový počet mikroorganismů překročit 100 kolonie tvořících jednotek (KTJ)/g v 0,5 g produktu, patogenní organizmy nesmí být detekovány. U výrobků z druhé kategorie nesmí celkový počet mikroorganismů přesáhnout 1000 KTJ/g v 0,1 g výrobku a patogeny uvedené výše nesmí být detekovány vůbec. [10, s. 73], [12, s. 588]

I když se při výrobě kosmetiky dbá na to, aby byla kontaminace výrobku v průběhu jeho výroby, co nejméně pravděpodobná, doporučuje se přesto do kompozice výrobku zabudovat antimikrobní látky, potlačující rozmnožení eventuelně přítomných mikroorganismů. Před uvedením kosmetického výrobku do oběhu by měly být výrobcem prováděny jeho pravidelné mikrobiologické kontroly. Tyto mikrobiologické kontroly lze rozdělit do tří kategorií:

- kontrola mikrobiální kvality čerstvě vyrobeného kosmetického přípravku
- kontrola mikrobiální odolnosti výrobku – zjišťování odolnosti kosmetického výrobku vystaveného působení mikrobů
- kontrola vlivu skladování a používání na mikrobiální kvalitu výrobku

Obecně lze rozdělit mikrobiální kontaminaci na primární a sekundární. [6, s. 44], [7, s. 81], [10, s. 73]

1.2.1 Primární kontaminace

Primární kontaminace vzniká během pracovního procesu, kde mohou být zdrojem suroviny, některé výrobní operace a zařízení, či personál. Častým zdrojem je voda, kterou lze považovat za základní a nejdůležitější složku kosmetických přípravků. Dále také přírodní nebo syntetické gemy, cukry, oleje, vosky, tuky, deriváty mastných kyselin, extrakty rostlinného nebo živočišného původu, některé suroviny anorganického původu (některé pigmenty, kaolin...). Vyšší pozornost vyžaduje kolagen, elastin, želatina, syrovátka, aktivní látky na bázi peptidů. Obsah některých surovin může snižovat účinek konzervačních látek. [6, s. 43], [10, s. 73–74], [11, s. 13–15]

Možnost jak této kontaminaci předcházet spočívá zejména v dodržování podmínek správné výrobní praxe neboli GMP „good manufacturing practice“. K podmínkám GMP patří výroba kosmetiky nebo léčiv za přísně aseptických podmínek, zabudování vodních a prachových filtrů, pravidelné mikrobiální kontroly a správná technologie přepravy a skladování surovin i výrobků, dezinfekce technologických zařízení, dostatečně proškolený a oděný personál. Všechny tyto aspekty pomáhají výrazně snížit nebezpečí kontaminace. Obzvláště vliv vlhkosti, respektive význam biologicky suchého prostředí je pro zachování mikrobiologické nezávadnosti surovin velmi důležitý. [9, s. 165], [11, s. 13–15] Voda používaná pro výrobu kosmetických přípravků by neměla obsahovat žádné rozpuštěné látky a jen nepatrné množství bakterií. Existují tři způsoby jak takovou vodu připravit, a to destilací, demineralizací, nebo reverzní osmózou. [2, s. 169], [10, s. 73–74]

1.2.2 Sekundární kontaminace

Přestože jsou dodrženy všechny aspekty GMP a výrobek není primárně kontaminován, může se u něj objevit tzv. kontaminace sekundární. K sekundární kontaminaci dochází v důsledku používání prostředku spotřebitelem. [6, s. 43], [10, s. 73–74] Zdrojem takové kontaminace bývá nejčastěji sám spotřebitel, který do výrobku může vnášet mikroorganismy přítomné na ruce, či jiné části těla, která přichází do styku s KP. Dále k ní dochází v důsledku nevhodného zacházení s výrobkem a nedodržení skladovacích podmínek. Mikrobiální růst obvykle nastane v kosmetice a toaletních potřebách uchovávaných v koupelně a vystavených teplu a vlhkosti. [13, s. 112-113] Opakované používání výrobku, nebo sdílení s více uživateli znamená zvýšení expozice nejen mikrobům, ale mnoha dalším znečišťujícím látkám. Prevencí vzniku sekundární kontaminace je dodržování obecných zásad, jako správné skladování, nesdílení kosmetiky s jinými uživateli, používání příslušných aplikátorů, nepoužívání již kontaminovaných kosmetických přípravků. Existují také doporučení týkající se pravidelné výměny kosmetických přípravků. Například, aby se předešlo infekci v očním okolí v důsledku mikrobiální kontaminace z řasenek, je vhodné měnit tyto výrobky po 6 měsících užívání pro uživatele, kteří nejsou nositeli kontaktních čoček a každé 3–4 měsíce pro nositele kontaktních čoček. [12, s. 589]

2 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

Mikroorganismy hrají důležitou roli v biologickém znehodnocení kosmetických přípravků a představují určité riziko pro spotřebitele. Vzhledem k tomu, že kosmetické přípravky jsou aplikovány na lidskou kůži, musí se dbát na prevenci kontaminace těchto přípravků mikroorganismy. V současné době je mikrobiální kontaminaci kosmetiky věnována velká pozornost. Legislativní opatření a zavedení principů GMP zvyšuje bezpečnost kosmetických produktů, nicméně kontaminované produkty se stále vyskytují. V takovém případě, kdy se prokáže kontaminace výrobku, nebo existuje důvodné podezření, že výrobek nemusí být bezpečný, musí být okamžitě přijata nápravná opatření, popřípadě je tento výrobek stažen z trhu nebo z oběhu. Dále musí odpovědná osoba neprodleně informovat příslušné vnitrostátní orgány členských států a uveďte podrobnosti zejména o nesouladu a o přijatých nápravných opatřeních. [1], [10, s. 310], [13, s. 113], [14, s. 310], [15, s. 157]

Mezi mikroorganismy kontaminující kosmetiku patří bakterie, plísňe a kvasinky. Největší hrozbou je přítomnost patogenů, jenž mohou potencionálně ohrozit zdraví spotřebitele. Přítomnost nepatogenních mikroorganismů však může za vhodných podmínek rovněž představovat nebezpečí. Například může dojít k invazi nepatogenních mikroorganismů, pokud je přípravek aplikován na poraněnou kůži. [13, s. 113], [14, s. 310]

V kosmetických výrobcích byly detekovány následující mikroorganismy:

- Gramnegativní bakterie – rody *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*.
- Grampozitivní bakterie – rody *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.
- Kvasinky – rody *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*.
- Plísňe – rody *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Auerobasidium*, *Citromyces*, *Cladosporium*, *Dematium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Hormodendrum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Trichohecium*, *Verticillium*. [7, s. 81]

Vzhledem k zaměření praktické části diplomové práce je následující kapitola věnována bližší charakteristice bakteriálních kontaminantů kosmetických prostředků, přestože kosmetika může být kontaminována i eukaryotickými mikroorganismy, tedy kvasinkami a plísněmi.

2.1 Bakterie

Bakterie plní významnou roli v ekosystému. Jsou téměř všudypřítomné a hojně se tedy vyskytují i v kosmetických závodech. Bakteriální buňky jsou schopny přizpůsobit se i tomu nejnáročnějšímu prostředí. Jedná se o jednobuněčné mikroorganismy, patřící do skupiny prokaryotických organismů. Optimální teplota růstu bakterií je pro většinu bakterií v rozmezí 25–37°C a optimální pH je neutrální. Strukturou jsou jednodušší než eukaryotní organismy. [13, s. 24], [16, s. 64, 74], [17, s. 13]

Tvar bakterií je buď kulovitý, nebo tyčinkovitý. Tyčinkovité bakterie se vyznačují tvárovou různorodostí s variabilní délkou od drobných tyček (bacily), prohnutých tyčinek (vibria), spirálovitých tyčinek (spirila, spirocheta) až po vláknité útvary (aktinomycety). Na povrchu bakteriální buňky je buněčná stěna, která uděluje bakteriím chemickou odolnost, odolnost proti záření, vyschnutí, proti nepříznivým osmotickým podmínkám atd. Současně vyrovnává poměrně značný osmotický tlak uvnitř buňky. [13, s. 24], [18, s. 12], [19, s. 38], [20, s. 18] Podle složení buněčné stěny se bakterie rozdělují na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní bakterie mají řadu společných fyziologických vlastností, jimiž se odlišují od gramnegativních bakterií (např. citlivost k některým antibiotikům, aniontovým povrchově aktivním látkám a jedovatým barvivům). Bylo zjištěno, že všechny zmíněné vlastnosti jsou odrazem rozdílné struktury buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií. [19, s. 42], [21, s. 32, 33]

2.1.1 Grampozitivní bakterie

Buněčná stěna grampozitivních bakterií (G+) je poměrně jednoduchá. Je tvořena silnou peptidoglykanovou vrstvou, v níž jsou polysacharidové řetězce uloženy v mnoha vrstvách nad sebou a kterými kolmo probíhají řetězce kyseliny teichoové. Stěna G+ bakterií představuje asi 20 nm silný, pevný skelet, který během Gramova barvení uzavře komplex krystalové violeti s jodem natolik pevně, že během odbarvování zůstanou buňky modré. [13, s. 27, 28], [19, s. 42], [21, s. 32, 33]

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány bakterie, které nejčastěji kontaminují kosmetické prostředky.

Rod *Bacillus*

Zástupci rodu *Bacillus* jsou aerobní sporulující grampozitivní tyčky. Jedná se o běžně se vyskytující mikroorganismy v přírodě, obzvláště v půdě. Většina druhů není patogenní

pro lidský organizmus. Výjimku tvoří *Bacillus anthracis*, z části *B. cereus*. Jsou běžně využívány jako producenti antibiotik. V kosmetickém průmyslu běžně kontaminuje listy rostliny *Aloe vera*. Společným znakem rodu je tvorba endospor, ty jsou díky své stavbě odolné k teplu, radiaci a dezinfekčním činidlům. [13, s. 61], [16, s. 277], [17, s. 21, 22]

Bacillus cereus je fakultativně anaerobní grampozitivní tyčinka tvořící endospory. Nejčastěji se vyskytuje v půdě, ve vzduchu a prachu. Některé kmeny jsou pro lidi nebezpečné, neboť vyvolávají alimentární infekce a onemocnění gastrointestinálního traktu. Jiné kmeny mohou být pro změnu prospěšné a u zvířat působí jako probiotika. Může způsobit kožní infekce, které sice nejsou závažné, avšak kůži poškozují, dlouho přetrvávají a obtížně se léčí. Dále může také způsobit keratitidu (zánět rohovky), pokud například kontaminuje produkty kosmetiky určené k použití v oblasti očního okolí. [12, s. 588], [13, s. 61], [17, s. 23, 24]

Rod *Staphylococcus*

Jedná se o grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdřené sférické koky o průměru přibližně 1 μm . Mohou růst jak aerobně tak i anaerobně. Z hlediska patogenity je pro člověka významný *S. aureus* jako koaguláza-pozitivní druh, *S. epidermis* a *S. saprophyticus* jako koaguláza-negativní druhy. Rod *Staphylococcus* je do jisté míry rezistentní k nepříznivým vlivům okolí. Stafylokoky dovedou odolávat záhřevu na 55 °C po dobu 30 minut, vysychání a vyšším koncentracím NaCl, což zřejmě umožňuje přechodné nebo i rezidentní osídlení určitých kožních oblastí některými druhy. Ty mohou způsobovat například zánětlivé kožní onemocnění impetigo, záněty spojivek. Projevem infekce je tvorba hnisu. Přítomnost tohoto rodu bakterií je téměř vždy důsledkem sekundární kontaminace. [13, s. 60], [16, s. 192, 193]

Staphylococcus aureus se řadí mezi biochemicky nejaktivnější bakterie. Jde o grampozitivní kulovitou bakterii, dobře adaptovanou na kolonizaci kůže a sliznic. Je nejčastějším původcem pyogenních infekcí nebo intoxikací člověka a zvířat společně s rodem *Streptococcus*. Na základě své pigmentace je také nazýván jako zlatý stafylokok. *S. aureus* je patogenní pro lidský organizmus, zejména kvůli produkci různých enzymů např.: koagulázy, hyaluronidázy aj. V lidském organismu může vyvolávat onemocnění od málo závažných kožních onemocnění, až po vysoce závažné život ohrožující infekce. Nejčastějšími projevy na kůži jsou pupínky, ale i závažnější příznaky, jako impetigo, abscesy apod. Vznik infekcí je mnohonásobně usnadněn, pokud je kůže nebo sliznice poraněná, či nějakým způsobem

narušená. Infekce ovšem mohou vznikat i na neporušené tkáni, a to působením hyaluronidázy, produkované právě stafylokokem. Mezi život ohrožující onemocnění vyvolané stafylokokem se řadí meningitida, pneumonie, syndrom toxického šoku, osteomyelitida, endokarditida, bakteriémie a septikémie. Dále je původcem některých průjmových onemocnění. Ne vždy však musí znamenat přítomnost stafylokoků na kůži, v nose či hrdle infekční onemocnění. V případě invaze stafylokoků do hlubších tkání roste závažnost infekce. Na pevných půdách roste ve žlutě zbarvených koloniích. K léčbě stafylokokových infekcí je běžně používán penicilin. [13, s. 60], [17, s. 90–92]

Staphylococcus epidermis jsou grampozitivní, nepohyblivý, fakultativně anaerobní kok. Je nejčastější složkou kožní mikroflóry, z které rovněž přechází na sliznice a běžně se vyskytuje také u zvířat. *S. epidermis* se řadí mezi nepatogenní mikroorganismy, avšak nebezpečí pro imunokompromitované osoby. Infekce mohou být komunitní i nozokomiální. V případě hospitalizovaných pacientů mohou být velmi závažné, jelikož v nemocnicích se vyskytují virulentnější kmeny, které se staly důsledkem časté dezinfekce a používání antimikrobik rezistentními. Nejvýznamnějším zdrojem infekce v nemocničním prostředí jsou intravenózní katétry a různé implantáty. *S. epidermis* na nich může vytvářet biofilmy. Tvorba biofilmu znesnadňuje působení antibiotik. [17, s. 92, 93]

Rod *Streptococcus*

Bakterie rodu *Streptococcus* jsou grampozitivní kataláza-negativní koky uspořádané do dvojic a řetízků. Většina jsou fakultativně anaerobní organismy. Řadí se mezi patogenní mikroorganismy. Nejčastěji se vyskytují ve floře dutiny ústní, horních cest dýchacích, vaginální sliznice. Bakterie rodu *Streptococcus* bývají izolovány z kosmetických prostředků. Jejich přítomnost často zapříčiňuje nedodržení principů správné výrobní praxe. [13, s. 60], [16, s. 204, 205], [17, s. 92, 93]

2.1.2 Gramnegativní bakterie

Buněčná stěna gramnegativních bakterií (G-) má daleko složitější stavbu než stěna grampozitivní. Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu (10 nm) uložené pod zevní membránou. Zevní membrána obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a strukturní i enzymové proteiny. Mezi vnější membránou a peptidoglykanovou vrstvou existuje tzv. periplazmatický prostor. Zevní membrána gramnegativních bakterií brání prostupu molekul, které snadno prostupují buněčnou stěnou grampozitivních bakterií. Jedná se například o některá barviva (krystalová violet), antibiotika, soli žlučových kyselin. Obsah lipidů ve stěně gramnegativ-

ních bakterií je příčinou jejich vyšší odolnosti vůči působení aniontových povrchově aktivních látek. Složení zevní membrány je mimo jiné příčinou vyšší odolnosti gramnegativních bakterií vůči působení některých antimikrobiálních látek. [13, s. 29], [16, s. 52–54], [19, s. 42, 43], [21, s. 33, 34]

Rod *Pseudomonas*

Tento rod gramnegativních aerobních bakterií má tvar rovných nebo mírně zahnutých tyčinek. Jsou pohyblivé, metabolicky nenáročné. Snadno se množí v odpadních vodách, nesterilních infuzích. Jejich nejzajímavější vlastností je schopnost rozkládat složité matrice včetně biocidů, uhlovodíkové struktury a dokonce chlorované pesticidy. Výskyt tohoto rodu bakterií v kosmetických závodech bývá často způsoben nedostatečnou kontrolou vodních systémů a špatně prováděnou dezinfekcí, jenž má za následek tvorbu biofilmů na příslušných zařízeních. [13, s. 57, [16, s. 246]

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní aerobní tyčinka, běžně se nalézající ve vodě, v půdě, na lidské kůži, ve stolici domácích zvířat i lidí. *P. aeruginosa* je patogenní mikroorganismus. Typickou vlastností je přizpůsobivost okolnímu prostředí, například v atmosféře se sníženým obsahem kyslíku. Díky tomu může infikovat poškozené tkáně lidí, zvířat, ale také osoby se sníženou imunitou. Často bývá příčinou nemocničních nákaz, protože kontaminuje nemocniční přístroje, katétrů apod. Proteolytické enzymy produkované touto bakterií ohrožují poraněné oko, což je důležité zvláště v případě kontaminace prostředků určených k použití v oblasti oka. Infekce může pak v nejhorším případě končit až slepotou či ztrátou oka. Na půdě roste ve formě kovově lesklých kolonií. Kultury vykazují charakteristický zápach po trimethylaminu. Optimální teplota pro kultivaci se pohybuje v rozmezí 30–37 °C, roste ovšem i při pokojové teplotě. [13, s. 57], [16, s. 246], [17, s. 84, 85]

Rod *Escherichia*

Bakterie rodu *Escherichia* se běžně vyskytují v tlustém střevě lidí i zvířat. Dostávají se také do vody, kde je jejich výskyt indikátorem fekálního znečištění. Vyvolávají dva typy infekcí, extraintestinální (močových cest, infekce ran, hnisavé procesy) a intestinální (infekce provázené průjmy). [13, s. 59], [16, s. 264]

Escherichia coli je pyogenní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie. Je obvyklým komenzálem dolního zažívacího traktu teplokrevných organismů. V anaerobním prostředí používá různých mechanismů fermentace za současné produkce laktátu, jantaranu, octanu,

etanolu a oxidu uhličitého. Často bývá původcem průjmových onemocnění, infekcí močových cest, gastroenteritidy. [13, s. 59], [16, s. 264], [17, s. 47–51]

Rod *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* se řadí mezi lidské patogeny. Jsou to nepohyblivé gramnegativní tyčky. Lze je najít v půdě, ve vodě, ale také v dýchacích cestách a zažívacím traktu. Hlavním druhem je *Klebsiella pneumoniae* způsobující těžký zápal plic u fyzicky oslabených jedinců. Běžně se bakterie rodu *Klebsiella* nacházejí v domácnostech, tudíž mohou kontaminovat kosmetiku při jejím použití v domácnosti. [13, s. 59], [16, s. 265], [17, s. 65]

Rod *Serratia*

Jedná se o pohyblivé gramnegativní tyčky, vyskytující se v půdě a ve vodě. Obvykle nejsou považovány za lidské patogeny, protože jen vzácně vyvolávají infekce. Bakterie rodu *Serratia* rostou v širokém rozmezí teplot 5 až 40°C a v rozmezí pH 5 až 9. Bylo zjištěno, že mohou kontaminovat dezinfekční a povrchově aktivní látky. Pokud je jejich přítomnost detekována v kosmetickém výrobním závodě, většinou svědčí o méně časté, nebo nevyhovující sanitaci. [13, s. 57], [16, s. 266]

S. marcescens se přednostně nachází ve vlhkém prostředí, tedy často ji lze detekovat v koupelnách, v rozích sprchových koutů, ve spárách dlaždic nebo bazénech. Živí se látkami, které obsahují fosfor a mastné kyseliny. Takovými látkami jsou zbytky mýdla a šampónů. Její přítomnost se projevuje růžově zbarveným slizovitým povlakem. Prevencí je důkladné mytí a sušení povrchů po každém použití. Může vyvolat močové infekce, infekce ran, respiračního traktu nebo očí. [13, s. 57], [16, s. 266], [17, s. 88–89]

Rod *Enterobacter*

Bakterie tohoto rodu jsou gramnegativní pohyblivé tyčky vyskytující se v půdě, ve vodě, někdy v zažívacím traktu. Nepovažují se za lidské patogeny, pokud nejsou zavedeny přímo do krevního řečiště. Kontaminují povrchově aktivní látky a látky používané v domácnostech. Mezi hlavní druhy kontaminující kosmetické přípravky patří *Enterobacter agglomerans*, *E. gergoviae* a *E. cloacae*. [13, s. 59], [16, s. 266]

2.2 Rezistence mikroorganismů

Rezistence znamená schopnost mikroorganismů odolávat účinku nepříznivých vlivů prostředí, jakož i rozmnožovat se v přítomnosti určité koncentrace antimikrobiální látky. Může být buďto přirozenou, nebo během života získanou vlastností mikroba. Přirozená neboli genetická rezistence může být kódována na plasmidech, které mohou nést geny produkující enzymy inaktivující nebo rozbíjející antimikrobiální látky. Dále může být kódována v chromozomech, kde je výsledkem mutací v genu, který řídí citlivost k antimikrobiálním látkám. Protože jsou mikroorganismy početná a heterogenní skupina, disponují rozdílnou citlivostí na antimikrobiální látky. K nejodolnějším se řadí mikroorganismy schopné tvořit spory nebo cysty. Rezistenci je vždy potřeba vztahovat na použitou koncentraci antimikrobiální látky. [11, s. 25–27], [18, s. 14], [22, s. 34], [23, s. 100,101]

Borovian [24] ve své studii prokázal, že kmen *Pseudomonas cepacia* byl schopen růstu nejen v produktech s nízkým pH, ale také odolával působení dvou chemicky příbuzných konzervačních látek, kyselině benzoové a formaldehydu. Pokud se prokáže rezistence, s největší pravděpodobností nebylo dosaženo minimální baktericidní popřípadě inhibiční koncentrace. V praxi to znamená, že je vhodné používat antimikrobiální látky v koncentracích převyšující MBC/MIC 2–8 násobně. V některých případech, kdy je zjištěna rezistence na použité konzervační látky, se musí přepracovat celý konzervační systém výrobku. [11, s. 25–27], [18; s. 14], [22; s. 34], [23; s. 100,101]

3 KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ

Kosmetické přípravky musí být chráněny proti nežádoucímu růstu mikroorganismů. Ochranou proti mikrobiální kontaminaci se zároveň zajistí i stabilita daného výrobku. Vzhledem k přirozenému mikrobiálnímu osídlení lidské kůže nemusí být kosmetický přípravek nutně sterilní, avšak musí vykazovat určitou mikrobiální čistotu a musí být mikrobiálně nezávadný. [25, s. 18], [26, s. 144], [27, s. 53], [28, s. 1]

Mikrobiologickou nezávadnost a vyhovující vlastnosti si musí kosmetický výrobek zachovat i po celou dobu užití spotřebitelem. Doba, po kterou si výrobek tyto vlastnosti zachová, se nazývá doba minimální trvanlivosti a je stanovena výrobcem. V případě, že daný výrobek má trvanlivost kratší než 30 měsíců, má výrobce povinnost uvést datum minimální trvanlivosti na obale. Datum minimální trvanlivosti musí být zřetelně uvedeno a musí obsahovat den, měsíc a rok, nebo pouze měsíc a rok, v uvedeném pořadí. Dle potřeby bývá doplněno údajem o podmínkách správného skladování, užívání a dalších, které by měli být dodržovány, aby byla zaručena uvedená doba trvanlivosti výrobku. Je-li minimální trvanlivost delší než 30 měsíců, měl by být spotřebitel informován, po jakou dobu může kosmetický přípravek bezpečně používat po otevření. Tato informace je na obalu vyznačena formou symbolu otevřeného kelímku a údajem o době použití v měsících nebo rocích. [1, s. 62, 73]

Celková antimikrobiální ochrana zahrnuje konzervaci přípravku, specifický výrobní proces a ochranné balení. Konzervaci kosmetického přípravku se dle normy ČSN EN ISO 11930 rozumí soubor prostředků použitých k zabránění mikrobiálního množení v kosmetickém přípravku. Souborem prostředků pak mohou být konzervační přísady, suroviny s nepříznivým vlivem na mikroorganismy, multifunkční sloučeniny, extrémní pH a nízké hodnoty aktivity vody. [29, s. 8], [30, s. 211], [31] Konzervační přísadou je látka, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku za daných podmínek použití. [1, s. 65], [30, s. 211] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 uvádí seznam všech povolených konzervačních látek a jejich nejvyšších přípustných koncentrací v konečném výrobku v příloze V. Dále uvádí, že kosmetické přípravky nesmějí obsahovat konzervační přísady, které nejsou uvedeny v příloze V tohoto nařízení, ani konzervační přísady v ní uvedené, avšak použité v rozporu s podmínkami v ní stanovenými. Dále nesmějí obsahovat látky uvedené v této příloze, avšak neurčené pro použití jako konzervační přísady. [1, s. 69] Současní výrobci kosmetických přípravků mají

na výběr z nepřehledného množství konzervačních látek. Kompozice kosmetických přípravků obsahují celou škálu přírodních i syntetických ingrediencí, jejichž počet se neustále zvyšuje. Mnohé z těchto ingrediencí poskytují optimální podmínky pro růst mikroorganismů, jako je například obsah vody, nebo významný obsah uhlovodíků, jako potenciální zdroj potravy pro mikrobiální flóru. Proto se konzervační přísady staly naprosto nezbytnou a nedílnou součástí složení kosmetických výrobků. Příkladem formulací nejvhodnějších pro růst mikroorganismů jsou roztoky, emulzní systémy a gely. [32, s. 143], [25, s. 18], [26, s. 143], [33], [34], [35, s. 1]

3.1 Faktory ovlivňující výběr konzervačního systému

Zajištění účinné ochrany kosmetického přípravku je velmi složitý proces a nestačí pouze přidání jedné nebo více konzervačních látek. Aby byla konzervace úspěšná, musí být vzaty v úvahu všechny aspekty vývoje kosmetického prostředku od konceptu a návrhu, přes výrobu, distribuci až po spotřebitelské využití. Účinnost a stabilitu konzervačního systému přímo ovlivňuje řada fyzikálních a chemických vlastností kosmetických přípravků. Volba vhodného konzervačního systému tak závisí nejen na formulaci a základu výrobku, ale také na pH a kompatibilitě s ostatními složkami výrobku. Tyto faktory mohou znamenat příčinu snížení účinnosti konzervačního systému. Zároveň však znalost těchto faktorů umožňuje usnadnit proces konzervace. [13, s. 163 – 167], [26, s. 143], [36, s. 5]

Růst mikroorganismů je silně ovlivněn koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Naproti tomu kvasinky vyžadují pro růst kyselé prostředí a jejich optimální pH růstu se pohybuje mezi 4,2 – 5,5. Optimální pH růstu plísní se pohybuje okolo neutrálního bodu, ale mohou se rozmnožovat v širokém rozmezí pH, a to 1,2 až 11,0. [21, s. 173, 174] Optimální pH kosmetického přípravku by se mělo pohybovat v oblasti pH kožního povrchu, který je krytý ochranným filmem a vykazuje slabě kyselou reakci v rozmezí hodnot pH 5,0 – 6,0, aby pleť nebyla zatěžována nutností vyrovnávat odchylky od přirozené hodnoty pH. [2, s. 118] Existují kosmetické přípravky s kyselým nebo alkalickým pH. Přípravky s kyselým pH mají rozmezí hodnot pH 3,0 – 5,0 a takovými mohou být například pleťové vody s obsahem kyseliny. Přípravky disponující alkalickým pH v rozmezí hodnot 10,0 – 14,0 jsou kupříkladu depilační krémy. [37, s. 69] Jak už bylo řečeno, hodnota pH ovlivňuje výběr konzervační látky, její účinnost a stabilitu. Některé látky působí především v neionizované formě, například organické kyseliny, které jsou účinné v kyselém pH. [11, s. 28] [37, s. 70]

Uvádí se účinnost těchto kyselin pouze v produktech s pH pod 5. Organické kyseliny tedy ztrácí aktivitu v neutrálních a alkalických přípravcích. [26, s. 168], [11, s. 28] Naopak kvartérní amoniové báze jsou účinné v ionizované formě, a tedy nemají efekt při nízkém pH. Jsou účinné v neutrálních a slabě alkalických přípravcích. [11, s. 28] [37, s. 70]

Dalším obecným faktorem ovlivňující konzervaci je aktivita vody. Veškeré reakce probíhající v živé buňce mohou probíhat jen za předpokladu přítomnosti dostatečného množství vody. Většina bakterií se rozmnožuje při hodnotách aktivity vody 0,99 až 0,93. Některé bakterie jsou ale schopny se rozmnožovat i při nižších hodnotách (0,65 až 0,63), které převládají při vysokých koncentracích (20 až 30 %) chloridu sodného. Gramnegativní bakterie zejména rodu *Pseudomonas* nejsou schopny rozmnožování v kosmetických výrobcích při vodní aktivitě nižší než 0,90. Grampozitivní bakterie, například rodu *Staphylococcus* jsou inhibovány při hodnotách vodní aktivity nižší než 0,80. Kvasinky potřebují pro rozmnožování aktivitu vody v rozmezí 0,91 až 0,88 a plísně mají obvykle schopnost se rozmnožovat při nižších hodnotách než bakterie i kvasinky, výjimku tvoří tzv. vodní plísně (vyžadují vyšší hodnoty a_w) a osmofilní schopné se rozmnožovat již při a_w 0,60. [13, s. 168] [21, s. 175, 176] Kosmetické přípravky s vyšší aktivitou vody tvoří ideální prostředí pro rozmnožování mikroorganismů. Mezi takovéto přípravky se řadí, pleťové vody, krémy, šampóny apod. Na druhé straně jsou kosmetické prostředky s nízkou aktivitou vody, tedy s menší pravděpodobností kontaminace mikroorganismy, mezi které patří například pudry, rtěnky. [37, s. 68]

Neméně důležitým faktorem při výběru konzervační látky je také její rozpustnost. Jelikož se mikroorganismy množí pouze ve vodné fázi emulzních přípravků, nebo se shromažďují na fázovém rozhraní emulze, je kladen důraz na to, aby použitá konzervační látka byla rozpustná ve vodě, respektive se nacházela ve vyšší koncentraci právě ve vodné fázi přípravku. Některé látky lze přidat přímo do vodné fáze (imidazolidinyl močovina, diazolidinyl močovina apod.) jiné (chlorfenesin, dichlorbezyalkohol, parabeny) musejí být před přidáním rozpuštěny v rozpouštědle s vodou mísitelným (etanol, propylenglykol, glycerin), nebo rozpuštěny v přehřáté vodě. Konzervační látky rozpustné ve vodě i v oleji mají tendenci se rozdělit do olejové i vodné fáze v určitém poměru (tzv. rozdělovací koeficient). Některé suroviny obsažené v kosmetických přípravcích, jako například neionické povrchově aktivní látky nebo emulgátory, zvyšují rozdělovací koeficient, stejně jako zvýšení teploty. Zvýšením rozdělovacího koeficientu dochází ke snížení koncentrace konzervační látky ve vodné fázi a tak poklesu účinku konzervační látky. Vzhledem ke snížené antimikrobiál-

ní aktivitě v olejové fázi se záměrně zvyšuje koncentrace konzervační látky ve vodné fázi nebo se omezuje její rozpustnost v olejové fázi. Zvýšením koncentrace konzervantu ve vodné fázi dojde k poklesu rozdělovacího koeficientu [37, s. 71 – 72].

Existují látky zvyšující účinek konzervantů. Takovými látkami mohou být výše zmíněná rozpouštědla zlepšující rozpustnost účinných látek jako glykoly, ethylenglycerin nebo etanol. Etanol pokud je použit v koncentracích vyšších, než 15 % vykazuje přímý konzervační účinek a při nižších koncentracích zvyšuje účinnost jiných konzervačních látek. Další skupinou látek s pozitivním vlivem na účinnost konzervantů jsou chelatační činidla, která mohou ovlivňovat rozpustnost systému, nebo vytvářet komplexy s účinnými látkami. Zvláštní zmínka je o kyselině ethylendiamintetraoctové, která disponuje schopností izolovat dvojmocné kationty vápníku a hořčíku, čímž naruší integritu buněčné stěny a umožní tím lepší pronikání antimikrobiálních látek do buněk. Stejnou schopnost má také diacetát kyseliny glutamové. [13, s. 172], [38]

Pro každý nově vyvinutý kosmetický přípravek je zapotřebí stanovit vhodný konzervační systém. V praxi se často zkouší kombinace různých konzervačních látek, protože obvykle bývá kombinace účinnější, a vytváří se tak široké spektrum konzervačních systémů. Z výše uvedeného vyplývá, že volba vhodné konzervační látky respektive konzervačního systému není jednoduchá a významně rozhoduje o kvalitě a použitelnosti výrobku. Důsledkem nevhodné konzervace kromě nestability výrobku může být poškození kůže toxiny a bakteriálními metabolity (iritace). [6, s. 44], [11, s. 28], [33]

3.2 Požadavky na konzervační látky

Na základě výše zmíněných skutečností vyplývá celá řada požadavků, které by měla konzervační látka splňovat. Ideální konzervační látka by měla být účinná vůči širokému spektru mikroorganismů pokud možno při nízkých koncentracích, rozpustná ve vodě, nerozpustná v olejích, stabilní v daném rozmezí pH a teploty kompatibilní s ostatními složkami a s obalovými materiály. Dále je žádoucí, aby byla bezbarvá a bez zápachu, finančně dostupná a snadno stanovitelná. Nejdůležitějším požadavkem je pochopitelně bezpečnost, tedy nízká toxicita a alergenita.

Bohužel doposud neexistuje žádná látka, která by splňovala všechny tyto podmínky. Největší úskalí představuje požadavek na širokospektrý účinek a koncentraci. Z tohoto důvodu jsou do kompozic kosmetických přípravků častěji zabudovávány směsi konzervačních lá-

tek, které vykazují širší spektrum účinku než jednotlivé konzervační látky. Množství konzervační látky by mělo být vždy v nejnižší možné koncentraci, avšak stále ještě účinné proti růstu mikroorganismů. Se zřetelem na minimalizaci vedlejších účinků platí legislativou maximální povolené koncentrace stanovené pro každou konzervační látku. Při výběru konzervační látky tak hraje roli také země, ve které je výrobek nabízen, protože legislativa jednotlivých zemí se liší. V zásadě existují dvě úrovně koncentrace, a to minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabrání viditelnému růstu bakterií za 24 hodin, a minimální baktericidní koncentrace (MBC), tedy nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení mikroorganismu. Vzhledem k probíhajícímu legislativnímu vývoji lze očekávat, že výběr konzervační látky částečně ovlivní i fakt, zda se jedná o prostředky oplachové (rinse-off) či na pokožce zůstávající (leave-on) kosmetiky. Předpokládá se totiž zákaz používání konzervačních látek skupiny thiazolinonů v produktech zůstávajících na pokožce. [7, s. 83] [30, s. 212], [35, s. 1], [39], [40, s. 346]

3.3 Mechanismus působení antimikrobiálních látek

Davidson a Brannen stanovili tři obecné kategorie konzervačních látek podle mechanismu účinku. Do první kategorie zařazují sloučeniny, které způsobují poškození propustnosti membrány buňky. Druhá kategorie zahrnuje látky, které inhibují nebo inaktivují základní buněčné enzymy. Tyto sloučeniny často útočí na enzymy reakcí s thiolovou nebo hydroxylovou skupinou v aktivním místě enzymů. Do třetí kategorie pak řadí sloučeniny reagující s DNA buňky, které mohou zabránit replikaci buňky. [26, s. 174]

Philip A. Geis [13] ve své publikaci uvádí, že existují tři třídy biocidů, jejichž chemické vlastnosti a mechanismus působení jsou vhodné pro kosmetické výrobky: elektrofilny, rozpouštědla a slabé kyseliny. Z těchto tří jsou nejvíce univerzální a široce používané elektrofilny. Mechanismus jejich působení spočívá v interakci s reaktivními nukleofilními částicemi v biologických molekulách, jako jsou thiolové skupiny, enzymové kofaktory, nebo malé peptidy. Thioly jsou dostatečně nukleofilní při fyziologickém pH, které snadno reagují s elektrofilními sloučeninami. Kromě toho jsou thioly často zapojeny do katalytických mechanismů enzymů, které spouští kaskádu vedoucí k buněčné smrti. Rozpouštědla jako jsou etanol a fenoxietanol mohou být použity jako konzervační přísady pokud jsou aplikovány v koncentracích vyšších než 1 %. Předpokládaným mechanismem účinku je solvatace hydrofobních molekul z buněčné membrány, což má za následek ztrátu integrity membrány

a lyzi buněk. Nevýhoda použití konzervačních látek z této třídy je nedostatečná kompatibilita s ostatními složkami výrobku. Poslední třídou biocidů jsou slabé kyseliny, jako jsou parabeny, kyseliny sorbová a citronová, které mají založenou antimikrobiální aktivitu na schopnosti měnit intracelulární pH a pronikat s gradientem pH přes buněčné membrány. Nevýhodou využití této třídy biocidů je špatná rozpustnost, i přesto jsou však zcela běžně používány. [13, s. 181 – 183]

3.4 Konzervace bez konzervačních látek

V posledních letech kosmetický průmysl zaznamenává zvýšený zájem po přírodních produktech, a to především z důvodu zvýšené četnosti případů hlášených vedlejších účinků konzervantů na pokožku. Tento rostoucí trend vede výrobce kosmetických výrobků k vývoji nových konzervačních metod. V zásadě lze v odborné literatuře nalézt dva používané termíny, a to tzv. free-preserving a tzv. self-preserving. Pojem free-preserving neboli „bez konzervačních látek“ vyjadřuje, že výrobek neobsahuje látky klasifikované dle legislativy jako konzervační a uvedeny v příloze V Nařízení Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, o kosmetických přípravcích. Bez konzervačních látek lze vyrobit vodné přípravky, tak aby byly mikrobiologicky stabilní, přičemž musí být splněna podmínka aseptické výroby a vhodného balení. Nicméně, tento postup nebude fungovat u většiny vodných kosmetických přípravků balených v obalech určených pro opakované použití. [9, s. 163]

Pojem self-preserving neboli „sebekonzervování“, či „samokonzervování“ znamená nahrazení běžně používaných konzervantů ostatními kosmetickými přísadami s antimikrobiálními vlastnostmi. Příkladem může být celá řada esenciálních olejů a extraktů, dále sloučenin jako kaprylyl glykol, fenylethylalkohol, nebo vonné složky. Důvodem používání je jejich příznivý účinek na kůži a současně příznivý vliv na zachování stability výrobku. Tyto složky doposud nebyly Evropskou vědeckou komisí uznány jako konzervační přísady. V publikaci autorů Donald S. Orth, Jon J. Kabara a kolektivu [37] se uvádí, že produkty založené na principu „samokonzervování“ jsou schopny usmrcení problematických mikroorganismů dostatečně rychle, aby splňovaly kritéria pro testy konzervační účinnosti. Zatímco produkty označované jako „bez konzervačních látek“ nejsou schopny usmrcení mikroorganismů tak rychle, vzhledem k nízkému nebo vysokému pH, vysoké koncentraci povrchově aktivních látek, vysoké koncentraci alkoholu atd., a vyvíjejí tak pouze mikrobiostatický efekt. Proto musí být takové výrobky baleny do uzavíratelných obalů, udržující integritu produktu a bránící mikrobiální kontaminaci. [37, s. 176], [41, s. 698]

4 ANTIMIKROBIÁLNÍ PŘÍPRAVKY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

Antimikrobiální látky jsou nedílnou a naprosto nezbytnou součástí kosmetických přípravků. Obvykle se používají více složkové konzervační systémy. Optimální kombinací lze docílit efektivnějšího účinku a také snížit riziko případných toxických reakcí. Dnešní výrobci mohou vybírat z bohaté škály antimikrobiálních látek lišící se chemickou strukturou, původem, účinkem i způsobem použití. V kosmetických prostředcích se tyto látky nepoužívají výhradně pro účely konzervace. Některé díky svým specifickým vlastnostem mohou tvořit aktivní složky deodorantů, šamponů proti lupům, pleťových vod pro problematickou pleť s akné, přípravků k péči o zuby a k ústní hygieně, přípravků k mytí či dezinfekci rukou atd. [13, s. 169 - 170], [30, s. 213 - 215]

V zásadě lze konzervační látky rozdělit na dvě skupiny podle původu, a to na syntetické a přírodní. Látky syntetického původu jsou v kosmetice povoleny s určitými omezeními a pro jednotlivé z nich platí legislativou dané dávkování. Povoleno je nyní přibližně 60 chemických látek, z toho méně než 20 se těší vysoké frekvenci používání. Konzervační látky syntetického původu jsou prozatím používány více, avšak zájem o látky přírodní v posledních letech stoupá. Jedná se zejména o rostlinné extrakty (např. extrakt z rozmarýnu, levandule, grapefruitových semen apod.) a esenciální oleje (např. *Tea Tree oil*, hřebíčkový olej, levandulový olej, tymiánový olej, rozmarýnový olej aj.). Výrobku tyto suroviny dodávají především charakteristickou vůní, značnou nevýhodou je jejich vysoká cena. [2, s. 85], [13, s. 170], [42, s. 232]

Zvláštní skupinou antimikrobiálních látek se staly parciální estery glycerolu s vyššími mastnými kyselinami (monoacylglyceroly, MAG), na jejichž antimikrobiální aktivitu byla provedena již celá řada studií a které nabízí efektivní řešení z pohledu bezpečnosti, účinnosti, chemické stability, biologické kompatibility a také dostupnosti. [43, s. 1106]

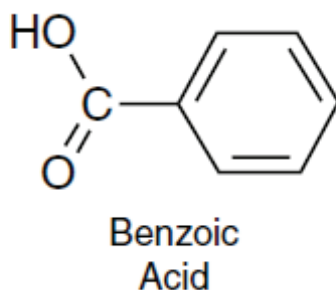
Vzhledem k zaměření práce na monoacylglyceroly jako antimikrobiální přísady v kosmetických přípravcích jim bude věnována následující kapitola.

4.1 Organické kyseliny

Mezi nejznámější a nejpoužívanější organické kyseliny patří kyselina benzoová a její sodná sůl, kyselina sorbová a její draselná sůl, kyselina dehydrooctová a její sodná sůl. Obecně jsou organické kyseliny účinné pouze v kyselém prostředí, protože pouze protonované

formy mohou procházet přes buněčnou membránu. Obvykle jsou účinné pouze ve formulacích s pH nižším než 5. Hypotéza o jejich působení je taková, že přecházejí do méně kyselé cytoplazmy buňky, kde se disociují, uvolní proton, a tím sníží intracelulární pH. Proces aktivního transportu, který se snaží udržet protonový gradient, proto musí čerpat další protony ven z buňky a zachovat určitou energetickou účinnost. Vzhledem k tomu, že je transport přes buněčnou membránu energeticky náročný proces, buňky v podstatě pomalu vyhladoví k smrti. Dalším obecným znakem je slabý účinek na plísně. [26, s. 169], [38]

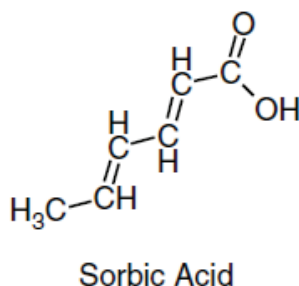
4.1.1 Kyselina benzoová (INCI: Benzoic acid)



Obr. 1. Kyselina benzoová [13, s. 231].

Kyselina benzoová a její sodná sůl se používá jako konzervační látka nejen v kosmetice, ale i v potravinářství, tabákovém a farmaceutickém průmyslu. Bakteriostaticky a fungicidně působí v koncentracích 5 – 12 %. [44] V kosmetických přípravcích se nejčastěji používá v 0,1 %. Nejvyšší koncentrace pro přípravky, které se oplachují (rinse-of) s výjimkou přípravků pro ústní hygienu je 2,5 % (jako kyselina) v přípravku připraveném k použití. Pro přípravky ústní hygieny je nejvyšší koncentrace 1,7 % (jako kyselina) a pro přípravky, které se neoplachují (leave-on) 0,5 % (jako kyselina). [1, s. 192] Účinnost ztrácí v neutrálním nebo alkalickém prostředí a v přítomnosti proteinů a glycerolu. Neslučitelná je s neionogenními a kvarterními sloučeninami. Je stabilní při nízkém pH, optimální pH 2 až 5. Vykazuje vyšší antimikrobiální aktivitu na grampozitivní bakterie, než na gramnegativní bakterie. [13, s. 231] V zevních externech bývá často kombinována s kyselinou salicylovou. Kyselina benzoová je snadno rozpustná v 95% etanolu a eteru, rozpustná v horké vodě, málo rozpustná v chloroformu, acetonu a benzenu. Sodná sůl kyseliny benzoové je dobře rozpustná ve vodě, v etanolu a v glycerolu, z tohoto důvodu bývá používána častěji. [13, s. 231], [45, s. 3], [44], [46, s. 107]

4.1.2 Kyselina sorbová (INCI: Sorbic acid)

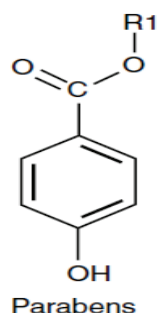


Obr. 2. Kyselina sorbová

[13, s. 277].

Kyselina sorbová nebo-li hexa-2,4-dienová kyselina má fungicidní účinek, inhibuje růst plísní a kvasinek (MIC *Candida albicans* 25 – 50 µg/ml). [13, s. 277], [44] Kyselina sorbová a její soli inhibují různé bakterie v různých fázích životního cyklu. Tato schopnost může být zodpovědná za její široké spektrum účinku. Inhibice růstu bakterií pomocí kyseliny sorbové může mít za následek pozměnění buněčných membrán, inhibici transportu látek a inaktivaci klíčových enzymů. [47, s. 1] Působí především v kyselém prostředí (optimální pH 4,5), nad pH 6 ztrácí účinek. Inkompatibilita vzniká s neionogenními sloučeninami. V kosmetických přípravcích maximální přípustná koncentrace stanovena na 0,6 % (jako kyselina). Je snadno rozpustná v etanolu a v eteru, dále v horké vodě, v tucích a olejích. Ve spojení s dalšími antimikrobiálními látkami nebo glykoly se uplatňuje synergický efekt. [1, s. 193], [13, s. 277], [44]

4.2 Parabeny (INCI: Parabens)



Obr. 3. Parabeny [13, s. 261].

Parabeny jsou alkylestery p-hydroxybenzoové kyseliny. Parabeny a jejich soli se řadí mezi chemické konzervanty používaných v kosmetice, potravinářství a farmacii. Nejsou silnými

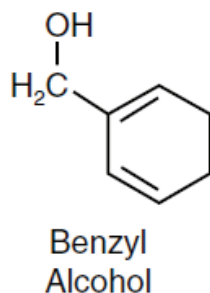
senzibilizátory, jsou bezbarvé, bez zápachu, stabilní a efektivní v širokém rozmezí pH, se širokým spektrem antibakteriální aktivity, s nízkou toxicitou, ekonomickou výhodné. Optimální účinnosti dosahují v rozmezí pH 3 – 9,5. Antimikrobiální aktivita roste s délkou alkylového řetězce. Zároveň s prodlužujícím řetězcem klesá jejich rozpustnost ve vodě a zvyšuje rozpustnost v tucích. [32, s. 329], [44], [48, s. 84 – 85] Slabší antimikrobiální aktivitu vykazují proti gramnegativním bakteriím [38] Jsou kompatibilní s aniontovými a kationovými emulzemi a proteiny. Naopak špatně se snáší s metylcelulózou, polyvinylpyrrolidonem. [13, s. 261] Jsou součástí mnoha kosmetických výrobků např. šamponů, mýdel, sprchových gelů, tělových emulzí a krému, deodorantů a antiperspirantů. Parabeny jsou považovány za prakticky netoxické látky, přesto každodenní používání různé kosmetiky s jejich obsahem může představovat určité riziko rozvoje alergií či jiných zdravotních problémů. Navzdory tomu stále patří k nejpoužívanějším konzervačním látkám v kosmetických přípravcích. Maximální přípustné množství je 0,4 % (jako kyselina) pro jeden ester a 0,8 % (jako kyselina) pro směsi esterů. [1, s. 194], [32, s. 329], [44], [48, s. 84 – 85]

Methylparaben je nejběžnější z různých forem parabenů. Methyl-, ethyl-, propyl- i butylparaben se dobře rozpouští v metanolu, v etanolu, v acetonu, v propylenglykolu, v eteru, v chloroformu a roztocích alkalických hydroxidů. Naopak nejsou dobře rozpustný ve vodě. Nejčastěji se používají v zubních pastách a ústních vodách, mýdlech, šamponech, vlasových vodách a gelech, holicích pěnách, deodorantech, opalovacích krémech, lotionech, pleťových mlécích, make-upech a rtěnkách. Methylparaben je více rozpustný ve vodě, ale méně účinný proti plísním než propylparaben. [32, s. 329], [26, s. 329], [44] Furr a Russel [49] studovali účinky parabenů na růst a membránovou propustnost *Serratia marcescens*. Měřili změny v propustnosti membrány poklesem optické hustoty a úniku pentóz z buněk. Únik byl vyšší po vystavení propyl- nebo butylparabenů oproti methyl- nebo ethylparabenům. Zároveň se ukázalo, že buňky jsou schopny přežít určitý stupeň poškození membrány a ztráty intracelulárních komponent. Alwood (1973) uvádí, že neiontové povrchově aktivní látky v nízkých koncentracích mohou mít s parabeny synergický účinek, kdežto vysoké koncentrace naopak inhibují konzervační účinnost. Close a Neilson (1976) identifikovali na propylparaben rezistentní kmen *Pseudomonas cepacia* s esterázami schopnými hydrolyzovat propylparaben a využívat metabolity jako zdroj uhlíku. [50, s. 29] Podle Davidsona a Branena spadají parabeny dle mechanismu účinku do první kategorie tedy látky poškozující propustnost membrány buňky. [26, s. 166]

4.3 Alkoholy (INCI: Alcohols)

Některé alkoholy jsou užitečné jako antimikrobiální přísady v kosmetických prostředcích. V potravinářském a farmaceutickém průmyslu je z alkoholů nejvíce využíván etanol. Použití etanolu jako konzervačního činidla vyžaduje vysoké koncentrace, často vyšší než 4 % z celkové hmotnosti produktu, aby bylo zabráněno růstu bakterií a plísní. V koncentraci etanolu vyšší než 20 % je výrobek považován za zcela sterilní. Dalším známým alkoholovým konzervačním činidlem je propylenglykol, který je významný především kvůli synergickému působení v kombinaci s parabeny. Propylenglykol je účinný opět ve vyšších koncentracích. Nejrozšířenějšími a nepoužívanějšími alkoholy v kosmetických prostředcích jsou fenoxietanol s benzyl alkohol. Mechanismus účinku alkoholů může probíhat dvěma způsoby, porušením propustnosti buněčné membrány nebo inaktivací základních buněčných enzymů. [26, s. 167]

4.3.1 Benzyl alkohol (INCI: Benzyl alcohol)



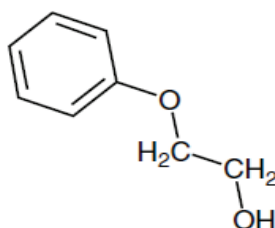
Obr. 4. Benzyl alkohol

[13, s. 232].

Benzyl alkohol je čirá, bezbarvá až nažloutlá, světlo lámající olejovitá tekutina, výjimečně pevná látka. V kosmetických prostředcích může být využíván nejen jako konzervační činidlo, ale také jako rozpouštědlo pro různé látky, např. pro vonné látky, želatinu, kasein, celulózoacetát, šelak aj. [44] Nejvyšší účinek vykazuje proti grampozitivním bakteriím. Účinný je i proti gramnegativním bakteriím a kvasinkám, ale je málo účinný proti houbám. Optimálního účinku dosahuje v prostředí s pH nad 5. Působením UV záření pomalu oxiduje na benzaldehyd. Je inaktivován neionogenními činidly (např. Tween 80) a ředěním. [13, s. 232 – 233] Benzyl alkohol je dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s etanolem, chloroformem, eterem, mastnými oleji a se silicemi. Zvláštní vlastností je, že může být příči-

nou pigmentací na tváři. Nejvyšší povolená koncentrace v kosmetice je 1,0 %. [1, s. 197], [44]

4.3.2 Fenoxietanol (INCI: Phenoxyethanol)



2-Phenoxyethanol

Obr. 5. Fenoxietanol [113, s. 263].

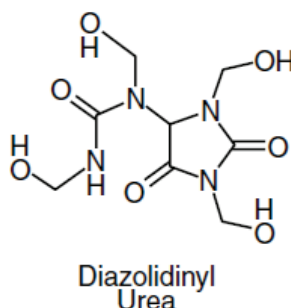
Fenoxietanol se používá jako konzervační, dezinfekční a antiseptická látka zejména v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Je součástí řady směsných konzervačních látek (např. Euxyl® K 400). Může být přítomen např. v pleťových vodách, maskách, krémech, krémech na opalování, šamponech a balzámech na vlasy, make-upech, deodorantech aj. Dalším uplatněním v kosmetickém průmyslu je jako fixační činidlo pro parfémy. [44] Je účinný v širokém rozmezí pH, je vysoce stabilní a kompatibilní s aniontovými a kationtovými detergenty. V přítomnosti neionogenních sloučenin nebo ředěním dochází k jeho inaktivaci. Často se kombinuje s parabeny, kyselinou dehydrooctovou, nebo kyselinou sorbovou. S propylenglykolem usnadňuje rozpustnost ve vodě. Snadno se rozpouští v etanolu, eteru a v roztoku hydroxidu sodného. Je rozpustný i ve vodě a v některých rostlinných olejích. [113, s. 232 – 233] Mísí se s acetonem, etanolem a glycerinem. Maximální povolená koncentrace v kosmetických přípravcích je 1,0 %. [1, s. 197]

4.4 Donory formaldehydu

Donory formaldehydu jsou látky uvolňující formaldehyd. Do skupiny donorů formaldehydu lze zahrnout DMDM hydantoin, diazodinylní ureu, imidazolidinylní ureu, Quaternium 15 také bronopol. Jedná se o skupinu látek velmi účinnou proti bakteriím, ale méně proti plísním a kvasinkám. Veškerý uvolněný formaldehyd se konvertuje na methylen glykol. Konečné výrobky obsahující formaldehyd nebo látky, z nichž se uvolňuje formaldehyd, musí být označeny upozorněním „obsahuje formaldehyd“ jestliže koncentrace formaldehydu v konečném výrobku překročí 0,05 %. [51] Formaldehyd sám o sobě má dlouhou historii používání jako antimikrobiální přísady. Dnes se již v kosmetických prostředcích

vyskytuje zřídka. [26, s. 171], [30, s. 215], [41, s. 126], Je zakázáno používat formaldehyd v rozprašovačích aerosolů (sprejích). [1, s. 193] Mechanismus účinku spočívá v denuraci proteinů působením formaldehydu, který reaguje s aminokyselinami buněčné stěny, membrány i cytoplasmu. [13, s. 252] Maximální povolené množství pro přípravky ústní hygieny je 0,1 % (jako volný formaldehyd), pro ostatní 0,2 %. [1, s. 193]

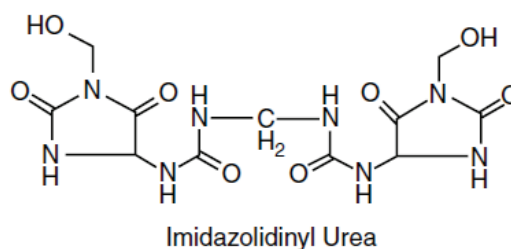
4.4.1 Diazolidinyl urea (INCI: Diazolidinyl urea)



Obr. 6. Diazolidinyl urea [13, s. 243].

Diazolidinyl urea je bílá pevná látka ve formě jemného prášku, bez zápachu. Má širokospektré antimikrobní účinky. Je rozpustná ve vodě, propylenglykolu a glycerinu. Je kompatibilní s ionickými, neionickými sloučeninami a proteiny. V kosmetických výrobcích se nejčastěji nachází v šamponech, gelech na vlasy, kondicionérech, přípravcích k čištění pokožky, v deodorantech a mnohých dalších. Nejvyšší povolená koncentrace v kosmetických výrobcích je 0,5 %. [1, s. 198], [13, s. 243 – 244], [44]

4.4.2 Imidazolidinyl urea (INCI: Imidazolidinyl urea)

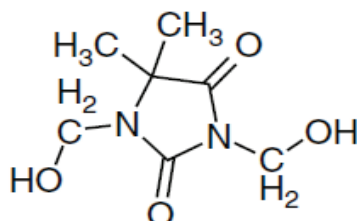


Obr. 7. Imidazolidinyl urea [13, s. 255].

Imidazolidinyl urea je bílá pevná látka ve formě jemného prášku, bez zápachu. Má dobré antimikrobní účinky proti grampozitivní i gramnegativním bakteriím, ale velmi špatně působí na kvasinky a plísňe, proto se doporučují kombinace s parabeny nebo jinými fungicidními přípravky. Po parabenech patří k nejčastěji používaným konzervačním látkám.

Snadno se rozpouští ve vodě, v etanolu a olejích. Nejčastěji se nachází v přípravcích pro péči o vlasy, deodorantech, tělových mlécích a emulzích. Maximální povolené množství v kosmetickém přípravku je 0,6 %. [1, s. 196], [13, s. 255 – 256], [44]

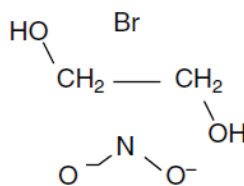
4.4.3 DMDM Hydantoin (INCI: DMDM hydantoin)



Obr. 8. DMDM Hydantoin [13, s. 246].

DMDM hydantoin je čirý roztok mírně zapáchající po formaldehydu. Má široké spektrum účinku především proti bakteriím. Ve výrobcích, které vyžadují ochranu proti kvasinkám a plísním se používá v kombinaci s parabeny či jinými fungicidními látkami (např. aniontové povrchově aktivní látky, Kathon CG, nebo formaldehyd). Působí v rozmezí pH 3,5 – 10,0. Obsahuje volný formaldehyd a asi 17 % vázaného formaldehydu. Nepatří mezi často používané antimikrobiální přísady, přesto jej lze nalézt v mnoha různých výrobcích, nejčastěji v šamponech a vlasových kondicionérech, v krémech pro ošetřování kůže a make-upech. Maximální povolené množství v kosmetických přípravcích je 0,6 %. [1, s. 197], [13, s. 246 – 247], [44]

4.4.4 Bronopol (INCI: 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)



Bromo Nitropropane Diol

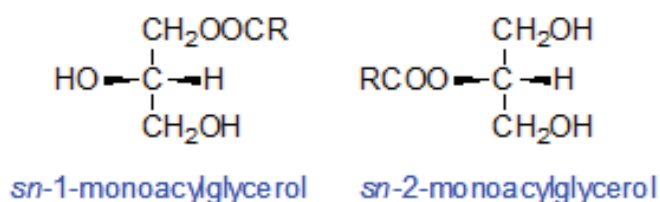
Obr. 9. Bronopol [13, s. 246].

Jedná se o bílý krystalický prášek, slabého zápachu, stabilní při nízkém pH. Optimálního účinku dosahuje v hodnotách pH 5,0 – 7,0. [13, s. 235 – 236] Bronopol spolu s 5-brom-5-nitro-1,3-dioxanem (Bronidox) patří do bromonitro sloučenin. Má širokospektrý antibakteriální účinek již při nízkých koncentracích. Antimikrobiální aktivita spočívá ve skupině Br-C-NO₂. Dostupné studie naznačují, že bromonitro sloučeniny reagují se základními

buněčnými enzymy, spadají tak do druhé kategorie mechanismu účinku podle Davidson a Branen. [26, s. 171 – 172] Snadno se rozpouští ve vodě, etanolu a octanu ethylnatém. Špatnou rozpustnost vykazuje v chloroformu, acetonu, éteru a benzenu. V kosmetických výrobcích se nejčastěji vyskytuje ve vlasové a dekorativní kosmetice, krémech na ruce a obličeje a pleťových vodách. Maximální přípustná koncentrace v kosmetice je 0,1 %. [1, s. 196], [13, s. 235 – 236], [44]

5 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Vznikají substitucí jednoho vodíku hydroxylové skupiny glycerolu zbytkem mastné kyseliny (acylem). Mohou se tedy vyskytovat ve dvou izomerních formách, 1-monoacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly. Díky svým jedinečným vlastnostem se monoacylglyceroly v současnosti stávají předmětem řady studií, zejména kvůli antimikrobiálnímu a emulgačnímu účinku. [43, s. 1106], [52], [53, s. 42]



Obr. 10. Struktura molekuly monoacylglycerolů [52].

5.1 Vlastnosti monoacylglycerolů

Fyzikální a chemické vlastnosti určuje zejména typ a poloha mastné kyseliny vázané na glycerol. Na základě typu mastné kyseliny mohou být MAG kapalné nebo pevné. Kapalné MAG mají olejovitou konzistenci, světle slámové až hnědé barvy. Pevné MAG se vyskytují ve formě bílého prášku, vloček nebo malých kuliček. Monoacylglyceroly jsou nerozpustné ve vodě, ale mohou tvořit stabilní hydratované disperze. Monoacylglyceroly mají vyšší bod tání než příslušná mastná kyselina. Bod tání se zvyšuje se zvyšujícím se počtem atomů uhlíků v molekule mastné kyseliny. Nižší bod tání mají MAG s nenasycenými mastnými kyselinami. Molekuly MAG mají amfifilní charakter, tvoří ji polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) část. Díky tomu jsou často využívány jako neiontové povrchově aktivní látky a emulgátory. [43, s. 1106 – 1107], [53, s. 42 – 43], [54]

V lidském organismu vznikají monoacylglyceroly jako přirozený produkt lipázou katalyzované hydrolýzy tuků. Běžně se vyskytují v živočišných produktech, např. v mléce. Obecně jsou tedy považovány za bezpečné, bez dráždivých účinků a mohou být použity s velkou důvěrou v potravinách i kosmetických přípravcích. [55, s. 52]

Monoacylglyceroly lze vyrobit několika způsoby: parciální hydrolýzou triacylglycerolů, interesterifikací (alkoholýzou, acidolýzou, transesterifikací), esterifikací vyšší mastné ky-

seliny s glycerolem nebo adicí mastné kyseliny na glycidol (oxiran-2-yl-metanol). [55, s. 52], [53, s. 42 – 43], [54]

V praktické části práce budou používány MAG vyrobené adicí mastné kyseliny na glycidol. Syntéza MAG tímto způsobem je uskutečněna prostřednictvím nukleofilního otevření epoxidového kruhu glycidolu. Reakce může být katalyzována řadou katalyzátorů, např. terciálními aminy, amoniiovými solemi s mediátory na bázi komplexů tranzitních kovů (např. chrom, kobalt, titan, vanad). Množství katalyzátoru je dáno druhem epoxidu. Výhody takovéto syntézy jsou poměrně mírné reakční podmínky a krátká reakční doba. Naopak nevýhodou těchto postupů představuje relativně nízký výtěžek. Poměrně vysoké výtěžnosti lze dosáhnout použitím chromitých katalyzátorů, zejména chromium (III) acetát hydroxidu (Janiš a kol. 2006). [56, s. 200 – 206], [57, s. 351]

5.2 Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů

Antimikrobiální účinky volných mastných kyselin jsou již dlouhou dobu známy a jsou dobře prostudované. Nynější studie se zaměřují na antimikrobní účinky acylglycerolů. Ačkoliv byla provedena celá řada studií, přesný mechanismus účinku není doposud znám. Vzhledem k povaze mastných kyselin i monoacylglycerolů, jakožto lipofilních látek, je primárním cílem jejich ataku cytoplazmatická membrána. Bylo navrženo několik hypotéz. Jedna z nich se zakládá na porušení buněčné membrány a tím inhibici transportu aminokyselin do buňky. Další z hypotéz vychází z průniku mastných kyselin s krátkým až středně dlouhým řetězcem do buňky v nedisociované formě a jejich disociace uvnitř, což má za následek snížení vnitrobuněčného pH, a to může vést k inaktivaci intracelulárních enzymů. Obecně je známo, že mastné kyseliny a monoacylglyceroly účinkují prostřednictvím několika nespecifických mechanismů účinků. Z tohoto důvodu se také nevyvíjí rezistence mikroorganismů k těmto sloučeninám. [54], [58, s. 346], [59, s. 29 – 30]

Obecně platí, že mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly jsou schopny potlačit růst širokého spektra mikroorganismů. Působí inhibičně na grampozitivní bakterie, kvasinky [60] a plísně [61], [62]. Inhibiční aktivita proti gramnegativním bakteriím je nízká. Za určitých podmínek mohou mastné kyseliny a monoacylglyceroly inhibovat i spory [63] a zajímavá je i aktivita některých MAG vzhledem k obaleným virům, např. herpes simplex virus [64]. Bylo zjištěno, že monoacylglyceroly jsou účinnější než odpovídající mastné kyseliny. Biocidní účinnost monoacylglycerolů se řídí charakterem mastné kyseliny. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem vykazují vyšší aktivitu ve srovnání s mastnými kyselinami

s dlouhým řetězcem. Kromě počtu atomů uhlíků v řetězci mastné kyseliny závisí antimikrobiální aktivita rovněž na počtu dvojných vazeb. Kyselina laurová (C12:0) a kyselina palmitoolejová (C16:1) byly označeny jako nejučinnější nasycené a nenasycené deriváty. [43, s. 1106 – 1107], [58, s. 346], [59, s. 29 – 30] Kabara a kol. [65] testovali antimikrobiální aktivitu mastných kyselin a jejich derivátů, kde potvrdili nejvyšší bakteriostatický účinek u kyseliny laurové. Také zjistili, že přidáním dvojně vazby došlo ke zvýšení bakteriostatického účinku všech testovaných mastných kyselin (C14:0, C16:0, C18:0) a že záleží na poloze dvojně vazby, protože trans izomery nebyly aktivní. Zaznamenali také zvýšenou antimikrobiální aktivitu mastných kyselin s dvěma dvojnými vazbami, se třemi dvojnými vazbami naopak aktivita poklesla. Dále potvrdili, že monoacylglycerolů kyseliny laurové je účinnější než příslušná kyselina. Petschow a kol. [66] sledovali vliv dvojně vazby v řetězci mastné kyseliny na antimikrobiální aktivitu. Zjistili, že zatímco antibakteriální aktivita nenasyceného MAG na bázi kyseliny dodecenové (MAG_{C12:1}) je několikanásobně nižší ve srovnání s aktivitou nasyceného MAG kyseliny laurové (MAG_{C12:0}), aktivita nenasyceného MAG připraveného z kyseliny undecenové (MAG_{C11:1}) vykazoval vyšší aktivitu než nasycený MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}). Proto je důležité posuzovat antimikrobiální aktivitu mastných kyselin a jejich esterů jednotlivě pro každou z nich. Mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku v molekule nejsou v přírodě běžné, proto nejsou předmětem diskuzí v mnoha odborných publikacích. Kyselinu undekanovou (C11:0) lze v malých množstvích (1,2 %) nalézt například v rostlině *Rheum palmatum* a kyselina undecenová (C11:1) se vyskytuje v lidském potu. Antimikrobiální a zejména antifungální účinek kyseliny undecenové je obecně známý, proto našla své uplatnění především ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. V kosmetice se nachází hlavně v šamponech proti lupům, antimikrobiálních prášcích a jako pižmo v parfémeh. [43, s. 1106 – 1107], [54], [58, s. 346], [59, s. 29 – 30]

Inhibiční působení MAG může být ovlivněno některými látkami, jako například škrob, fosfolipidy, albumin, cholesterol. Tyto látky mohou reagovat s molekulami MAG a tím snížit jejich účinek proti nežádoucím mikroorganismům. [59, s. 30] Inhibiční aktivita MAG může být podpořena kombinací s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) [67, s. 420], s nízkým pH, s vysokou koncentrací NaCl [68, s. 102], se zvýšenou teplotou či okyselením pomocí kyseliny citronové [69, s. 7].

5.2.1 Antimikrobiální působení na bakterie

Antimikrobiální aktivita MAG vůči bakteriím byla předmětem mnoha studií. Studie poukazují na zvýšenou odolnost bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního typu, proto se převážná část zaměřuje zejména na inhibici grampozitivních bakterií. Důvodem zvýšené odolnosti gramnegativních bakterií je rozdíl ve stavbě buněčné stěny a přítomnost vnější membrány v jejich stěně. Podle Bergssona a kol. [70, s. 261] byl pozorován inhibiční účinek pouze u bakterií, které mají jasně definované životní podmínky, a které vykazují relativně nízkou odolnost proti nepříznivým vlivům prostředí.

Mezi nejstudovanější MAG patří ty odvozené od kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$) a od kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). Antimikrobní účinky byly testovány Růžičkou a kol. [60, s. 330], jejich výsledky ukázaly, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) monokaprinu byla v rozmezí 100 – 250 mg/l. Přičemž MIC pro grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* byla 150 mg/l a pro *Bacillus subtilis* 100 mg/l. Z gramnegativních bakterií se podařilo prokázat inhibiční účinek monokaprinu na *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter lwoffii*, jejichž MIC byla stanovena na 100 mg/l. Některé bakterie nebyly tímto MAG inhibovány, a to některé gramnegativní bakterie. Buňková a kol. [59, s. 37 – 38] ve své studii prokázali významné snížení růstu gramnegativních bakterií, konkrétně *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* a *Citrobacter freundii* v přítomnosti $\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$, $\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$, $\text{MAG}_{\text{C}_{11:1}}$, $\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$, $\text{MAG}_{\text{C}_{14:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C}_{16:0}}$ v koncentracích ≥ 1000 mg/l. Naproti tomu Růžička a kol. [60, s. 330] neprokázali žádný účinek $\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$ proti *E. coli* a *P. aeruginosa*.

Minimální inhibiční koncentraci monolaurinu stanovili Růžička a kol. [60, s. 330] v rozmezí 20 – 200 mg/l pro všechny testované grampozitivní bakterie. Nejnižší MIC zjistili pro *Bacillus subtilis* 20 mg/l. Významného snížení růstu testovaných gramnegativních bakterií bylo dosaženo v koncentraci ≥ 500 mg/l. Lee a kol. [71, s. 2195] a Preuss a kol. [72, s. 32 – 33] zjistili MIC pro *B. cereus* a *B. anthracis* v rozmezí 25 – 75 mg/l. Dále zjistili Mansour a kol. [63, s. 315], že monolaurin může zabránit nejen růstu *Bacillus*, ale v kombinaci s nisinem i klíčení spor. Pro *Staphylococcus aureus* stanovili Preuss a kol. [72, s. 32] minimální inhibiční koncentraci na 63 mg/l, která je vyšší, než kterou stanovili Růžička a kol. [167, s. 330], kteří stanovili MIC pro *S. aureus* na 35 mg/l.

Antimikrobiální aktivitu monoacylglycerolu s lichým počtem atomů uhlíků, konkrétně $\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C}_{11:1}}$ zkoumala Doležalová a kol. [43] Ve své studii prokázali bakteriosta-

tický účinek MAG C 11:0 proti *S. aureus* při relativně nízkých koncentracích, a to 70 mg/l. Sporulující *B. cereus* byl vůči působení MAG_{C11:0} odolnější. Minimální inhibiční koncentrace nenasyceného MAG_{C11:0} proti *S. aureus* byla ve srovnání s nasyčeným analogem dvakrát vyšší (140 mg/l). Oproti tomu *B. cereus* byl citlivější na nenasycený analog. Dále se jim podařilo prokázat zpomalení růstu všech testovaných gramnegativních bakterií působením MAG_{C11:0}. Minimální inhibiční koncentraci bylo možno zjistit pouze u *E. coli*. *P. aeruginosa* byla nejodolnější ze všech testovaných gramnegativních bakterií.

Podle inhibičních účinků na grampozitivní bakterie mohou být MAG podle Buňkové a kol. [59, s. 38] seřazeny od nejnižší minimální inhibiční koncentrace následovně: MAG_{C12:0} > MAG_{C11:0} > MAG_{C10:0} > MAG_{C14:0} > MAG_{C11:1} > MAG_{C18:0} > MAG_{C16:0}.

5.3 Kožní reakce na antimikrobiální přísady

Některé kosmetické přípravky, hlavně krémy, emulze, vlasové vody a mýdla působí na kůži opakovaně a dlouhodobě, absorbují se tak na kožní povrch a mohou pronikat k reakčním vrstvám kůže. Může buďto vzniknout kontaktní alergická reakce vznikající na podkladě vrozeného sklonu nepřiměřeně reagovat na danou látku, alergen. Tato látka musí proniknout epidermální bariérou, a u disponovaného jedince se váže na proteiny dermis a v některých případech dává vzniku antigenu. Za normálních okolností by byla z koria resorbována a následně vyloučena. Alergie se projevuje zarudnutím, svěděním, šupinatěním a popraskáním kůže, kůže je oteklá a mohou se na ni tvořit puchýře naplněné tekutinou. Zánět se nemusí nutně objevit jen v místě působení alergenu. To je typické například u laků na nehty, kdy se člověk nalakovanými nehty dotýká obličeje, očních víček, kde se následně může poprvé objevit nežádoucí reakce. Vznik kontaktní alergie není tedy podmíněn pouze přítomností alergenu, ale i způsobem působení, koncentrací a frekvencí kontaktu této látky s kůží. [2, s. 66], [73, s. 164], [74, s. 64]

Dr. Kalenský zdůrazňuje nutnost odlišit kontaktní alergii od nejrůznějších druhů intolerance (nesnášenlivosti). Intolerance různých kosmetických přípravků se vyskytuje velmi často a převážná většina těchto nesnášenlivostí nemá příčinu v alergii. Nejčastěji se projevuje v důsledku nevhodně zvoleného přípravku pro daný charakter pleti, či nevhodný způsob aplikace, alkalizace mýdlem a mnohých dalších podnětů. Iritální dermatitida se projevuje přechodným začervenáním a pálivostí, které odeznívají během několika hodin po odstranění přípravku. Dráždivě na kůži působí zejména kyselina salicylová, kyselina glykolová, retinol, benzoyl peroxid, kyselina mléčná, resorcinol. Nejčastěji se kontaktní alergie a ne-

snášelnost zjišťuje na konzervační látky, rostlinné výtažky, emulgátory, parfemace, barviva a masťové základy. [2, s. 66], [73, s. 164]

Nejvíce diskutované látky z antimikrobiálních přísad jsou v posledních letech parabeny. Přestože jsou považovány za prakticky netoxické látky, každodenním používáním kosmetiky s jejich obsahem může představovat určité riziko vzniku alergií. V nedávné době se dokonce objevilo podezření na souvislost rakoviny prsu s užíváním deodorantů a antiperspirantů s obsahem parabenů. [48, s. 84 – 86] V roce 2002 Mirick a kol. [75] provedli rozsáhlý výzkum, který sledoval vztah mezi používáním antiperspirantů a deodorantů s parabeny a rakovinou prsu. Tento výzkum však žádný vztah neprokázal. I přes narůstající počet výrobků „bez parabenů“ patří parabeny stále mezi nejpoužívanější konzervační látky. [48, s. 86] Parabeny jsou používány v přibližně 33,0 % kosmetických přípravků. Frekvence senzibilizace na parabeny je dle literárních údajů 0,2 – 3,0 %. [33] Bylo zjištěno, že některé osoby, u kterých došlo k rozvoji kontaktní alergické dermatitidě po použití zevního léčiva s parabeny, používají dlouhodobě kosmetiku s obsahem parabenů bez jakýchkoli potíží. Vysvětlením tohoto paradoxu může být porušení bariérové funkce kůže, nebo fakt, že v kosmetických přípravcích jsou obvykle nižší koncentrace těchto látek. [26]

Další často používanou antimikrobiální přísadou je například fenoxyetanol, který se vyskytuje přibližně v 23 % kosmetických přípravků, avšak frekvence senzibilizace je pouze ojedinělá. U formaldehyd uvolňující konzervační látky je možnost senzibilizace na samotnou látku, na formaldehyd, na obě látky s možností vzájemných kombinací. Frekvence senzibilizace se uvádí na 0,8 – 4,9 %, přičemž látky tohoto charakteru se používají pouze v 0,3 % kosmetických přípravků. Vyšší senzibilizaci vykazují konzervační látky, jako bronopol, který se vyskytuje asi v 6,7 % kosmetických přípravků a frekvence senzibilizace je 0,2 – 5,3 %, dále Kathon CG používaný v 10,8 % KP s frekvencí senzibilizace 0,3 – 4,0 %. Další velmi známou a poměrně často používanou konzervační látkou je kyselina sorbová používaná v 7,3 % KP, která vykazuje senzibilizaci přibližně u 0,3 – 1,4 % osob. Podobné výsledky vykazují i imidazolidinyl urea a diazolidinyl urea, patří tedy mezi látky s poměrně nízkou frekvencí senzibilizace. [33] Pokud má jedinec podezření na alergickou reakci, provádí se epikutání test. Pokud je výsledek testu pozitivní, stanoví lékař léčbu. Za nejlepší řešení se považuje vyvarovat se kontaktu s alergenem, pokud je obtížné se dané látce vyhnout, užívají se příslušné léky. [74, s. 65] V případě intolerance je na místě vyhledat jiný lépe tolerovaný přípravek. [2, s. 66] Všechna tato zjištění vedla k nahrazování syntetických konzervačních látek nejrůznějšími alternativy. Jednou

z takových jsou bezpochyby monoacylglyceroly, které, jak již bylo výše zmíněno, vznikají v lidském organismu a běžně se vyskytují v živočišných produktech, a proto jsou tedy bezpečné a nevykazují dráždivé účinky. [55, s. 52]

V praktické části práce budou porovnávány antimikrobiální účinky vybraných monoacylglycerolů s parabeny a některými organickými kyselinami, jako možnost náhrady syntetických konzervantů monoacylglyceroly.

6 CÍLE PRÁCE

Cíle předložené diplomové práce byly následující:

- připravení modelových vzorků pleťové vody s různými antimikrobními látkami
- studium antimikrobních účinků vybraných monoacylglycerolů na vybrané druhy bakterií, ve vzorcích pleťových vod
- studium inhibičních účinků dvou běžně používaných alkylesterů kyseliny p-hydroxybenzoové (methylparabenu a propylparabenu) na vybrané druhy bakterií, ve vzorcích pleťových vod
- porovnání inhibičních účinků monoacylglycerolů a parabenů a zhodnocení jejich použití ve formulaci pleťové vody jako antimikrobiální přísady.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Materiál

7.1.1 Mikroorganismy

Antimikrobiální účinky byly testovány na grampozitivních a gramnegativních bakteriích. Kmeny bakterií byly získány z České sbírky mikroorganismů. Pro praktickou část diplomové práce byly použity následující kmeny bakterií:

Escherichia coli CCM 3954

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCM 3953

7.1.2 Kultivační média

Kultivace byla prováděna na univerzální půdě umožňující růst širokého spektra bakterií Nutrient Agar (HiMedia).

Složení:

Masový pepton	5,0 g/l
Hovězí extrakt	1,5 g/l
Kvasničný extrakt	1,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

Konečné pH (při teplotě 25°C) $7,4 \pm 0,2$

Navážka 11,2 g Nutrient Agarů byla rozpuštěna v 400 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut a uchovávána na Petriho miskách při teplotě $4 \pm 2^\circ\text{C}$ nanejvýš týden.

7.1.3 Ředící roztok

Jako ředící roztok byl použit pankreatický natrávený kasein (Casein Enzym Hydrolysate, HiMedia).

Složení:

Casein Enzym Hydrolyzate	0,2 g
NaCl	1,7 g
Destilovaná voda	200 ml

Navážky surovin byly rozpuštěny v 200 ml destilované vody. Takto připravený ředící roztok by sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

7.1.4 Antimikrobní látky

Pro praktickou část diplomové práce byly použity následující antimikrobní látky:

- MAG kyseliny kaprinové – monokaprinu (MAG C_{10:0}), UTTHK, Zlín
- MAG kyseliny undekanové – monoundekanoylglycerol (MAG C_{11:0}), UTTHK, Zlín
- MAG kyseliny laurové – monolaurin (MAG C_{12:0}), UTTHK, Zlín
- Methylparaben, Sigma-Aldrich, Praha
- Propylparaben, Sigma-Aldrich, Praha

Monoacylglyceroly byly připraveny adicí příslušné mastné kyseliny (Sigma-Aldrich, Praha) na glycidol (oxiran-2-yl) za katalýzy chromium (III) acetát hydroxidu [Cr₃(CH₃COO)₇](OH)₂ (Sigma-Aldrich, Praha) podle Janiš a kol. [56] vyrobené MAG byly přečištěny rekrystalizací v etanolu a filtrací. Rozpuštěním příslušné navážky MAG v 96% etanolu byly získány zásobní roztoky MAG o koncentraci 10 %.

Zásobní roztoky parabenů o koncentraci 20 % (w/v) byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky v 96% etanolu (Sigma-Aldrich, Praha).

Parabeny byly použity ve třech koncentracích, které byly voleny tak aby splňovaly požadavky platné legislativy o kosmetických přípravcích a maximálních povolených koncentracích konzervačních přísad. Použité koncentrace byly 0,2 %, 0,4 % a 0,8 %.

7.1.5 Pleťová voda

Antimikrobiální účinky daných antimikrobiálních látek byly testovány ve vzorcích pleťové vody vyrobené podle předložené receptury.

Základní receptura pleťové vody:

Tween 40 (Sigma-Aldrich, Praha)	9,0 g
Spolapon AES (Enaspol a.s., Teplice)	9,0 g
Flavol KDA (Enaspol a.s., Teplice)	1,8 g
<u>Destilovaná voda</u>	<u>80,2 g</u>
Složení celkem	100 g

Každá z použitých složek plnila určitou funkci. Tween 40 je neionický tenzid chemicky polyoxyethylensorbitan monopalmitát. Používá se jako neionický tenzid s charakterem emulgátoru a stabilizátoru. [76] Spolapon AES je komerční název pro Sodium Laureth Sulfate. Tento anionaktivní tenzid se používá jako nejběžnější surovina pro výrobu mycích, čistících a pracích prostředků, produktů osobní hygieny a čistících kosmetických přípravků. Vyniká zejména stabilní pěnou, výtečnou detergenční, smáčecí a emulgační schopností a snadným nastavením požadované finální konzistence výrobku. Pod komerčním názvem Flavol KDA byl použit Cocamidopropylbetain, což je amfoterní tenzid, používaný k zesílení pění a viskozity, jako smáčedlo a antistatické činidlo, který je kompatibilní se všemi typy tenzidů. Všechny použité suroviny jsou pokožkou dobře snášeny [77].

Do kádinky byly naváženy jednotlivé suroviny a byly promíchány na vysokorychlostním mixéru Heidolph RZR 2020 při 200 ot./min. Po dokonalém smísení a vytvoření homogenní směsi bylo změřeno pH. Hodnota pH pleťových vod byla 5,6, což odpovídá fyziologickému pH kůže (4 – 6). Ze zásobního roztoku pleťové vody bylo odpipetováno po 5 ml do 15 ml plastových zkumavek. Do jednotlivých zkumavek byly k základní receptuře přidávány různé antimikrobiální látky v několika koncentracích. Celkem bylo použito pět druhů antimikrobiálních látek ve třech koncentracích. Součástí souboru vzorků byly také patřičné kontroly. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek pleťové vody zaočkovaný příslušným inokulem bakterií bez obsahu antimikrobiální látky. Na pozitivní kontrole byl pozorován růst bakterií neovlivněný antimikrobiální látkou, nýbrž samotnou formulací pleťové vody. Jako negativní kontrola pak vzorek pleťové vody nezaočkovaný inokulem s jednotlivými antimikrobiálními látkami v daných koncentracích.

rací, kde se nepředpokládal žádný růst bakterií. Všechny zkumavky byly náležitě popsány, aby nedošlo k záměně. Rozpis zkumavek je uveden v příloze I.

7.1.6 Laboratorní sklo a plasty

K provedení experimentu bylo využito běžného laboratorního skla a plastů. Laboratorní sklo bylo sterilizováno ve sterilizátoru, horkým vzduchem při 160°C po dobu 300 minut, nebo v autoklávu při 121°C 20 minut. Laboratorní plasty byly sterilizovány v autoklávu při 121°C 20 minut.

7.1.7 Dekontaminace použitého materiálu

Dekontaminace veškerého použitého materiálu (živné půdy, suspenze bakterií, mikrotitrační destičky apod.) byla prováděna v autoklávu při 131°C po dobu 20 minut.

7.1.8 Přístroje a vybavení

Analytické váhy, Kern & Sohn GmbH, Německo

Autokláv Varioklav H+P Labortechnik AG, Německo

Automatické mikropipety BIOHIT

Automatické mikropipety Ependorf

Biologický bezpečnostní box (Clean Air Technik) B.V., Holandsko

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Biologický termostat Memmert INE 600, Německo

Denzilometr, EU

Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko

Elektronicky regulovatelná horkovzdušná sušárna Memmert, Německo

Microplate reader TECAN

Mikrotitrační destičky

pH metr EUTECH

Počítadlo kolonií se stativem SCHUTT COUNT PLUS, Německo

Software Microplate Manager (Bio-Rad)

Vortex Heidolph, REAX top, Německo

Vysokorychlostní mixér Heidolph RZR 2020

7.2 Metody

7.2.1 Příprava inokula

Pro provedení testu se z daných kmenů bakterií připraví zásobní a pracovní kultury. Zásobní kultura se připraví naočkováním ploten (křížový roztěr) uchovávaným kmenem a následnou inkubací příslušnou dobu při dané teplotě. Po inkubaci se zásobní kultura uchovává při teplotě 2 – 8 °C a slouží k získání pracovní kultury. Ze zásobní kultury testovaného mikroorganismu se připraví subkultura a z této se připraví druhá subkultura. Druhá subkultura tvoří pracovní kulturu a slouží k přípravě inokula.

Inokulum bylo připraveno suspendováním izolovaných kolonií bakterií z druhé subkultury pomocí sterilní kličky otěrem o stěnu sterilní zkumavky s 4,5 ml ředícího roztoku. Suspenze byla dostatečně promíchána, aby byla vytvořena homogenní směs. Následně se upravila hodnota zákalu na 1. stupeň McFarlandovy stupnice, což odpovídá přibližně 1×10^8 KTJ/ml (kolonie tvořících jednotek na mililitr) bakterií. Suspenze se použije během 2 hodin. Z připraveného inokula bylo odebíráno vždy po 100 µl do každého vzorku pleťové vody. Každý vzorek, vyjma vzorku obsahujícího negativní kontrolu, byl tedy zaočkován 100 µl bakteriální suspenze.

7.2.2 Zátěžový test účinnosti konzervace

Zátěžový test spočívá v cílené kontaminaci výrobku mikroorganizmem a sledování jeho schopnosti bránit kontaminujícím mikroorganizmům v růstu. Jako vodítko pro postup provedení testu účinnosti konzervace sloužila norma ČSN EN ISO 11930. Zkouška je primárně určená pro kosmetické výrobky rozpustné ve vodě nebo mísitelné s vodou. V případě výrobků obsahující vodu jako vnitřní fázi vyžaduje norma přizpůsobení. Hodnocení účinnosti je založeno na zaočkování vzorku kalibrovaným inokulem, které se připraví z příslušných kmenů bakterií. V následujících intervalech v období 28 dnů se zjišťuje množství přežívajících mikroorganismů. Po inkubaci jsou na inkubovaných miskách spočítány kolonie bakterií. [29]

Pro každý interval a každý kmen se rovněž vypočítá hodnota logaritmického snížení. Získané hodnoty se porovnají s minimálními hodnotami pro hodnocení kritéria A nebo kritéria B uvedené uvedenými v tab. 7. Na základě zjištění, zda vyhovují daným kritériím, se pomocí rozhodovacího diagramu zhodnotí jejich antimikrobiální ochrana. Rozhodovací diagram je uveden v příloze II. [29]

Kritéria představující ochranné schopnosti KP:

- kritérium A – přípravek je chráněn proti pomnožení mikrobů, které může představovat potenciální riziko pro spotřebitele a není třeba zvažovat další ochranné faktory.
- kritérium B – úroveň ochrany přípravku je přijatelná, pokud je prokázána existence dalších ochranných faktorů nesouvisející se složením (např. ochranné balení, jako je pumpička) indikujících, že mikrobiologické riziko je tolerovatelné. [29]

Jestliže přípravek nespĺňuje požadavky kritéria A ani kritéria B, pak musí být posouzen z hlediska mikrobiologického rizika. Pokud se jedná o přípravek určený k jednorázovému použití, lze jej považovat za výrobek s tolerovatelným rizikem i v tomto případě a za předpokladu, že je mikrobiologická kvalita ověřena v čase jeho uvolnění na trh. [29]

Nejprve byla připravena živná půda, která byla rozlita do sterilních Petriho misek o průměru 70 mm, kdy každá miska obsahovala přibližně 10 ml živné půdy. Petriho misky byly následně uchovávány při teplotě 4 – 6 °C po dobu nanejvýš jednoho týdne. Na Petriho misky s médiem se poté nanášely zaočkované vzorky pleťových vod metodou roztěru ve vhodných ředěních. Z počátku bylo použito trojnásobné desítkové ředění, poté bylo ředění upravováno dle potřeby. Stanovení počtu bylo prováděno duplicitně. Odběry vzorků probíhaly v předem daných intervalech, a to po 7, 14 a 28 dnech. Bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byly inkubovány při 37°C po dobu 48 hodin, bakterie *Pseudomonas aeruginosa* při 30°C po dobu 48 hodin. Po celou dobu testu byly vzorky pleťových vod uchovávány při laboratorní teplotě (22,5 ± 2,5 °C) v temnu a suchu.

Stanovení výchozího počtu mikroorganismů N a N_0

Výchozí počet mikroorganismů přítomných v inokulu N jako kolonie tvořících jednotek na mililitr se vypočte podle vztahu (1):

$$N = \bar{C} / (V \times d) \quad (1)$$

Kde je

\bar{C} průměr počtu kolonií ze dvou paralelních ploten;

V objem inokula očkovaného do každé misky [ml];

d ředící faktor počítaného ředění;

N hodnota musí být mezi 1×10^7 KTJ/ml a 1×10^8 KTJ/ml pro bakterie.

Počet mikroorganismů zaočkovaných do přípravku jako počet kolonií tvořících jednotek na mililitr N_0 v čase t_0 se zjistí pomocí vztahu (2):

$$N_0 = N/50 \quad (2)$$

kde je

N_0 hodnota musí být mezi 1×10^5 KTJ/ml a 1×10^6 KTJ/ml pro bakterie.

50 100 μ l inokula do 5 ml pleťové vody

Stanovení počtu mikroorganismů v časech odběru vzorků, N_x

Množství přežívajících mikroorganismů v kontaminovaném vzorku pleťové vody jako počet kolonií tvořících jednotek na mililitr N_x v jednotlivých intervalech odběru vzorků, t_x , s použitím vztahu (3) :

$$N_x = \bar{C}/(V \times d) \quad (3)$$

kde je

\bar{C} průměr počtu kolonií ze dvou paralelních ploten;

V objem inokula očkovaného do každé misky [ml];

d ředící faktor počítaného ředění;

Snížení počtu mikroorganismů

Hodnoty snížení počtu mikroorganismů v logaritmických jednotkách R_x získaných v jednotlivých intervalech odebrání vzorků se vypočítají dle vztahu (4):

$$R_x = \log N_0 - \log N_x \quad (4)$$

kde je

N_0 počet mikroorganismů zaočkovaných v čase t_0 ;

N_x počet přežívajících mikroorganismů v jednotlivých intervalech odběru vzorků, t_x

7.2.3 Měření optické denzity (OD)

Optická denzita (optická hustota) se v mikrobiologii používá za účelem určení koncentrace buněk v suspenzi. Do jisté míry platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací buněk a optickou hustotou. Optickou hustotou se rozumí absorbance daného optického elementu

při dané vlnové délce λ na jednotku vzdálenosti, nebo množství rozptýleného světla daným optickým elementem:

$$OD_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{l} = -\frac{1}{l} \log_{10} T = \frac{1}{l} \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (5)$$

kde je

l délka dráhy paprsku ve vzorku [cm];

A_{λ} absorbance změřená při vlnové délce λ

T transmitance

I_0 intenzita světla dopadajícího

I intenzita světla prošlého

Nejprve bylo do jamek mikrotitrační destičky rozpipetováno po 200 μ l vzorku pleťové vody. Do předem určených jamek byl pipetován vzorek pleťové vody bez antimikrobní látky a do dalších jamek identické množství pleťové vody s různými inhibičními agens. Poté byly jednotlivé vzorky zaočkovány 5 μ l příslušného inokula bakterií. Součástí byla i pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola sloužil sterilní masopeptonový bujón (MPB) bez inhibiční látky zaočkováný inokulem bakterií, růst bakterií tak neovlivňovala žádná antimikrobní látka. Jako negativní kontrola sloužily vzorky pleťových vod s příslušným druhem a koncentrací antimikrobní látky nezaočkované inokulem bakterií, kde nebyl očekáván žádný růst bakterií. Obsah jamek mikrotitračních destiček byl dostatečně promíchán a následně byly destičky kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin. Optická hustota pak byla měřena ve spektrofotometru při vlnové délce, která koreluje s různými fázemi růstu bakterií. Pro práci byla stanovena vlnová délka na 595 nm, při níž se buňky nacházejí v exponenciální (logaritmičké) fázi růstu. Měření bylo prováděno na přístroji Microplate reader TECAN a data vyhodnoceny pomocí softwaru Microplate Manager. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a vneseny do grafu, kdy na osu y byly vyneseny hodnoty optické hustoty a na osu x jednotlivé druhy a koncentrace antimikrobních látek. [78]

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výběr konzervační látky je komplikovaná záležitost a ve své podstatě neexistuje látka, která by mohla být označena za ideální. V nedávné době se staly monoacylglyceroly předmětem zkoumání pro své antimikrobní účinky. Výsledky studií prokázaly inhibiční účinky na některé nežádoucí mikroorganismy, které mohou být srovnatelné s účinky konzervačních látek běžně používaných v kosmetických přípravcích. V kosmetickém průmyslu je kladen zvláštní důraz nejen na mikrobiologickou kvalitu výrobku, ale rovněž na snášenlivost použitých antimikrobních přísad. Z tohoto důvodu byly v praktické části diplomové práce sledovány antimikrobní účinky vybraných monoacylglycerolů a pro srovnání také dvou typů parabenů, jakožto běžně používaných konzervačních přísad, jež bývají často kritizovány kvůli svým domnělým negativním účinkům na lidskou pokožku a zdraví. Antimikrobní účinky testovaných látek byly pozorovány v modelových vzorcích pleťových vod. Testovanými mikroorganismy byly patogenní druhy bakterií. K posouzení inhibičních účinků sloužil zátěžový test účinnosti konzervace a měření optické hustoty bakterií.

8.1 Vliv vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií

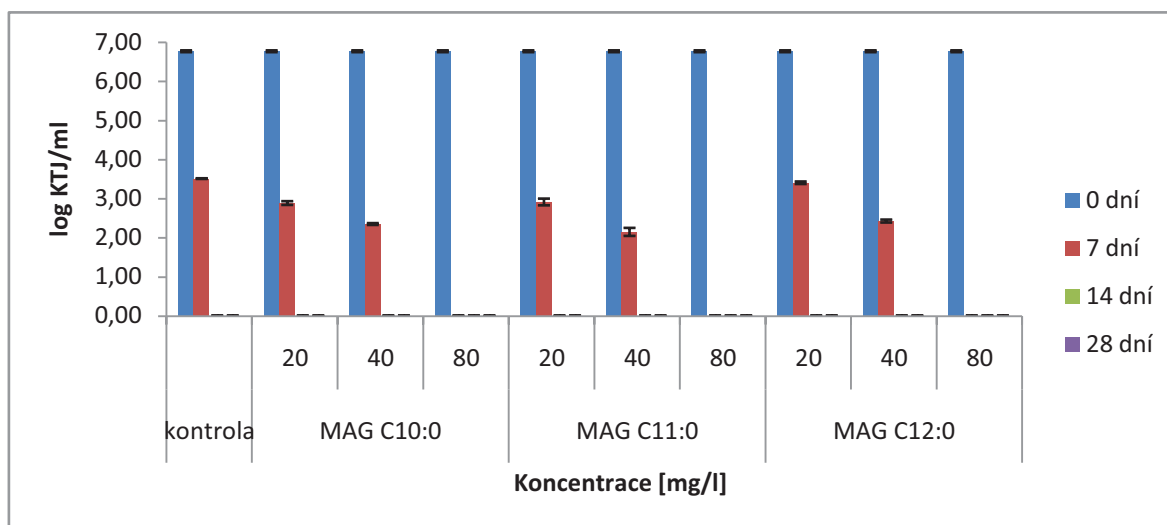
Pro experimentální část byly vybrány 3 typy monoacylglycerolů lišící se navázanou mastnou kyselinou. Dva typy MAG se sudým počtem atomů uhlíků, konkrétně MAG kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}, monokaprin) a MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}, monolaurin), které patří mezi dobře prostudované MAG. Většina studií je zaměřena právě na MAG se sudým počtem uhlíků, byl proto jako třetí typ vybrán méně obvyklý MAG s lichým počtem atomů uhlíků, MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:0}, monoundekanoylglycerol).

Inhibiční účinky monoacylglycerolů byly sledovány na dvou gramnegativních bakteriích, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, a jedné grampozitivní bakterii, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. Jedná se o mikroorganismy patřící mezi nejčastější kontaminanty v kosmetických prostředcích. Jejich výskyt v kosmetickém výrobku je nežádoucí. Výběr mikroorganismů odpovídal české technické normě pro hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku ČSN EN ISO 11930.

8.1.1 Vliv monoacylglycerolů na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Inhibiční účinky testovaných monoacylglycerolů byly pozorovány ve třech koncentracích 20 mg/l, 40 mg/l a 80mg/l. Inhibiční účinky monoacylglycerolů byly vyjádřeny jako

log KTJ/ml a znázorněny graficky na Obr. 11. Na obrázku jsou graficky znázorněny výsledky celého zátěžového testu pro jednotlivé MAG v daných intervalech odběru vzorků.



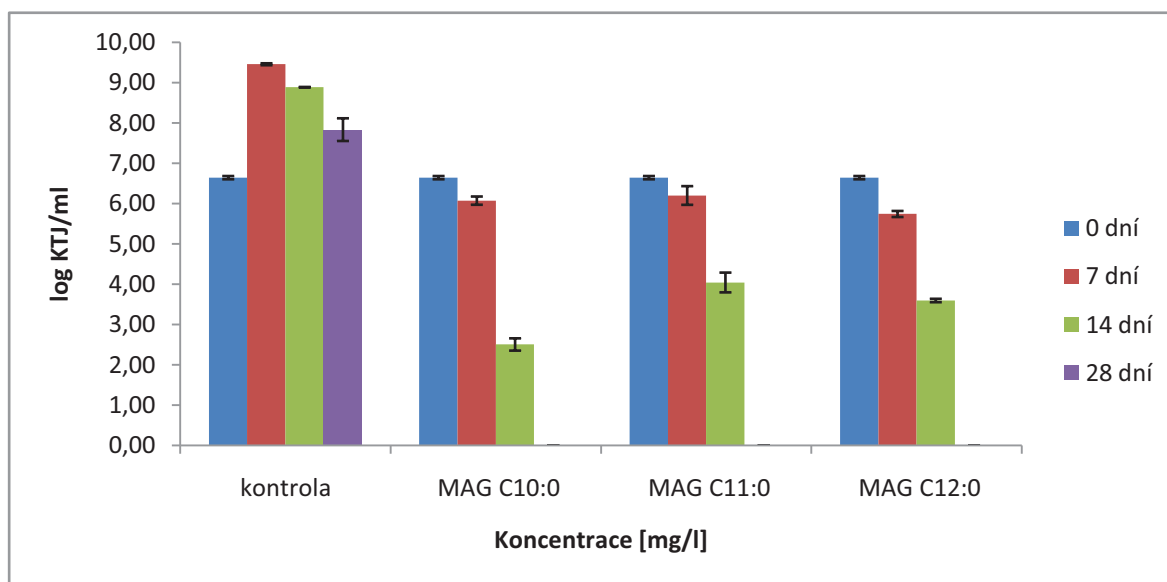
Obr. 11. Vliv monoacylglycerolů na růst bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6.

Počáteční počet buněk bakterie *Escherichia coli*, který byl vnesen do vzorků pleťových vod, byl $6,76 \pm 0,02$ log KTJ/ml. Součástí testu byla pozitivní kontrola, kdy byl zaočkován stejným inokulem bakterie vzorek pleťové vody bez obsahu antimikrobní látky. Již v samotném kontrolním vzorku byl patrný značný pokles počtu buněk po 7 dnech skladování. Počet buněk klesl po 7 dnech více téměř o polovinu na $3,51 \pm 0,01$ log KTJ/ml. Všechny studované monoacylglyceroly vykazovaly inhibiční účinky při porovnání s hodnotou CPM v kontrolním vzorku po 7 dnech skladování. Po 14 a 28 dnech skladování nebyl detekován nárůst bakterie *Escherichia coli* v žádném z příslušných vzorků, a to ani v kontrolním. S narůstající koncentrací došlo u všech studovaných MAG k zesílení antimikrobní aktivity. V koncentraci 80 mg/l nebyl po 7 dnech inkubace pozorován nárůst bakterie *Escherichia coli* u žádného ze studovaných MAG. Nejvyšší pokles hodnoty log KTJ/ml byl pak zaznamenán u MAG kyseliny undekanové s lichým počtem atomů uhlíků v molekule ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) v koncentraci 40 mg/l na hodnotu $2,15 \pm 0,01$ log KTJ/ml po 7 dnech skladování. V této koncentraci pak další nejlepší inhibiční účinky vykazoval MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$) s CPM $2,35 \pm 0,02$ log KTJ/ml a jako nejméně účinný se v této koncentraci prokázal MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$) s CPM $2,42 \pm 0,01$ log KTJ/ml. MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$) se projevil jako nejméně účinný také v koncentraci 20 mg/l, kdy vykazoval hodnotu $3,40 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Naproti tomu MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) byl v koncentraci 20 mg/l již méně účinný než MAG kyseliny kaprinové

(MAG_{C10:0}) ve stejné koncentraci. Počet životaschopných mikroorganismů po 7 dnech skladování byl v případě MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) v koncentraci 20 mg/l $2,91 \pm 0,09$ log KTJ/ml a pro MAG kyseliny kaprinové (MAG_{C10:0}) ve stejné koncentraci $2,88 \pm 0,05$ log KTJ/ml

Výše zmíněný pokles počtu mikroorganismů v kontrolním vzorku naznačuje skutečnost, že samotné složení pleťové vody představuje nepříznivé prostředí pro růst daného kmene bakterie. V každém intervalu odběru vzorku byla ve vybraném vzorku změřena hodnota pH, kvůli možnému ovlivnění pH činností příslušné bakterie. Po 7 dnech skladování klesla hodnota pH na 4,98 a v dalších intervalech pak byla naměřena hodnota pH 4,97.

Ačkoliv nepřítomnost testovaných bakterií ve vzorcích pleťových vod s pH 5,6 představovala dokonalou antimikrobiální ochranu přípravku, ze získaných výsledků nemohly být dostatečně porovnány inhibiční účinky jednotlivých MAG mezi sebou. Z tohoto důvodu byla připravena nová sada vzorků pleťových vod s upraveným pH na hodnotu 7. Nová sada vzorků byla tvořena vzorky pleťových vod s upraveným pH a s obsahem testovaných druhů MAG pouze v nejnižší koncentraci. Výsledky zátěžového testu těchto vzorků pleťových vod jsou graficky znázorněny na Obr. 12.



Obr. 12. Vliv monoacylglycerolů v koncentraci 20 mg/l na růst bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 7.

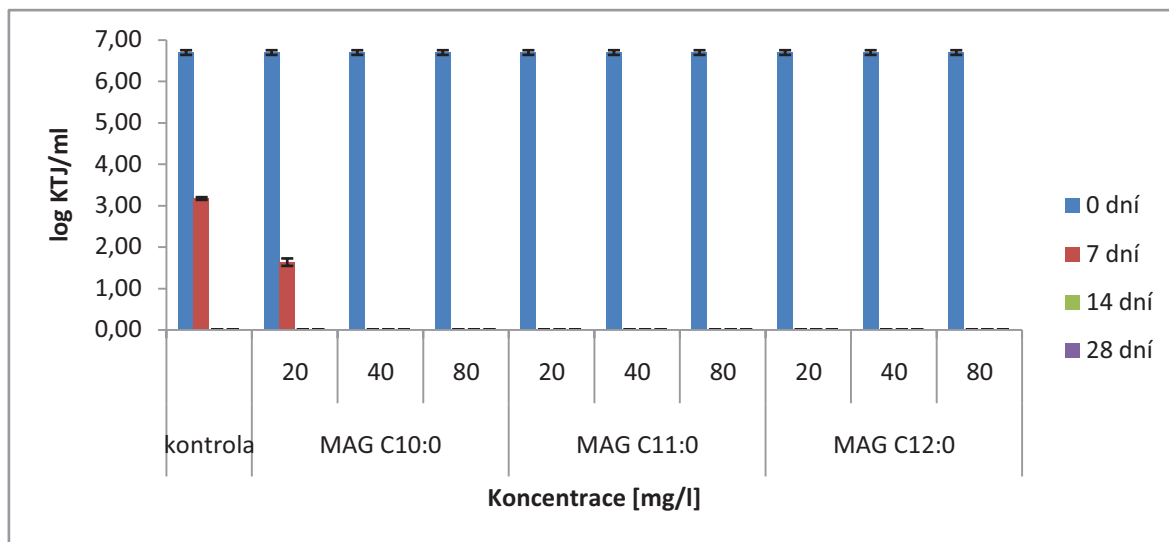
Počáteční počet mikroorganismů přítomný v čase t_0 ve vzorcích pleťové vody s upravenou hodnotou pH byl $6,64 \pm 0,04$ log KTJ/ml. Po 7 dnech skladování bylo pozorováno v kontrolním vzorku pleťové vody bez inhibiční látky navýšení počtu buněk téměř o tři

logaritmické řády až na hodnotu $9,46 \pm 0,02$ log KTJ/ml. Po 14 a 28 dnech skladování se počet buněk v kontrolním vzorku snižoval. Hodnoty CPM byly přesto vyšší než v čase t_0 . Po 28 dnech skladování se počet buněk snížil na hodnotu $7,83 \pm 0,28$ log KTJ/ml, která byla o jeden logaritmický řád vyšší než na počátku testu. Tento výsledek byl zatížen značnou chybou. Přesto bylo možno konstatovat, že při dlouhodobém skladování dochází ke snižování počtu buněk i ve vzorku pleťové vody, který nebyl ovlivněn žádným inhibičním agens. CPM se v kontrolních vzorcích pleťových vod s pH 7 snížil pod hodnotu CPM v čase t_0 až po 28 dnech skladování. Ve srovnání s předešlým testem pak bylo zřejmé, že pH výrobku mělo značný vliv na růst bakterie *Escherichia coli*. Po 7 dnech skladování byla zaznamenána nejvyšší inhibiční aktivita u MAG kyseliny laurové (MAG_{C12:0}), kdy počáteční hodnota CPM klesla skoro o tři logaritmické řády na hodnotu $5,74 \pm 0,07$ log KTJ/ml. Následoval MAG kyseliny kaprinové (MAG_{C10:0}) s hodnotou $6,07 \pm 0,10$ log KTJ/ml a nejnižší inhibiční účinek byl pozorován u MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) s hodnotou $6,20 \pm 0,23$ log KTJ/ml. Tyto výsledky jsou rozdílné od výsledků předešlého testu na vzorcích pleťových vod s pH 5,6, to bylo vysvětleno možným synergickým účinkem mezi MAG a kyselým pH. Pořadí MAG se změnilo po 14 dnech skladování, kdy nejvyššího poklesu CPM bylo dosaženo ve vzorku s MAG kyseliny kaprinové (MAG_{C10:0}) a naopak nejmenší pokles vykazoval vzorek s MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}). Po 28 dnech skladování již všechny vzorky vykazovaly nulové hodnoty CPM. Ve vzorcích pleťových vod s pH 5,6 došlo k úplné inhibici u všech testovaných MAG již po 14 dnech skladování. Všechny hodnoty CPM v log KTJ/ml jsou uvedeny v příloze III.

V obou případech byly prokázány inhibiční účinky u všech studovaných monoacylglycerolů. Ke stejnému závěru došli i Buňková a kol. [164, s. 37 – 38], kterým se ve své studii podařilo prokázat významné snížení růstu *Escherichia coli* v přítomnosti identických MAG, jako byly použity v této práci. Naopak byl tento výsledek v rozporu s výsledky studie, kterou provedli Růžička a kol. [167, s. 330] a neprokázali žádný účinek MAG_{C10:0} a MAG_{C12:0} proti růstu bakterie *Escherichia coli*. Za účinnou koncentraci MAG, která dokázala potlačit růst bakterie *Escherichia coli* v obou sadách vzorků, byla stanovena koncentrace 20 mg/l.

8.1.2 Vliv monoacylglycerolů na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Pro studium vlivu MAG na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 byly opět použity tři koncentrace MAG, 20 mg/l, 40 mg/l a 80 mg/l. Výsledky zátěžového testu byly vyjádřeny graficky na Obr. 13. v hodnotách log KTJ/ml v jednotlivých intervalech odběrů vzorků.

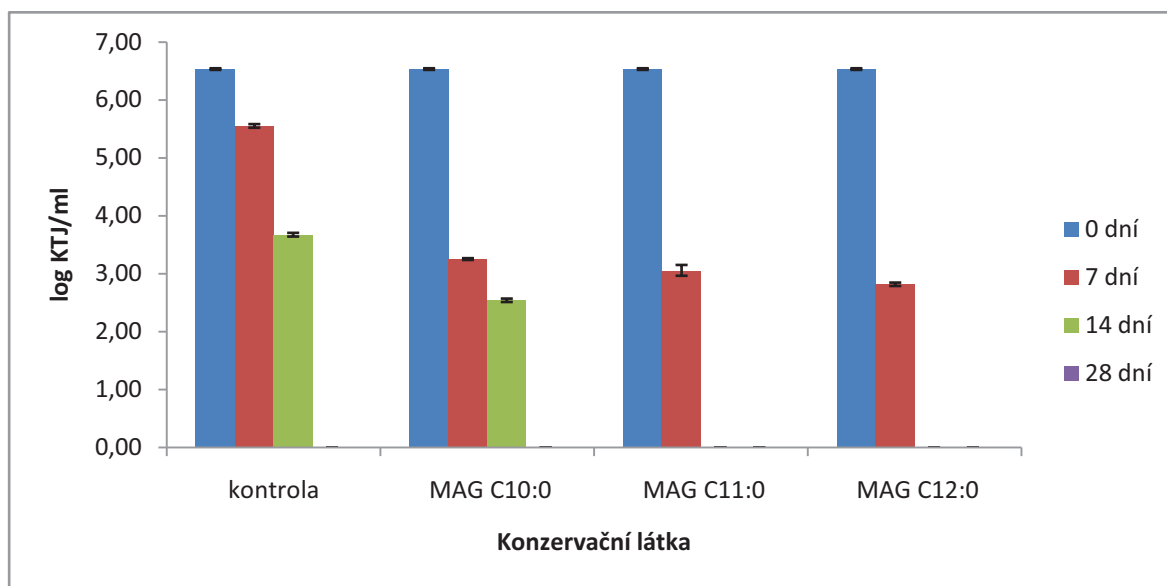


Obr. 13. Vliv monoacylglycerolů na růst bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6.

Počáteční počet buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* v čase t_0 ve vzorcích pleťových vod byl $6,69 \pm 0,06$ log KTJ/ml. Výrazný pokles počátečního počtu buněk byl zaznamenán u samotného kontrolního vzorku (bez antimikrobní látky) po 7 dnech skladování, kdy hodnota klesla přibližně o pět logaritmičeských řádů na hodnotu $3,51 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Značný pokles počátečního počtu byl registrován také ve vzorku pleťové vody s obsahem MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$) v koncentraci 20 mg/l, kdy po 7 dnech skladování obsahoval tento vzorek $1,63 \pm 0,09$ log KTJ/ml. Ve všech ostatních vzorcích došlo již v 7 dnu skladování ke kompletní inhibici růstu. Nejlepších výsledků tedy bylo dosaženo s MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$) a MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$). MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$) kompletně inhiboval růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 v koncentracích 40 mg/l a 80 mg/l. V daných intervalech odběru vzorků byla opět u vybraného vzorku měřena hodnota pH. Po 7 dnech skladování kleslo pH na 4,98, ve 14. a 28. dnu již hodnota neklesala. Skutečnost, že došlo

ke snížení pH, může vysvětlovat výrazný pokles počtu buněk v samotném kontrolním vzorku.

Pro přesnější srovnání antimikrobní aktivity jednotlivých MAG na bakterii *Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953* byl proveden zátěžový test účinnosti na druhé sadě vzorků, obsahující vzorky pleťové vody s upraveným pH na hodnotu 7. Výsledky testu prováděného na druhé sadě vzorků znázorňuje Obr. 14.



Obr. 14. Vliv monoacylglycerolů v koncentraci 20 mg/l na růst bakterie *Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953* ve vzorku pleťové vody o pH 7

V čase t_0 byl počet buněk ve všech vzorcích $6,53 \pm 0,01$ log KTJ/ml. V kontrolním vzorku pleťové vody látka došlo ke snížení CPM na $5,55 \pm 0,03$ log KTJ/ml po 7 dnech skladování a po 14 dnech k dalšímu snížení na $3,67 \pm 0,03$ log KTJ/ml. V 28 dnu již nebyl pozorován žádný nárůst bakterie *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Po 7 dnech skladování byl pozorován pokles CPM u všech studovaných MAG na přibližně polovinu počátečního počtu buněk. Nejlepší antimikrobní účinky vykazoval MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$), u něhož byl detekován pokles CPM o šest logaritmičeských řádů na hodnotu $2,82 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Nejmenší inhibiční účinek byl registrován u MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$), stejně jako ve vzorcích pleťových vod s pH 5,6. MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$) prokázal úplnou inhibici až v 28. dnu skladování, zatímco u ostatních dvou druhů MAG byla úplná inhibice detekována ve 14. dni skladování. Výsledky jsou shodné s výsledky studie Buňkové a kol. [59, s. 38], ve které byly použité MAG seřazeny podle inhibičních účinků na grampozitivní bakterie shodně jako v předkládané práci, a to násle-

dovně: $MAG_{C_{12:0}} > MAG_{C_{11:0}} > MAG_{C_{10:0}}$. Aktivitu MAG kyseliny laurové ($MAG_{C_{12:0}}$) proti grampozitivní bakterii *S. aureus* podporují i studie dalších autorů (Preuss a kol. [72, s. 32], Růžička a kol. [60, s. 330]). Bakteriostatický účinek monoacylglycerolu s lichým počtem atomů uhlíku, konkrétně $MAG_{C_{11:0}}$ byl potvrzen i studií Doležalové a kol. [43] Jednotlivé hodnoty CPM v log KTJ/ml uvádí příloha III.

Z porovnání výsledků zátěžového testu na vzorcích pleťových vod s pH 5,6 a zátěžového testu na vzorcích pleťových vod s pH 7 opět vyplývá, že kombinací monoacylglycerolů s nízkým pH se uplatňuje synergický efekt.

8.1.3 Vliv monoacylglycerolů na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Antimikrobní účinky na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly také testovány v koncentracích MAG 20, 40 a 80 mg/l. Výsledky zátěžového testu byly zaznamenány formou tabulky (viz Tab. 2.)

Tab. 2. Vliv monoacylglycerolů na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6

Typ MAG	Koncentrace MAG [mg/l]	T [den]			
		0	7	14	28
		CPM [log KTJ/ml]			
kontrola	–	6,69 ± 0,02	×	×	×
C _{10:0}	20		×	×	×
	40		×	×	×
	80		×	×	×
C _{11:0}	20		×	×	×
	40		×	×	×
	80		×	×	×
C _{12:0}	20		×	×	×
	40		×	×	×
	80		×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

Na počátku zátěžového testu v čase t_0 byl počet buněk bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v $6,69 \pm 0,02$ log KTJ/ml. Ačkoliv v mnoha studiích (Růžička a kol., 2003; Doležalová a kol., 2010; Buňková a kol., 2011 a další) byla prokázána značná odolnost této gramnegativní bakterie na testované druhy monoacylglycerolů, v experimentální části této práce byla zaznamenána kompletní inhibice růstu již po 7 dnech skladování u všech vzorků, včetně kontrolního vzorku, který obsahoval pouze roztok pleťové vody bez antimikrobní látky.

Stejně jako u předešlých vzorků bylo i v těchto změřeno pH. Hodnota pH i v tomto případě klesla z počáteční hodnoty pH 5,6 po 7 dnech skladování na pH 4,86, která již zůstala nezměněná po celou dobu testu.

Vliv monoacylglycerolů na růst bakterie *P. aeruginosa* byl zkoumán také v sadě vzorků pleťových vod s upraveným pH na neutrální hodnotu. Výsledky zátěžového testu uskutečněného v těchto modelových vzorcích pleťových vod byly zaznamenány do tabulky (viz Tab. 3.)

Tab. 3. Vliv monoacylglycerolů na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 7

Typ MAG	T [den]			
	0	7	14	28
	CPM [log KTJ/ml]			
kontrola	6,87 ± 0,03	×	×	×
C _{10:0}		×	×	×
C _{11:0}		×	×	×
C _{12:0}		×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

V druhé sadě vzorků pleťových vod s upravenou hodnotou pH byl počáteční počet buněk $6,87 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Přesto, že pH 7 by mělo být pro růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa* příznivé, nebyl opět v žádném ze vzorků zaznamenán růst této bakterie, včetně kontrolního vzorku. Vzhledem k faktu, že nebyl detekován žádný nárůst ani ve vzorcích pleťových vod, které neobsahovaly antimikrobní látku, bylo usuzováno, že pravděpodobně samotné složení základní receptury pleťové vody bylo nevhodné pro růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Příčinou mohly být například přítomné tenzidy (Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropylbetain), které samy vykazují určité antimikrobní účinky. [103]

8.2 Vliv vybraných parabenů na růst bakterií

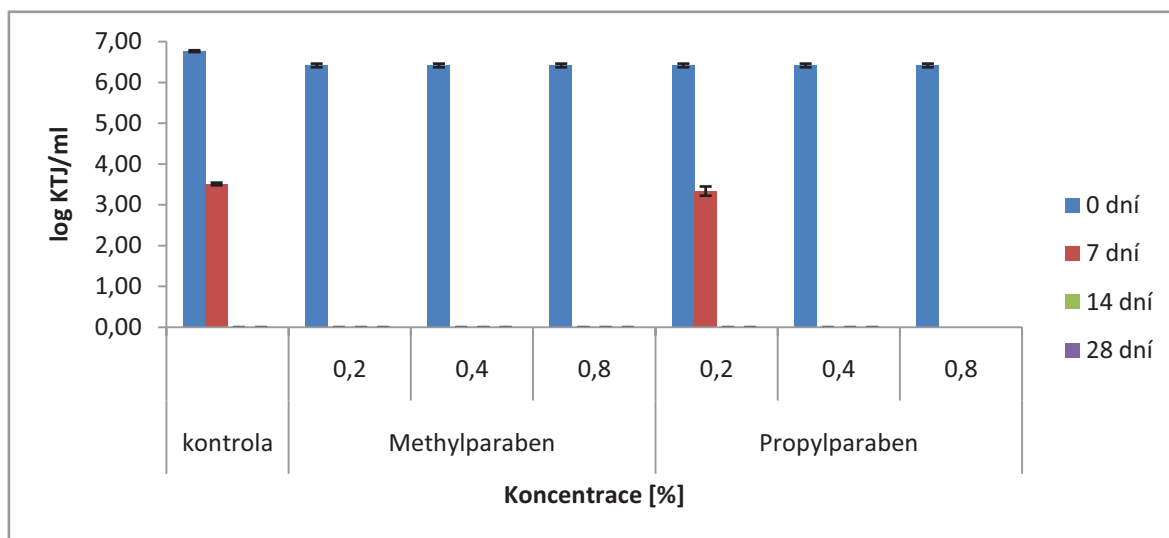
K testování účinnosti konzervace kosmetických přípravků s použitím syntetických konzervačních látek byly vybrány dva typy alkylesterů kyseliny p-hydroxybenzoové kyseliny. Důvodem výběru z této skupiny antimikrobních látek byl jejich, poslední dobou často diskutovaný, negativní vliv na zdraví a pokožku člověka a tedy tendence jejich nahrazení jinými šetrnějšími látkami (např. monoacylglyceroly). Jednou z nejběžněji používaných forem ke konzervaci kosmetických přípravků je methylparaben, proto byl pro praktickou

část zvolen právě tento alkylester kyseliny p-hydroxybenzoové. [130] Jako druhý typ byl vybrán alkylester s vyšším počtem atomů uhlíku v řetězci a také často používaný propylester kyseliny p-hydroxybenzoové (propylparaben). Celkem byly vybrány typy parabenů aplikovány ve třech koncentracích, které byly zvoleny v souladu s platnou legislativou. [101]

Inhibiční účinky byly testovány na třech vybraných bakteriích, jejichž výskyt je v kosmetických přípravcích nepřipustný. Vybrány byly dvě gramnegativní bakterie, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, a jedna grampozitivní bakterie, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. K testu inhibiční aktivity byl použit dlouhodobý zátěžový test účinnosti konzervace.

8.2.1 Vliv parabenů na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Vliv na růst bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 byl pozorován za použití následujících koncentrací parabenů: 0,2, 0,4 a 0,8 %. Případné inhibiční účinky byly vyhodnoceny jako log KTJ/ml a znázorněny v grafické formě na Obr. 15



Obr. 15. Vliv parabenů na růst bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6

Počet buněk v čase t_0 , který byl zaočkován do vzorků pleťových vod s parabenem dosahoval hodnoty $6,41 \pm 0,04$ log KTJ/ml. Kontrolní vzorek pleťové vody obsahoval na počátku testu účinnosti konzervace v čase t_0 $6,76 \pm 0,02$ log KTJ/ml. V tomto vzorku bylo pozorováno snížení CPM na hodnotu $3,51 \pm 0,03$ log KTJ/ml po 7 dnech skladování a ke kompletní inhibici došlo ve 14. dnu skladování, kdy již nebyl pozorován žádný nárůst buněk.

Výborné antimikrobní účinky vykazovaly oba typy parabenů ve všech koncentracích již po 7 dnech skladování. Pouze u propylparabenu v koncentraci 0,2 % nebylo dosaženo kompletní inhibice po 7 dnech skladování, ale došlo ke snížení počáteční hodnoty CPM na hodnotu $3,33 \pm 0,11$ log KTJ/ml. Přesto, že v odborné literatuře se uvádí nižší účinnost na gramnegativní typy bakterií [50], zátěžový test účinnosti konzervace prokázal výborné antimikrobní účinky studovaných parabenů na bakterii *Escherichia coli* ve vzorku pleťové vody. Z uvedeného grafu vyplývá, že lepší inhibiční účinky vykazoval methylparaben. Toto zjištění není v souladu s obecnou teorií (Brannan, 1997; Baumann a kol., 2009; Draeolos, 2010), která uvádí zvyšující se antimikrobní aktivitu s prodlužujícím se uhlikatým řetězcem. Podobně jako při testování monoacylglycerolů byla i ve vzorcích s parabenem změněna hodnota pH. Opět byla zaznamenána nižší hodnota pH než na počátku testu. Hodnota pH v tomto případě klesla po 7 dnech skladování z pH 5,6 na 4,98 a v dalších intervalech pak byla naměřena hodnota pH 4,97. Z důvodu specializace celé práce v první řadě na monoacylglyceroly, bylo ustoupeno od testování antimikrobních účinků parabenů také v pleťové vodě s upraveným pH. Hodnoty CPM v log KTJ/ml jsou uvedeny v příloze III.

8.2.2 Vliv parabenů na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Účinky testovaných parabenů na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 v koncentracích 0,2 %, 0,4 % a 0,8 % jsou zaznamenány v Tab. 4.

Tab. 4. Vliv parabenů na růst grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6

Typ parabenu	Koncentrace parabenu [%]	T [den]			
		0	7	14	28
		CPM [log KTJ/ml]			
kontrola	–	$6,69 \pm 0,06$	$3,51 \pm 0,03$	×	×
MP	0,2	$6,71 \pm 0,03$	×	×	×
	0,4		×	×	×
	0,8		×	×	×
PP	0,2		×	×	×
	0,4		×	×	×
	0,8		×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

Počáteční počet buněk zaočkován do vzorků pleťových vod s parabenem byl $6,71 \pm 0,04$ log KTJ/ml. Kontrolní vzorek (bez antimikrobní látky) obsahoval na počátku

testu v čase t_0 $6,69 \pm 0,06$ log KTJ/ml. Ve všech vzorcích kromě kontrolního byla pozorována kompletní inhibice růstu po 7 dnech skladování. V kontrolním vzorku byl zaznamenán výrazný pokles počátečního počtu buněk po 7 dnech skladování, kdy hodnota klesla přibližně o 3 logaritmické řády na hodnotu $3,51 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Výsledky testu prokázaly výbornou účinnost konzervace pleťových vod s použitím parabenů jako antimikrobiálních látek. Hodnota pH vzorků klesla po 7 dnech skladování na 4,98, poté již zůstala tato hodnota konstantní.

8.2.3 Vliv parabenů na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Pro sledování účinků parabenů na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly zvoleny stejné koncentrace jako u *Escherichia coli* CCM 3954. Výsledky zátěžového testu jsou znázorněny v Tab. 5.

Tab. 5. Vliv parabenů na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6

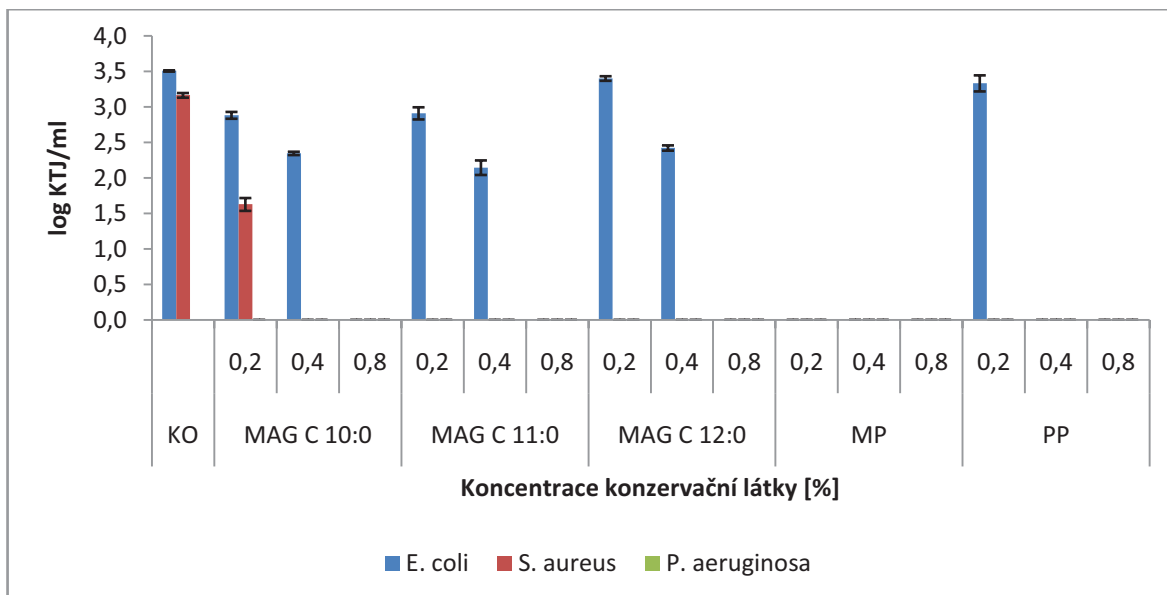
Typ parabenů	Koncentrace parabenů [%]	T [den]			
		0	7	14	28
		CPM [log KTJ/ml]			
kontrola	–	$6,69 \pm 0,02$	×	×	×
MP	0,2	$7,03 \pm 0,03$	×	×	×
	0,4		×	×	×
	0,8		×	×	×
PP	0,2		×	×	×
	0,4		×	×	×
	0,8		×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

Ve vzorcích pleťových vod s parabenem bylo v čase t_0 $7,03 \pm 0,03$ log KTJ/ml. Počáteční počet buněk v kontrolním vzorku byl $6,69 \pm 0,02$ log KTJ/ml. Z tabulky je patrné, že kompletní inhibice nastala u všech vzorků již po 7 dnech skladování. Jelikož nárůst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* opět nebyl detekován ani v kontrolním vzorku, který neobsahoval paraben, lze usuzovat, že složení pleťové vody tvoří nevhodné prostředí pro růst této bakterie.

8.3 Citlivost vybraných bakterií na jednotlivé antimikrobní látky

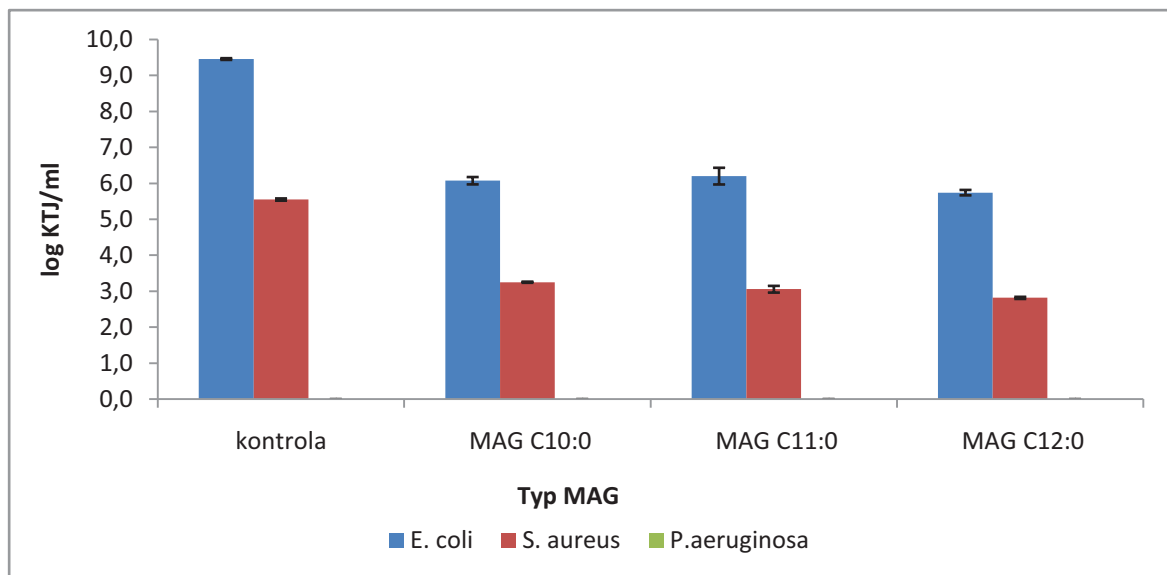
Na Obr. 16. Je graficky vyjádřena citlivost studovaných bakterií na testované antimikrobní látky. Pro grafické znázornění byly použity hodnoty celkového počtu přežívajících buněk po 7 dnech skladování.



Obr. 16. Citlivost bakterií na jednotlivé antimikrobní látky ve vzorku pleťové vody o pH 5,6

Obecně nejvyšší citlivost na všechny použité antimikrobní látky byla prokázána u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. U této bakterie byla předpokládána citlivost již na samotnou formulaci pleťové vody, protože vykazovala nulové hodnoty v kontrolním vzorku, který byl tvořen základní recepturou pleťové vody bez přídavku antimikrobní látky. Další testovanou bakterií byla grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, která vykazovala nejvyšší citlivost na oba typy testovaných parabenů a dva typy monoacylglycerolů, konkrétně $\text{MAG}_{\text{C11:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C12:0}}$ ve všech testovaných koncentracích. Nejméně působil na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* $\text{MAG}_{\text{C10:0}}$ v koncentraci 0,2 %. V ostatních koncentracích tohoto MAG nebyl pozorován žádný nárůst buněk. Jako nejméně citlivá se prokázala gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Tato bakterie vykazovala nejnižší citlivost obecně proti působení monoacylglycerolů v koncentracích 0,2 a 0,4 %. Dále pak také proti působení propylparabenu v koncentraci 0,2 %. Propylparaben v koncentraci 0,2 % dokonce inhiboval růst *Escherichia coli* méně než $\text{MAG}_{\text{C11:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C10:0}}$ příslušné koncentrace.

Citlivost bakterií byla vyhodnocena také pro sadu vzorků pleťových vod s upravenou hodnotou pH na 7. Opětovně byla posuzována citlivost bakterií v log KTJ/ml po 7 dnech skladování. Předmětem předkládané práce bylo především studium monoacylglycerolů, proto ve vzorcích pleťových vod s pH 7 byla sledována pouze citlivost vybraných bakterií na monoacylglyceroly v koncentraci 0,2 %. Grafické znázornění je zobrazeno na Obr. 17.



Obr. 17. Citlivost bakterií na jednotlivé monoacylglyceroly ve vzorku pleťové vody o pH 7 po 7 dnech skladování

Z Obr. 17. je patrné, že nejvíce z testovaných bakterií byla po 7 dnech skladování inhibována gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, stejně jako ve vzorcích pleťové vody s pH 5,6. Jelikož nárůst této bakterie nebyl detekován ani v kontrolním vzorku, dalo by se říci, že hodnota pH pleťových vod neměla na růst *Pseudomonas aeruginosa* významný vliv. Důvodem inhibice může být již výše zmíněná přítomnost tenzidů s antimikrobními účinky. Gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byla stejně jako v pleťové vodě s pH 5,6 nejodolnější vůči působení monoacylglycerolů. Citlivější byla grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, celkový počet buněk byl ve všech intervalech o tři až čtyři logaritmické řády nižší než celkový počet buněk bakterie *Escherichia coli*. Obecně se uvádí (Zhang a kol., 2009; Lee a kol., 2002) že citlivější k účinku monoacylglycerolů jsou grampozitivní bakterie.

8.4 Doplnkové stanovení antimikrobní aktivity MAG a parabenů

V zájmu detailnějšího testování inhibiční aktivity použitých antimikrobních látek bylo přistoupeno k testování i jinou metodou než pomocí dlouhodobého zátěžového testu. Doplnkovou metodou bylo měření optické denzity bakterií. Na rozdíl od kultivačních metod, měření optické denzity je poměrně rychlé a nenáročné na objem použitého materiálu. Značnou výhodou je bezpochyby objektivnost metody. Na rozdíl od metod kultivačních, kde se počet kolonií počítá své pomocí a lze snadno udělat chybu, měření optické denzity je prováděno přístrojem a vyhodnocován příslušným softwarem, možnost chyby je snížena na minimum. [29], [78]

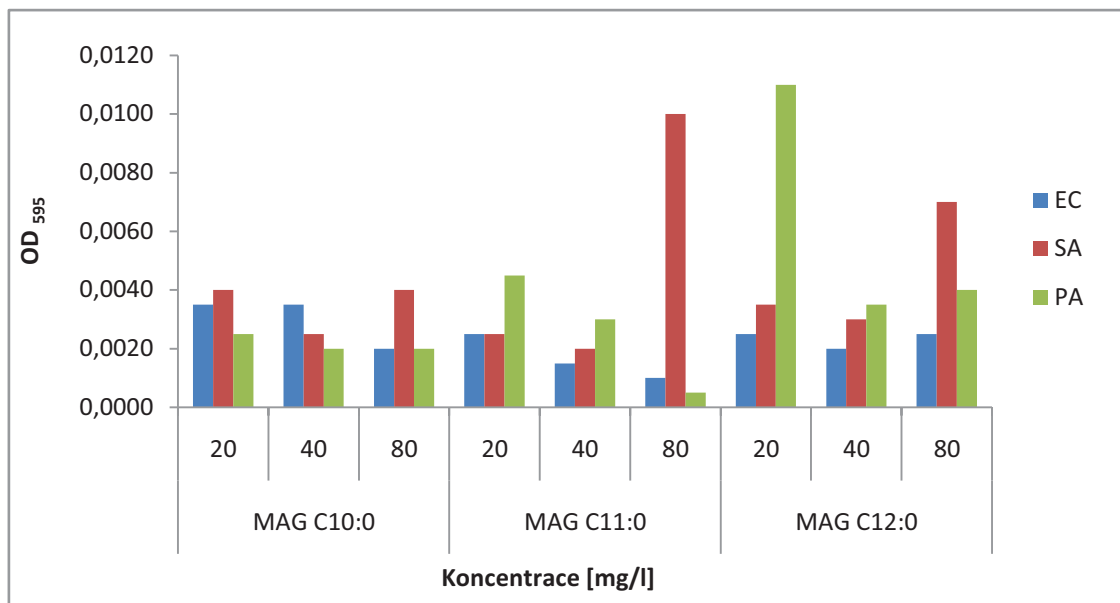
Z lineární závislosti optické denzity a koncentrace buněk lze zjistit míru účinnosti jednotlivých antimikrobních látek. [78] Měření optické denzity bylo prováděno na vzorcích pleťových vod po 24-ti hodinách kultivace při 30 °C. Optická denzita byla měřena při vlnové délce 595 nm.

8.4.1 Antimikrobní aktivita monoacylglycerolů

Vliv testovaných monoacylglycerolů ve vzorcích pleťových vod na příslušné bakterie vyjádřený v hodnotách optické denzity bakterií znázorňuje Obr. 18. Optická denzita bakterií byla měřena ve vzorcích pleťových vod s obsahem monoacylglycerolů jako antimikrobní přísady ve třech koncentracích (20, 40 a 80 mg/l) při vlnové délce 595 nm (OD_{595nm}). Součástí testu byla i pozitivní kontrola v masopeptonovém bujónu, který představoval vhodné podmínky pro růst této bakterie. Kontrola sloužila jako vzor růstu bakterie za normálních podmínek bez ovlivnění jakýmkoli inhibičním faktorem. Hodnoty optické denzity jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6. Hodnoty optické denzity mikroorganismů v masopeptonovém bujónu

Mikroorganismus	OD_{595nm}
<i>Escherichia coli</i>	0,58
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,15



Obr. 18. Hodnoty optické denzity bakterií po 24-ti hodinách kultivace ve vzorcích pleťové vody o pH 5,6

Po 24-ti hodinové kultivaci byly detekovány nižší hodnoty koncentrace buněk u všech mikroorganismů ve všech vzorcích pleťových vod oproti koncentraci buněk inokula daných bakterií v masopeptonovém bujónu. K úplné inhibici růstu nedošlo v žádném z testovaných vzorků. Nejnižší hodnoty koncentrace buněk byly zaznamenány ve vzorku pleťové vody zaočkované gramnegativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa* s obsahem monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) v koncentraci 80 mg/l. Koncentrace buněk *Pseudomonas aeruginosa* se snižovala se zvyšující se koncentrací u vzorků pleťových vod s MAG kyseliny kaprinové (MAG_{C10:0}) a MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}), přičemž MAG_{C10:0} byl účinnější v koncentracích 20 a 40 mg/l. Nejméně inhiboval danou bakterii monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG_{C12:0}). Nejvyšší zákal byl detekován ve vzorku s 20 mg/l tohoto monoacylglycerolu. Zároveň byl pozorován vyšší zákal ve vzorku s koncentrací 80 mg/l MAG_{C12:0} než ve vzorku o koncentraci 40 mg/l. Stejná situace byla registrována u všech testovaných bakterií ve vzorku s identickým MAG. Příčinou tohoto jevu může být schopnost některých bakterií při použití vyšších koncentrací MAG využívat uhlík z jejich molekuly jako potenciální zdroj živin. [58]

Růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli* nejlépe blokoval monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) ve všech použitých koncentracích. Se zvyšující se koncentrací daného MAG se inhibiční účinek na *Escherichia coli* zvětšoval. Snižování zákalu s rostoucí koncentrací bylo zaznamenáno také u MAG_{C10:0}. V koncentracích 20 a 40 mg/l

byl proti *Escherichia coli* účinnější $\text{MAG}_{\text{C12:0}}$ více než monoacylglycerol s nižším počtem atomů uhlíku $\text{MAG}_{\text{C10:0}}$.

Nejnižší hodnoty optické denzity gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* byly zaznamenány ve vzorcích pleťových vod s obsahem $\text{MAG}_{\text{C11:0}}$ o koncentraci 20 a 40 mg/l. V koncentracích 80 mg/l byly naměřeny hodnoty optické denzity vyšší než v nižších koncentracích u všech testovaných monoacylglycerolů. Důvodem vyšší koncentrace buněk může být již výše zmíněná schopnost bakterií využívat uhlík z molekuly MAG jako zdroj živin. [58]

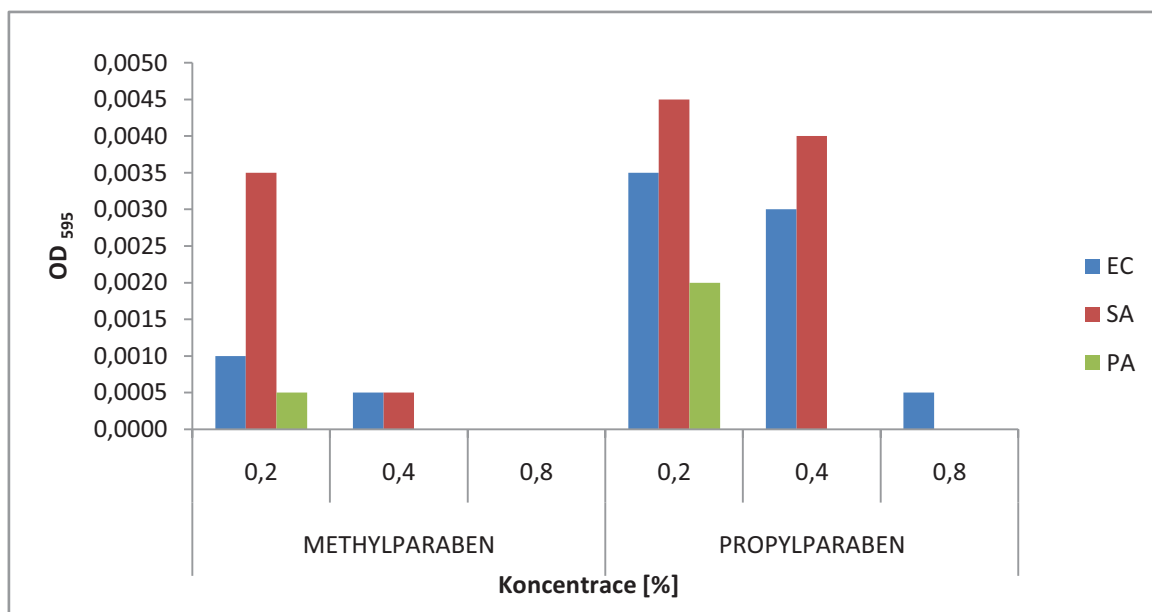
Ve srovnání s výsledky zátěžového testu bylo zjištěno následující. V zátěžovém testu inhiboval bakterii *Escherichia coli* nejlépe ze všech testovaných monoacylglycerolů v koncentraci 40 mg/l $\text{MAG}_{\text{C11:0}}$, stejného závěru bylo dosaženo i v případě testování účinnosti metodou měření optické denzity. Dalším shodným výsledkem obou metod bylo, že nejslabší antimikrobní účinek na bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* vykazoval $\text{MAG}_{\text{C10:0}}$ v koncentraci 20 mg/l. Zatím co, metodou zátěžového testu se projevila jako nejvíce odolná bakterie *Escherichia coli*, metodou měření optické denzity se tato bakterie jevila jako nejcitlivější. Podobně tomu bylo i v případě bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, která v zátěžovém testu vycházela jako poměrně citlivá k působení monoacylglycerolů, avšak metodou měření optické denzity se ukázala jako relativně odolná. Tyto rozpor by bylo možné připsat na vrub časovým rozdílům v organizaci těchto dvou experimentálních metod. Zátěžový test je principiálně dlouhodobým testem, u kterého není důležitý okamžitý inhibiční vliv na mikroorganismy. Cílem zátěžového testu je prokázat či vyvrátit dlouhodobě udržitelný inhibiční účinek. Během 28 dnů inkubace vzniká prostor pro adaptaci mikrobiální populace. Naproti tomu měření optické denzity v mikrotitračních destičkách po 24 hodinách kultivace je vhodné spíše pro stanovení inhibičního účinku, který nastává okamžitě.

8.4.2 Antimikrobní aktivita parabenů

Vliv parabenů jakožto antimikrobiálních přísad ve vzorcích pleťových vod na příslušné bakterie je zobrazen na Obr. 19. Vliv parabenů byl vyjádřen jako hodnoty optické denzity bakterií naměřené ve vzorcích pleťových vod s obsahem parabenů jako antimikrobiální přísady ve třech koncentracích (0,2 %, 0,4 % a 0,8 %) při vlnové délce 595 nm ($\text{OD}_{595\text{nm}}$). Současně byla připravena i pozitivní kontrola v masopeptonovém bujónu, jejíž hodnoty naměřené optické denzity uvádí Tab. 7.

Tab. 7. Hodnoty optické denzity mikroorganismů v masopeptonovém bujónu

Mikroorganismus	OD _{595nm}
<i>Escherichia coli</i>	0,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,37



Obr. 19. Hodnoty optické denzity bakterií po 24-ti hodinách kultivace ve vzorcích pleťové vody o pH 5,6

Naměřené hodnoty optické denzity testovaných bakterií ve všech vzorcích pleťových vod byly významně nižší oproti naměřeným hodnotám optické denzity inokula příslušných bakterií v masopeptonovém bujónu. Z Obr. 19 je zjevné, že nejcitlivější bakterií proti působení parabenů byla gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Stejného závěru bylo dosaženo i v zátěžovém testu účinnosti konzervace. Ke kompletní inhibici *Pseudomonas aeruginosa* došlo ve vzorcích pleťových vod s obsahem methylparabenu v koncentraci 0,4 a 0,8 % a s obsahem propylparabenu také v koncentracích 0,4 a 0,8 %. V koncentraci 0,2 % se jako účinnější vůči *Pseudomonas aeruginosa* prokázal methylparaben.

Nejvyšší hodnoty optické denzity byly naměřeny ve vzorcích pleťových vod zaočkovaných grampozitivní bakterií *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Vysoké hodnoty optické denzity značí malou inhibiční aktivitu. Nejmenší inhibiční aktivita na *Staphylococcus aureus*

subsp. *aureus* byla pozorována u propylparabenu v koncentraci 0,2 a 0,4 % a u methylparabenu v koncentraci 0,2 %.

Na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* nejlépe působil methylparaben ve všech použitých koncentracích, což opět potvrzují i výsledky získané metodou zátěžového testu účinnosti konzervace. V koncentraci methylparabenu 0,8 % byla dokonce zaznamenána kompletní inhibice. Ve vzorcích pleťových vod s propylparabenem jako konzervační látkou nebyla detekována kompletní inhibice v žádné z použitých koncentrací. Hodnoty optické denzity však s rostoucí koncentrací propylparabenu klesaly. Obecně lze konstatovat, že lepší inhibiční účinky vykazoval na všechny testované bakterie methylparaben.

8.5 Zhodnocení antimikrobiální ochrany

Pro zjištění zda připravená pleťová voda je chráněna proti růstu mikroorganismů, které by mohly představovat potenciální riziko pro uživatele, byla vypočtena hodnota logaritmičeského snížení v každém intervalu odběru pro každý kmen mikroorganismu. Následně byly získané hodnoty porovnány s hodnotícími kritérii pro test účinnosti konzervace (Tab. 8.) obsaženými v české technické normě pro hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku.

Tab. 8. Hodnotící kritéria pro test účinnosti konzervace

Požadované hodnoty snížení v log			
Mikroorganizmy	Bakterie		
	T7	T14	T28
Interval			
Kritéria A	≥3	≥3 NI	≥3 NI
Kritéria B	Neprovedeno	≥3	≥3 NI

NI...žádné zvýšení počtu od předchozího intervalu

Nejprve byla zhodnocena antimikrobiální ochrana pleťových vod s pH 5,6 s obsahem monoacylglycerolů jakožto antimikrobní přísadou. Výsledky logaritmičeského snížení u pleťových vod s pH 5,6 jsou uvedeny v Tab. 9. Výsledky byly porovnávány pouze s kritérii A, protože nebyly prokázány kontrolní faktory nevztahující se ke složení přípravku.

Tab. 9. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 5,6 s MAG

Antimikrobní látka	Koncentrace [mg/l]	Mikroorganismus								
		EC			SA			PA		
		R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
bez AL	–	3	6	6	3	6	6	3	6	6
MAG C10:0	20	4	6	6	5	6	6	7	7	7
	40	4	6	6	6	6	6	7	7	7
	80	6	6	6	6	6	6	7	7	7
MAG C11:0	20	4	6	6	6	6	6	7	7	7
	40	4	6	6	6	6	6	7	7	7
	80	6	6	6	6	6	6	7	7	7
MAG C12:0	20	3	6	6	6	6	6	7	7	7
	40	4	6	6	6	6	6	7	7	7
	80	6	6	6	6	6	6	7	7	7

Porovnáním hodnot snížení s kritérii vyžadovaných v intervalu bylo dospěno k závěru, že modelové vzorky pleťových vod s pH 5,6 s monoacylglyceroly jako antimikrobními látkami, by tato kritéria splňovaly v každém intervalu pro každý kmen bakterií. Dokonce samotná základní formulace pleťové vody se osvědčila jako mikrobiologicky vyhovující, tedy chráněná proti pomnožení mikrobů, jež by mohli představovat potenciální riziko pro spotřebitele, a není potřeba zvažovat žádné další faktory. Nejmenší ještě přijatelnou hodnotu vykazovaly vzorky pleťové vody s MAG_{C12:0} v koncentraci 20 mg/l zaočkované bakterií *Escherichia coli* po 7 dnech skladování a dále vzorky pleťových vod bez obsahu antimikrobní látky po 7 dnech skladování zaočkované jednotlivě všemi druhy testovaných bakterií.

Dále byla zhodnocena také antimikrobiální ochrana pleťových vod s pH 5,6, kde antimikrobní přísadu tvořili parabeny. Výsledky logaritmického snížení jsou znázorněny v Tab. 10. Výsledky byly rovněž porovnány pouze s kritérii A.

Tab. 10. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 5,6 s parabeny

Konzervační látka	Koncentrace [%]	Mikroorganismus								
		EC			SA			PA		
		R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
bez KL	–	3	6	6	3	6	6	3	6	6
MP	0,2	6	6	6	7	7	7	7	7	7
	0,4	6	6	6	7	7	7	7	7	7
	0,8	6	6	6	7	7	7	7	7	7
PP	0,2	3	6	6	7	7	7	7	7	7
	0,4	6	6	6	7	7	7	7	7	7
	0,8	6	6	6	7	7	7	7	7	7

Výsledky uvedené v Tab. 10. odpovídají příslušným kritériím. Pleťové vody s obsahem parabenů jsou tedy mikrobiologicky chráněné proti pomnožení použitých mikroorganismů. Nejmenší ještě přijatelnou hodnotu vykazovaly vzorky pleťové vody s propylparabenem v koncentraci 0,2 % zaočkované bakterií *Escherichia coli* po 7 dnech skladování.

Antimikrobiální ochrana byla posouzena i u sady vzorků pleťových vod s upraveným pH na hodnotu 7. Zde byla již od počátku předpokládána vyšší náchylnost k pomnožování mikroorganismů, protože pH 7 představuje optimum pro růst bakterií. Výsledky logaritmického snížení jsou zaznamenány v Tab. 11.

Tab. 11. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 7 s MAG

Antimikrobiální látka	Koncentrace	Mikroorganismus								
		EC			SA			PA		
		R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
bez AL	–	-3	-2	-1	3	4	7	7	7	7
MAG C10:0	20	1	4	7	3	4	7	7	7	7
MAG C11:0		0	3	7	3	7	7	7	7	7
MAG C12:0		1	3	7	4	7	7	7	7	7

Po porovnání s minimálními hodnotami požadovanými pro hodnocení kritéria A bylo zjištěno, že kritéria A splňují všechny vzorky pleťových vod zaočkované bakteriemi *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kritéria A dále splňovaly pleťové vody s obsahem monoacylglycerolů po 14 a 28 dnech skladování. Naproti tomu všechny vzorky s monoacylglyceroly, zaočkované bakterií *Escherichia coli*, nespĺnily dané kritérium po 7 dnech skladování. Ačkoli po 14 a 28 dnech skladování již hodnoty vyhovovaly danému kritériu, tento vzorek nebyl považován za dostatečně chráněný. V tomto případě

by se mohla zvážit existence faktorů nesouvisející se složením. Dále jako bezprostředně nevyhovující byl vyhodnocen vzorek pleťové vody bez obsahu antimikrobní látky zaočkované bakterií *Escherichia coli*, který vykazoval záporné hodnoty snížení, tedy naopak došlo ke zvýšení počtu buněk ve vzorku. Počet buněk byl vyšší než počáteční počet po celou dobu skladování, avšak po 14 dnech se počet mírně snižoval, nedocházelo tedy k dalšímu pomnožování.

Z uvedeného lze konstatovat, že monoacylglyceroly, ačkoliv měly slabší antimikrobní účinky než parabeny, představovaly účinnou formu antimikrobiální ochrany kosmetických přípravků. S ohledem na ochranu spotřebitele a předcházení nežádoucím kožním reakcím, by tak mohly být jakousi alternativou použití parabenů jako antimikrobiálních přísad. Komplexní zhodnocení použití monoacylglycerolů v kosmetice by mohlo být podpořeno experimentem, který by se zabýval ověřováním účinku monoacylglycerolů v kosmetických prostředcích také na kvasinky a plísňe, a zkoušením kombinace monoacylglycerolů pro zajištění širšího spektra působení.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověření antimikrobní aktivity monoacylglycerolů a parabenů na bakterie v připraveném modelovém vzorku pleťové vody. Testování bylo provedeno metodou dlouhodobého zátěžového testu účinnosti konzervace. Pro zkoušení účinnosti jednotlivých antimikrobních látek i jinou metodou byla jako doplňková metoda použita metoda měření optické hustoty. Dosažené výsledky antimikrobní aktivity jednotlivých látek byly shrnuty a popsány následovně:

- Antimikrobní aktivita monoacylglycerolů je výlučně spojená s navázaným typem mastné kyseliny.
- Základní formulace pleťové vody vykazovala jisté antimikrobiální účinky. Příčinou antimikrobních vlastností byl obsah tenzidů a nižší pH, které ovšem bylo kompatibilní s pH pokožky.
- Nejlepších účinků dosahovaly všechny testované monoacylglyceroly ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$, $\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$ a $\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$) v pleťových vodách s pH 5,6 i v pleťových vodách s pH 7 na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*
- Gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla nejvíce citlivá ze všech testovaných bakterií na samotné složení pleťové vody.
- Nejhorší účinnost vykazovaly všechny studované monoacylglyceroly na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* v pleťové vodě s pH 5,6 i pH 7.
- V pleťových vodách s pH 5,6 růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli* nejlépe inhiboval MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$). V pleťových vodách s pH 7 pak nejlepší účinky na tuto bakterii vykazoval MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$).
- Růst grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* nejlépe potlačovaly MAG kyseliny undekanové ($\text{MAG}_{\text{C}_{11:0}}$) a MAG kyseliny laurové ($\text{MAG}_{\text{C}_{12:0}}$) v pleťové vodě s pH 5,6 i s pH 7.
- Nejméně účinným monoacylglycerolem vůči růstu grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* v pleťové vodě s pH 5,6 i pH 7 byl MAG kyseliny kaprinové ($\text{MAG}_{\text{C}_{10:0}}$).
- Nejúčinnější testovanou antimikrobní látkou byl methylparaben. Methylparaben vykazoval nejlepší antimikrobní aktivitu vůči všem testovaným bakteriím. Ve všech vzorcích pleťových vod s obsahem methylparabenu byla zaznamenána kompletní inhibice již po 7 dnech skladování.

- Propylparaben vykazoval výborné antimikrobní účinky vůči *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Naopak nejhůře působil na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* v koncentraci 0,2 %. Ve stejné koncentraci byly lepší antimikrobní účinky zaznamenány u MAG kyseliny kaprinové (MAG_{C10:0}) a MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}). V koncentraci 0,4 % již měl vyšší inhibiční účinek než uvedené MAG.
- Metodou měření optické denzity byly zjištěny nejlepší účinky testovaných monoacylglycerolů na gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Nejvíce potlačoval růst této bakterie MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}).
- MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) v koncentraci 80 mg/l byl touto metodou vyhodnocen jako nejvíce účinný proti gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. V koncentraci 40 mg/l byl MAG kyseliny undekanové (MAG_{C11:0}) nejlépe účinný i na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*.
- Nejmenší antimikrobní aktivita vůči všem bakteriím byla naměřena ve vzorcích s MAG kyseliny laurové. V koncentraci 80 mg/l tohoto monoacylglycerolu byly naměřeny vyšší hodnoty optické denzity než v koncentraci 40 mg/l u všech použitých bakterií. Pravděpodobnou příčinou byla schopnost bakterií využívat při použití vyšších koncentrací MAG uhlík z jejich molekuly.
- Pleťové vody s pH 5,6 byly chráněny před pomnožením všech testovaných mikroorganismů dokonce i bez přítomnosti antimikrobní přísady, mikrobiologické riziko výrobku bylo pod kontrolou.
- Pleťové vody s pH 7 byly chráněny pouze před pomnožením bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Naopak představovaly nedostatečnou ochranu před pomnožením gramnegativní bakterie *Escherichia coli*.
- Ačkoliv parabeny vykazovaly lepší antimikrobní účinky než studované monoacylglyceroly, monoacylglyceroly obecně vykazovaly dobré antimikrobní účinky, a proto by mohly být použity jako antimikrobní přísada v kosmetických přípravcích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Česká republika. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. In: *Úřední věstník L 342, 22.12.2009, s. 59—209*. Dostupný také z: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:01:CS:HTML>
- [2] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozšíř.vyd. Praha: MAXDORF, 2000, 336 s. ISBN 80-859-1219-8.
- [3] DRAELOS, Zoe Kececioglu a Lauren A THAMAN. *Cosmetic formulation of skin care products*. New York: Taylor, 2006, xx, 425 p. Cosmetic science and technology series, 30. ISBN 978-084-9339-684
- [4] ZAHRADNÍK, Miroslav. *Materiály II: pro 3. ročník oboru Kosmetička*. Praha: INFORMATORIUM, 2001, 103 s. ISBN 80-860-7383-1.
- [5] DRAELOS, Zoe Kececioglu. *Cosmetic dermatology: products and procedures*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Pub., 2010, xvi, 532 p. ISBN 14-051-8635-6.
- [6] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001, 160 s. ISBN 80-731-8016-2.
- [7] KRS, Václav. *Materiály I: pro 1. a 2. ročník oboru Kosmetička*. Praha: INFORMATORIUM, 2001, 135 s. ISBN 80-860-7373-4.
- [8] ČESKO. Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2000, 74, 2000.
- [9] VARVARESOU, A; PAPAGEORGIOU, S; TSIRIVAS, E; PROTOPAPA, E; KINTZIOU, H; KEFALA, V; DEMETZOS, C. Self-preserving Cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*. 2009, vol. 31, no. 3 s. 163-175. ISSN:1468-2494.

- [10] LUNDOV, MD; MOESBY, L; ZACHARIAE, C; JOHANSEN, JD. Contamination Versus Preservation of Cosmetics: A Review on Legislation, Usage, Infections, and Contact Allergy. *Contact Dermatitis*. 2009, vol. 60, no. 2 s. 70-78. ISSN:0105-1873.
- [11] BUCHTA, Vladimír. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998, 192 s. ISBN 80-718-4565-5.
- [12] PACK, Latricia D; WICKHAM, M Gary; ENLOE, Rebecca A; HILL, Denise N. Microbial Contamination Associated with Mascara Use. *Optometry (St. Louis, Mo.)*. 2008, vol. 79, no. 10 s. 587-593. ISSN:1529-1839.
- [13] GEIS, Philip A. *Cosmetic microbiology: a practical approach*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 295 s. ISBN 08-493-1453-4.
- [14] FUJITA, Y; SHIBAYAMA, H; SUZUKI, Y; KARITA, S; TAKAMATSU, S. Rapid and Accurate Identification of Microorganisms Contaminating Cosmetic Products Based on DNA Sequence Homology. *International Journal of Cosmetic Science*. 2005, vol. 27, no. 6 s. 309-316. ISSN:0142-5463.
- [15] FLORES, M; MORILLO, M; CRESPO, M.L. Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms. *International Biodegradation & Biodegradation*. 1997, vol. 40, no. 2 s. 157-160. ISSN:0964-8305.
- [16] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [17] *Klinicky významné bakterie*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2012, 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6.
- [18] PODSTATOVÁ, Hana. *Základy epidemiologie a hygieny*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 158 s. ISBN 978-80-7262-597-0.
- [19] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.

- [20] PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Vyd. 1. Olomouc: Epava, 2001, 283 s. ISBN 80-86297-07-1.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [22] GÖPFERTO VÁ, Dana. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, 2002, 148 s. ISBN 80-725-4223-0.
- [23] RUSSELL, A D. Bacterial Adaptation and Resistance to Antiseptics, Disinfectants and Preservatives is Not a New Phenomenon. *The Journal of Hospital Infection*. 2004, vol. 57, no. 2 s. 97-104. ISSN:0195-6701.
- [24] BOROVIAN, Gayle E. Pseudomonas cepacia: growth in and adaptability to increased preservative concentrations. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1983, roč. 34, č. 4, s. 197-203. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fjournal.sconline.org%2Fpdf%2Fcc1983%2Fcc034n04%2Fp00197-p00203.pdf&ei=iCYDU_aeJOeO4wSSmYGYDg&usg=AFQjCNF3xScJV9dJFJ4wmXZ8KTVOYGR3eA&sig2=MBElgcPVjC5HnWgwZNI4fg&bvm=bv.61535280,d.bGQ
- [25] FALCON, Janine. Understanding Preservatives. *Cosmetics*. 2010, vol. 38, no. 218. ISSN:0315-1301.
- [26] BRANNAN, Daniel K. *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997, 323 s. ISBN 0849337135.
- [27] MACCIONI, A M; ANCHISI, C; SANNA, A; SARDU, C; DESSI, S. Preservative Systems Containing Essential Oils in Cosmetic Products. *International Journal of Cosmetic Science*. 2002, vol. 24, no. 1 s. 53-59. ISSN:0142-5463.

- [28] GARIMA, AGARWAL; MUHAMMED, MAJEED; BEENA, BHAT. *Preservative System for Cosmetic Formulations-compositions and Methods Thereof* [patent]. US8329095 B2. Uděleno 11. prosinec 2012. [online]. [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/259659430_Preservative_system_for_cosmetic_formulations_-_compositions_and_methods_thereof
- [29] ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012.
- [30] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT SANÍA. *Analysis of cosmetic products*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, xvii, 487 s. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [31] Státní zdravotní ústav: *Účinnost konzervace kosmetiky*. [online]. [cit. 2013-11-29]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky>
- [32] BAUMANN, Leslie, Sogol SAGHARI a Edmund WEISBERG. *Cosmetic dermatology: principles and practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, ©2009, xiv, 366 s. ISBN 978-0-07-149062-7.
- [33] DASTYCHOVÁ, Eliška. *Látky konzervační z pohledu dermatologa*. [mluvené slovo]. [cit. 2013-11-29].
- [34] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Konzervace kosmetických prostředků*. [mluvené slovo]. [cit. 2013-11-29].
- [35] EDSER, Caroline. The Role of Preservatives. *Focus on Surfactants*. 2006, vol. 2006, no. 2 s. 1-2. ISSN:1351-4210.
- [36] *Personal care: performance and safety for YOUR products*. [online]. [cit. 2013-11-29]. Dostupné z: <http://www.schuelke.com/int/en/service/38842.htm>
- [37] ORTH, Donald S. *Cosmetic and drug microbiology*. New York: Informa Healthcare, ©2006, 375 s. ISBN 0-8493-7266-6.

- [38] JEDLIČKA, Milan. *Souhrn informací o konzervačních systémech*. 2012. [mluvené slovo]. [cit. 2013-12-03].
- [39] HORSKÝ, O. *Alternativy konzervace*. [mluvené slovo]. [cit. 2013-11-29].
- [40] HUANG, Jun-Qiang; HU, Cho-Chun; CHIU, Tai-Chia. Determination of Seven Preservatives in Cosmetic Products by Micellar Electrokinetic Chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, vol. 35, no. 4 s. 346-353. ISSN:1468-2494.
- [41] BAREL, A, Marc PAYE a Howard I MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2009, xvi, 869 p. ISBN 978-1-4200-6963-1.
- [42] HERMAN, Anna; HERMAN, Andrzej; DOMAGALSKA, Beata; MIYNARCZYK, Andrzej. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology*. 2013, vol. 53, no. 2 s. 232-237. ISSN:0046-8991.
- [43] DOLEŽALOVÁ, Magda; JANIŠ, Rahula; SVOBODOVÁ, Hana; KAŠPÁRKOVÁ, Věra; HUMPOLÍČEK, Petr; KREJČÍ, Jiří. Antimicrobial Properties of 1-monoacylglycerols Prepared from Undecanoic (C11: 0) and Undecenoic (C11:1) Acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, . ISSN:1438-7697.
- [44] RNDr. František Kratochvíl. Scientia est Potentia [online]. Im-Bio-Pharm Consult. Praha, ©2012 [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/>
- [45] Benzyl Alcohol, and Benzoic Acid and its Salts and Benzyl Ester. *Cosmetic Ingredient Review*. 2011.
- [46] RŮŽIČKOVÁ-JAREŠOVÁ, Lucie. Skupiny látek užívaných v dermatologii - antimikrobní látky. *Dermatologie pro praxi*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 106-108. ISSN: 1802-2960. [online]. [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: <http://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2010/02/10.pdf>

- [47] SOFOS, J.N., M.D. PIERSON, J.C. BLOCHER a F.F. BUSTA. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*. 1986, vol. 3, issue 1, s. 1-17. DOI: 10.1016/0168-1605(86)90036-X.
- [48] HON, Zdeněk. Skrytá nebezpečí parabenů. *Prevence úrazů, otrav a násilí*. 2007, roč. 3, č. 1, s. 84-87. ISSN: 1801-0261. [online]. [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/clanky/1-2007/101-skryta-nebezpeci-parabenu>
- [49] FURR, JR a AD RUSSEL. Some factors influencing the activity of esters of p-hydroxybenzoic acid against *Serratia marcescens*. *Microbios* 5. [Cambridge, Eng.: Faculty Press], 1972, 189–198. ISSN: 0026-2633.
- [50] ANDERSEN, F. Alan. Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as Used in Cosmetic Products. *International Journal of Toxicology*. 2008, vol. 27 Suppl 4, no. Supplement 41. ISSN:1092-874X.
- [51] JÍROVÁ, Dagmar; BENDO VÁ, Hana. *Konzervační látky v legislativě kosmetických přípravků*. 2012. [mluvené slovo]. [cit. 2013-12-03].
- [52] *MONOACYLGLYCEROLS*. [on-line]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z WWW: <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/mg/index.htm>
- [53] WHITEHURST, Robert J. *Emulsifiers in food technology*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., c2004, xvi, 247 p. ISBN 9781405118026-.
- [54] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*. Brno, 2010. Rigorózní práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta Ústav experimentální biologie Oddělení mikrobiologie.
- [55] BOYLE, E. Monoglycerides in Food Systems: Current and Future Uses. *Food Technology*. 1997, roč. 51, č. 8, s. 52-59. ISSN: 0015-6639.

- [56] JANIŠ, Rahula, Antonín KLÁSEK a Jana BOBÁLOVÁ. Chromium (III) acetate hydroxide – an efficient catalyst for preparation of 1-monoacylglycerols by the glycidol–fatty acid reaction. *Journal of Food Lipids*. 2006, no. 13, s. 199-209. ISSN: 1745-4522.
- [57] JANIŠ, Rahula, Jiří KREJČÍ a Antonín KLÁSEK. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, vol. 102, no. 5, s. 351-354. ISSN: 1438-9312. [on-line]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291438-9312%28200005%29102:5%3C351::AID-EJLT351%3E3.0.CO;2-J/abstract>
- [58] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.). ISBN 978-082-4740-375.
- [59] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Rahula JANIŠ, Jiří KREJČÍ, Iva DOLEŽÁLKOVÁ, Zdeněk POSPÍŠIL, Jan RŮŽIČKA a Bohuslava TREMLOVÁ. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno*. 2011, vol. 80, no. 1, s. 29-39. DOI: 10.2754/avb201180010029.
- [60] RŮŽIČKA, Jan, Kateřina VELCLOVÁ, Rahula JANIŠ a KREJČÍ. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology*. 2003, vol. 217, no. 4, s. 329-331. DOI: 10.1007/s00217-003-0764-6. [on-line]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0764-6>
- [61] ALTIERI, Clelia, Antonio BEVILACQUA, Daniela CARDILLO. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. *International Journal of Food Science*. 2009, vol. 44, no. 2, s. 242-245. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2007.01639.x. [on-line]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2007.01639.x>

- [62] BUŇKOVÁ, Leona, Jiří KREJČÍ, Rahula JANÍŠ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Pavlína VLTAVSKÁ Lucie KULEDOVÁ a František BUŇKA . Influence of monoacylglycerols on growth inhibition of micromycetes in vitro and on bread. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, vol. 112, no. 2, s. 173-179. DOI: 10.1002/ejlt.200900070. [on-line]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900070>
- [63] MANSOUR, M., D. AMRI, A. BOUTTEFROY, M. LINDER a J. B. MILLIERE. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, vol. 86, no. 2, s. 311-324. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00669.x. [on-line]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.1999.00669.x>
- [64] HILMARSSON, Hilmas, Thordis KRISTMUNDSDOTTIR a Halldor THORMAR. Virucidal activities of medium- and long-chain fatty alcohols, fatty acids and monoglycerides against herpes simplex virus types 1 and 2: comparison at different pH levels. *APMIS*. 2005, vol. 113, no. 1, s. 58-65. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130109.x. [on-line]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130109.x>
- [65] KABARA, J.J. et al. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1972, roč. 2, č. 1, s. 23-28. ISSN: 0066-4804. [on-line]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z WWW: <http://aac.asm.org/content/2/1/23.long>
- [66] PETSCHOW, B. W., R. P., BATEMA A L. L. FORD. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium – chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, vol. 40, no. 2, s. 302–306. ISSN: 0066-4804. [on-line]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z WWW: <http://aac.asm.org/content/40/2/302.full.pdf+html?sid=897aefc4-b9f2-4838-a086-0b9d39d04bee>
- [67] ZHANG, Hui, Hewen WEI, Yinan CUI, Guoqun ZHAO a Fengqin FENG. Antibacterial Interactions of Monolaurin with Commonly Used Antimicrobials and Food Components. *Journal of Food Science*. 2009, vol. 74, no. 7, M418-M421.

- DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01300.x. [on-line]. [cit. 2014-02-5] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2009.01300.x>
- [68] RAZAVI-ROHANI, S. Mehdi a Mansel W. GRIFFITHS. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria associated with foods by combinations of antimicrobial agents. *Journal of Food Safety*. 1996, vol. 16, no. 2, s. 87-104. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1996.tb00153.x. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4565.1996.tb00153.x>
- [69] THORMAR, Halldor a Hilmar HILMARSSON. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2007, vol. 150, no. 1, s. 1-11. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2007.06.220. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308407003817>
- [70] BERGSSON, Gudmundur, Ólafur STEINGRÍMSSON a Halldor THORMAR. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2002, vol. 20, no. 4, s. 258-262. DOI: 10.1016/S0924-8579(02)00205-4. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857902002054>
- [71] LEE, Ji-Young, Yong-Suk KIM a Dong-Hwa SHIN. Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, no. 7, s. 2193-2199. DOI: 10.1021/jf011175a. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011175a>
- [72] PREUSS, Harry G. et al Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005, vol. 272, no. 1-2, s. 29-34. ISSN: 1573-4919. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11010-005-6604-1>
- [73] FINSTERLOVÁ, Marie. *Péče o pleť a vlasy*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006, 182 s. ISBN 80-247-1340-3.

- [74] OSTROV, Ricki. *Péče o pleť*. Praha: Euromedia Group - Knižní klub, 2000, 112 s. Pro zdraví a krásu. ISBN 80-242-0250-6.
- [75] MIRICK, D. K. Antiperspirant Use and the Risk of Breast Cancer. *Cancer Spectrum Knowledge Environment*. 2002, vol. 94, no. 20, s. 1578-1580. DOI: 10.1093/jnci/94.20.1578. [on-line]. [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/94.20.1578>
- [76] Tween 40. *IRO Group Inc.* [online]. 2013 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.irochemical.com/product/Surfactants/Tween-40.htm>
- [77] *ENASPOL* [online]. 2009 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.enapol.cz/produkty/>
- [78] MATLOCK, Brian C., et. Al. Differences in Bacterial Optical Density. *THERMO Scientific* [online]. 2011 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.thermoscientific.de%2Fetermo%2FCMA%2FPDFs%2FProduct%2FproductPDF_58468.PDF&ei=VAF9U_HENuW3yAPY_IHYAw&usg=AFQjCNHcWziHaIo68c3rOzxryJzIqb3UDA&sig2=EGweXczipMBqexKz4NJ-Ug&bvm=bv.67229260,d.bGQ

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AL	Antimikrobní látka
a_w	Vodní aktivita.
CCM	„Czech Collection of Microorganisms“ Česká sbírka mikroorganismů.
CPM	Celkový počet mikroorganismů.
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina.
FDA	„Food and Drugs Administration“ Úřad pro kontrolu potravin a léčiv.
G^-	Gramnegativní bakterie.
G^+	Grampozitivní bakterie.
HLB	„Hydrophilic-lipophilic balance“ Hydrofilně-lipofilní rovnováha.
KL	Konzervační látka.
KP	Kosmetický prostředek.
MAG	Monoacylglycerol.
MAG _{C10:0}	Monoacylglycerol kyseliny kaprinové.
MAG _{C11:0}	Monoacylglycerol kyseliny undekanové.
MAG _{C11:1}	Monoacylglycerol kyseliny undecenové.
MAG _{C12:0}	Monoacylglycerol kyseliny laurové.
MAG _{C12:1}	Monoacylglycerol kyseliny dodecenové.
MAG _{C14:0}	Monoacylglycerol kyseliny myristové.
MAG _{C16:0}	Monoacylglycerol kyseliny palmitové.
MAG _{C18:0}	Monoacylglycerol kyseliny stearové.
MBC	Minimální baktericidní koncentrace.
MIC	Minimální inhibiční koncentrace.
MP	Methylparaben.
OD	Optická denzita.

PP Propylparaben.

R_x Logaritmické snížení počtu buněk

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Kyselina benzoová</i>	32
<i>Obr. 2. Kyselina sorbová</i>	33
<i>Obr. 3. Parabeny</i>	33
<i>Obr. 4. Benzyl alkohol</i>	35
<i>Obr. 5. Fenoxietanol</i>	36
<i>Obr. 6. Diazolidinyl urea</i>	37
<i>Obr. 7. Imidazolidinyl urea</i>	37
<i>Obr. 8. DMDM Hydantoin</i>	38
<i>Obr. 9. Bronopol</i>	38
<i>Obr. 10. Struktura molekuly monoacylglycerolů</i>	40
<i>Obr. 11. Vliv monoacylglycerolů na růst bakterie Escherichia coli CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6.</i>	58
<i>Obr. 12. Vliv monoacylglycerolů v koncentraci 20 mg/l na růst bakterie Escherichia coli CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 7.</i>	59
<i>Obr. 13. Vliv monoacylglycerolů na růst bakterie Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6.</i>	61
<i>Obr. 14. Vliv monoacylglycerolů v koncentraci 20 mg/l na růst bakterie Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953 ve vzorku pleťové vody o pH 7</i>	62
<i>Obr. 15. Vliv parabenů na růst bakterie Escherichia coli CCM 3954 ve vzorku pleťové vody o pH 5,6</i>	65
<i>Obr. 16. Citlivost bakterií na jednotlivé antimikrobní látky ve vzorku pleťové vody o pH 5,6</i>	68
<i>Obr. 17. Citlivost bakterií na jednotlivé monoacylglyceroly ve vzorku pleťové vody o pH 7 po 7 dnech skladování</i>	69
<i>Obr. 18. Hodnoty optické denzity bakterií po 24-ti hodinách kultivace ve vzorcích pleťové vody o pH 5,6</i>	71
<i>Obr. 19. Hodnoty optické denzity bakterií po 24-ti hodinách kultivace ve vzorcích pleťové vody o pH 5,6</i>	73

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Obecné složení emulzí typu o/v</i>	14
<i>Tab. 2. Vliv monoacylglycerolů na růst gramnegativní bakterie Pseudomonas aeruginosa CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6</i>	63
<i>Tab. 3. Vliv monoacylglycerolů na růst gramnegativní bakterie Pseudomonas aeruginosa CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 7</i>	64
<i>Tab. 4. Vliv parabenů na růst grampozitivní bakterie Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6</i>	66
<i>Tab. 5. Vliv parabenů na růst gramnegativní bakterie Pseudomonas aeruginosa CCM 3955 ve vzorcích pleťových vod o pH 5,6</i>	67
<i>Tab. 6. Hodnoty optické denzity mikroorganismů v masopeptonovém bujónu</i>	70
<i>Tab. 7. Hodnoty optické denzity mikroorganismů v masopeptonovém bujónu</i>	73
<i>Tab. 8. Hodnotící kritéria pro test účinnosti konzervace</i>	74
<i>Tab. 9. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 5,6 s MAG</i>	75
<i>Tab. 10. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 5,6 s parabeny</i>	76
<i>Tab. 11. Hodnoty logaritmického snížení pro vzorky pleťové vody o pH 7 s MAG</i>	76

SEZNAM PŘÍLOH

P I Rozpis vzorků pleťových vod

P II Rozhodovací diagram

P III Hodnoty CPM v jednotlivých vzorcích pleťové vody

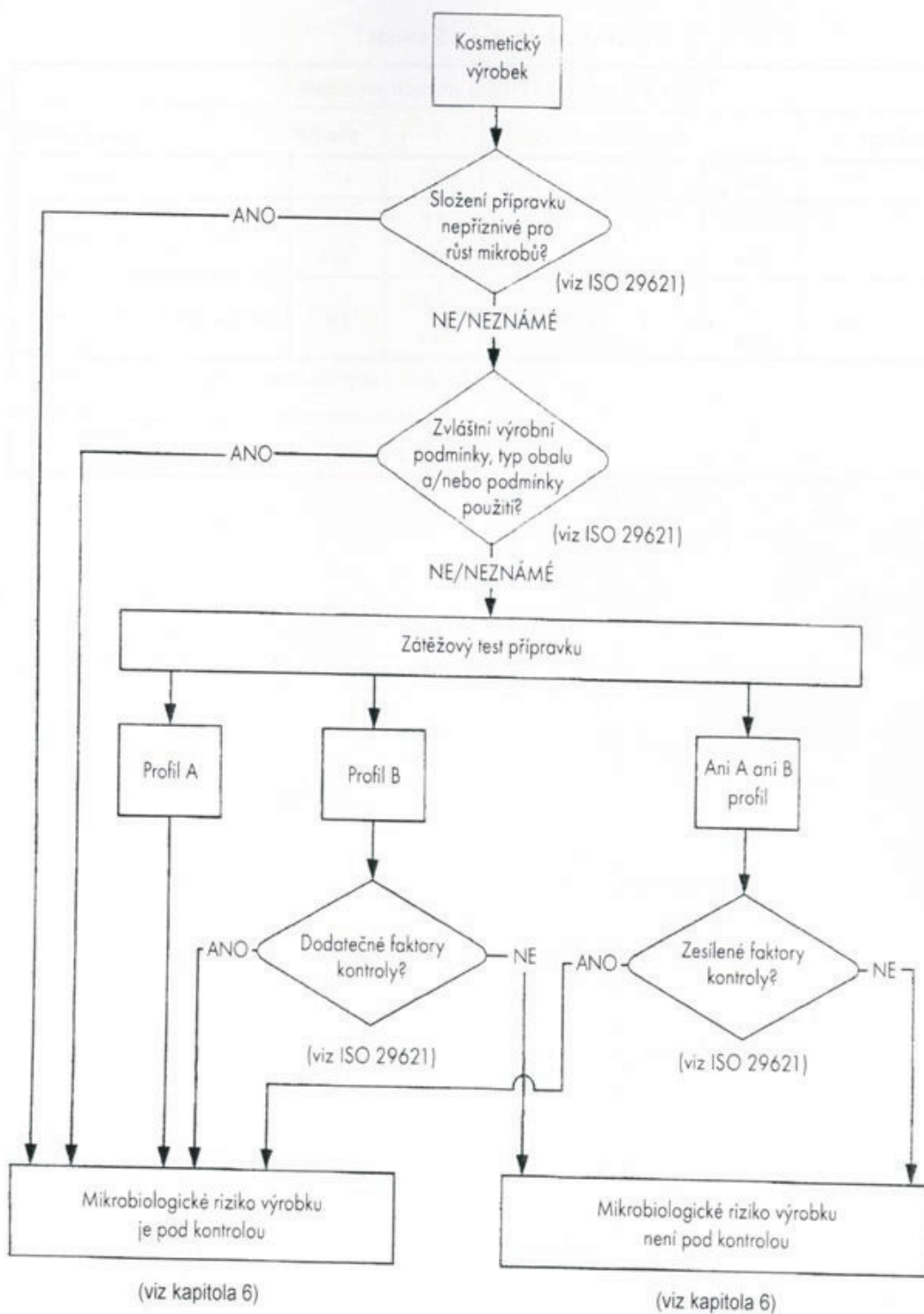
PŘÍLOHA P I: ROZPIS VZORKŮ PLEŤOVÝCH VOD

PI A. Rozpis a značení jednotlivých vzorků pleťových vod

Vzorek	Antimikrobní látka	koncentrace	Mikroorganismus	objem
1SAa,b	MAG _{C10:0}	20 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
1PAa,b	MAG _{C10:0}	20 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
1ECa,b	MAG _{C10:0}	20 mg/l	Escherichia coli	5 ml
1K	MAG _{C10:0}	20 mg/l	-	5 ml
2SAa,b	MAG _{C10:0}	40 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
2PAa,b	MAG _{C10:0}	40 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
2ECa,b	MAG _{C10:0}	40 mg/l	Escherichia coli	5 ml
2K	MAG _{C10:0}	40 mg/l	-	5 ml
3SAa,b	MAG _{C10:0}	80 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
3PAa,b	MAG _{C10:0}	80 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
3ECa,b	MAG _{C10:0}	80 mg/l	Escherichia coli	5 ml
3K	MAG _{C10:0}	80 mg/l	-	
4SAa,b	MAG _{C11:0}	20 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
4PAa,b	MAG _{C11:0}	20 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
4ECa,b	MAG _{C11:0}	20 mg/l	Escherichia coli	5 ml
4K	MAG _{C11:0}	20 mg/l	-	5 ml
5SAa,b	MAG _{C11:0}	40 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
5PAa,b	MAG _{C11:0}	40 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
5ECa,b	MAG _{C11:0}	40 mg/l	Escherichia coli	5 ml
5K	MAG _{C11:0}	40 mg/l	-	5 ml
6SAa,b	MAG _{C11:0}	80 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
6PAa,b	MAG _{C11:0}	80 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
6ECa,b	MAG _{C11:0}	80 mg/l	Escherichia coli	5 ml
6K	MAG _{C11:0}	80 mg/l	-	5 ml
7SAa,b	MAG _{C12:0}	20 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
7PAa,b	MAG _{C12:0}	20 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
7ECa,b	MAG _{C12:0}	20 mg/l	Escherichia coli	5 ml
7K	MAG _{C12:0}	20 mg/l	-	5 ml
8SAa,b	MAG _{C12:0}	40 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
8PAa,b	MAG _{C12:0}	40 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
8ECa,b	MAG _{C12:0}	40 mg/l	Escherichia coli	5 ml
8K	MAG _{C12:0}	40 mg/l	-	5 ml

Vzorek	Antimikrobní látka	koncentrace	Mikroorganismus	objem
9SAa,b	MAG _{C12:0}	80 mg/l	Staphylococcus aureus	5 ml
9PAa,b	MAG _{C12:0}	80 mg/l	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
9ECa,b	MAG _{C12:0}	80 mg/l	Escherichia coli	5 ml
9K	MAG _{C12:0}	80 mg/l	-	
10SAa,b	Methylparaben	0,20%	Staphylococcus aureus	5 ml
10PAa,b	Methylparaben	0,20%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
10ECa,b	Methylparaben	0,20%	Escherichia coli	5 ml
10K	Methylparaben	0,20%	-	5 ml
11SAa,b	Methylparaben	0,40%	Staphylococcus aureus	5 ml
11PAa,b	Methylparaben	0,40%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
11ECa,b	Methylparaben	0,40%	Escherichia coli	5 ml
11K	Methylparaben	0,40%	-	5 ml
12SAa,b	Methylparaben	0,80%	Staphylococcus aureus	5 ml
12PAa,b	Methylparaben	0,80%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
12ECa,b	Methylparaben	0,80%	Escherichia coli	5 ml
12K	Methylparaben	0,80%	-	5 ml
13SAa,b	Propylparaben	0,20%	Staphylococcus aureus	5 ml
13PAa,b	Propylparaben	0,20%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
13ECa,b	Propylparaben	0,20%	Escherichia coli	5 ml
13K	Propylparaben	0,20%	-	5 ml
14SAa,b	Propylparaben	0,40%	Staphylococcus aureus	5 ml
14PAa,b	Propylparaben	0,40%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
14ECa,b	Propylparaben	0,40%	Escherichia coli	5 ml
14K	Propylparaben	0,40%	-	5 ml
15SAa,b	Propylparaben	0,80%	Staphylococcus aureus	5 ml
15PAa,b	Propylparaben	0,80%	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
15ECa,b	Propylparaben	0,80%	Escherichia coli	5 ml
15K	Propylparaben	0,80%	-	5 ml
16SAa,b	-	-	Staphylococcus aureus	5 ml
16PAa,b	-	-	Pseudomonas aeruginosa	5 ml
16ECa,b	-	-	Escherichia coli	5 ml
16K	-	-	-	5 ml

PŘÍLOHA P II: ROZHODOVACÍ DIAGRAM



PŘÍLOHA P III: HODNOTY CPM V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH PLEŤOVÉ VODY

PIII A. Hodnoty CPM v log KTJ/ml pro vzorky pleťové vody s MAG o pH 5,6 zaočkované bakterií Escherichia coli CCM 3954

	Koncentrace [mg/l]	Doba skladování [den]			
		0	7	14	28
Kontrola	-	6,76 ± 0,02	3,51 ± 0,01	×	×
MAG_{C10:0}	20	6,76 ± 0,02	2,88 ± 0,05	×	×
	40	6,76 ± 0,02	2,35 ± 0,02	×	×
	80	6,76 ± 0,02	×	×	×
MAG_{C11:0}	20	6,76 ± 0,02	2,91 ± 0,09	×	×
	40	6,76 ± 0,02	2,15 ± 0,10	×	×
	80	6,76 ± 0,02	×	×	×
MAG_{C12:0}	20	6,76 ± 0,02	3,40 ± 0,03	×	×
	40	6,76 ± 0,02	2,42 ± 0,04	×	×
	80	6,76 ± 0,02	×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

PIII B. Hodnoty CPM v log KTJ/ml pro vzorky pleťové vody s MAG o pH 5,6 zaočkované bakterií Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953

	Koncentrace [mg/l]	Doba skladování [den]			
		0	7	14	28
Kontrola	-	6,69 ± 0,06	3,17 ± 0,03	×	×
MAG_{C10:0}	20	6,69 ± 0,06	1,63 ± 0,09	×	×
	40	6,69 ± 0,06	×	×	×
	80	6,69 ± 0,06	×	×	×
MAG_{C11:0}	20	6,69 ± 0,06	×	×	×
	40	6,69 ± 0,06	×	×	×
	80	6,69 ± 0,06	×	×	×
MAG_{C12:0}	20	6,69 ± 0,06	×	×	×
	40	6,69 ± 0,06	×	×	×
	80	6,69 ± 0,06	×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

PIII C. Hodnoty CPM v log KTJ/ml pro vzorky pleťové vody s parabeny o pH 5,6 zaočkované bakterií *Escherichia coli* CCM 3954

	Koncentrace [%]	Doba skladování [den]			
		0	7	14	28
Kontrola	-	6,76 ± 0,02	3,51 ± 0,03	×	×
Methylparaben	0,2	6,41 ± 0,04	×	×	×
	0,4	6,41 ± 0,04	×	×	×
	0,8	6,41 ± 0,04	×	×	×
Propylparaben	0,2	6,41 ± 0,04	3,33 ± 0,11	×	×
	0,4	6,41 ± 0,04	×	×	×
	0,8	6,41 ± 0,04	×	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

PIII D. Hodnoty CPM v log KTJ/ml pro vzorky pleťové vody s MAG o pH 7 zaočkované bakterií *Escherichia coli* CCM 3954

	Koncentrace [mg/l]	Doba skladování [den]			
		0	7	14	28
Kontrola	-	6,64 ± 0,04	9,46 ± 0,02	8,89 ± 0,00	7,83 ± 0,28
MAG_{C10:0}	20	6,64 ± 0,04	6,07 ± 0,10	2,51 ± 0,15	×
MAG_{C11:0}	20	6,64 ± 0,04	6,20 ± 0,23	4,04 ± 0,25	×
MAG_{C12:0}	20	6,64 ± 0,04	5,74 ± 0,07	3,60 ± 0,04	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu

PIII E. Hodnoty CPM v log KTJ/ml pro vzorky pleťové vody s MAG o pH 7 zaočkované bakterií *Staphylococcus aureus subsp. aureus* CCM 3953

	Koncentrace [mg/l]	Doba skladování [den]			
		0	7	14	28
Kontrola	-	6,53 ± 0,01	5,55 ± 0,03	3,67 ± 0,03	×
MAG_{C10:0}	20	6,53 ± 0,01	3,25 ± 0,02	2,54 ± 0,03	×
MAG_{C11:0}	20	6,53 ± 0,01	3,06 ± 0,09	×	×
MAG_{C12:0}	20	6,53 ± 0,01	2,82 ± 0,03	×	×

×...žádný nárůst, kompletní inhibice růstu