Antimikrobní účinky vybraných kosmetických přípravků

Veronika Mikulcová

Bakalářská práce
2011

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Veronika MIKULCOVÁ**
Osobní číslo:	**T080213**
Studijní program:	**B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Téma práce:	**Antimikrobiální účinky vybraných kosmetických prostředků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Složení mikroflóry kůže.**
2. **Zajištění mikrobiální bezpečnosti kosmetických prostředků.**
3. **Charakteristika antimikrobních látek používaných v kosmetice.**

II. Praktická část

1. **Studium antimikrobních účinků zvolených kosmetických prostředků pomocí difúzní diskové metody.**
2. **Studium antimikrobních účinků zvolených kosmetických prostředků pomocí otiskové metody.**
3. **Formulace závěrů na základě získaných výsledků.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] JULÁK, J. Úvod do lékařské bakteriologie, Karolinum, Praha 2006.
[2] ORTH,D.S., KABARA, J.J., DENYER, S.P., TAN, S.K. Cosmetic and Drug Microbiology, Informa Healthcare, New York 2006.
[3] GEIS, P. Cosmetic Microbiology: A Practical Approach, 2 edition, Informa Healthcare, 2006.
[4] HARRY,R.G., RIEGER,M.M. Harry's Cosmeticology, Volumes I–II, 8 edition, Chemical Publishing Company Inc., Gloucester 2000.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **10. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 10. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

P R O H L Á Š E N Í

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....

.....

[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 nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce srovnává antimikrobní účinky běžných mýdel, sprchových gelů, mýdel s antimikrobiální přísadou a dezinfekčních prostředků na alkoholové bázi. Jejich inhibiční účinky byly testovány na grampozitivních bakteriích *Micrococcus luteus* CCM 732, *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a gramnegativních bakteriích *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Testování antimikrobiální citlivosti bylo prováděno diskovou metodou, doplňkovou srovnávací metodou a metodou otisků prstů. Výsledky ukázaly, že běžná mýdla sice vykazují inhibiční aktivitu, nicméně je menší než v případě mýdel antibakteriálních. Sprchové gely měly účinek téměř totožný s běžnými tekutými mýdly. Bylo také zjištěno, že přípravky na alkoholové bázi neměly významně větší účinek než antibakteriální mýdla.

Klíčová slova: mýdla, antibakteriální mýdla, sprchové gely, dezinfekční prostředky na alkoholové bázi, antimikrobiální účinek, disková metoda, metoda otisků prstů

ABSTRACT

This study compared the antimicrobial activity of plain soaps, shower gels, antimicrobial soaps and alcohol-based hand sanitizers. The inhibitory effects was tested on Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* CCM 732, *Staphylococcus aureus* CCM 3953 and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* CCM 3954 and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc method, the additional comparative method and finger prints method. The results reveled that plain soaps also showed inhibitory activity but lesser than antibacterial soaps. Shower gels had an effect almost identical to conventional liquid soaps. It was also detected that alcohol-based hand sanitizers weren´t more significantly effective than antibacterial soaps.

Keywords: plain soaps, antibacterial soaps, shower gels, alcohol-based hand sanitizers, antimicrobial effect, disc method, finger prints method

Poděkování

Na tomto místě děkuji vedoucí doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost při realizaci této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. V případě publikace výsledku, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně .....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD **10**

I TEORETICKÁ ČÁST **11**

1 KOŽNÍ MIKROFLÓRA **12**

1.1 MIKROBIÁLNÍ OSÍDLENÍ ČLOVĚKA 12

1.2 TYPICKÁ FLÓRA KŮŽE 12

1.3 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ MIKROFLÓROU KŮŽE 13

2 MIKROBIÁLNÍ BEZPEČNOST KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ **15**

2.1 TRVANLIVOST KOSMETICKÉHO PROSTŘEDKU PO ZAHÁJENÍ UŽÍVÁNÍ SPOTŘEBITELEM 16

2.2 FAKTORY KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINNOST KONZERVACE. 17

2.2.1 Vodní aktivita a_w 17

2.2.2 pH 18

2.2.3 Rozpustnost konzervační přísady 19

3 PŘEHLED ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH **21**

3.1 BENZOOVÁ KYSELINA (INCI: BENZOIC ACID) 21

3.2 BENZALKONIUM CHLORID (INCI: BENZALKONIUM CHLORIDE) 22

3.3 BENZYLALKOHOL (INCI:BENZYL ALCOHOL) 22

3.4 BRONOPOL (INCI: 2-BROMO-2-NITROPROPANE-1,3-DIOL) 23

3.5 ETANOL (INCI: ETHANOL) 23

3.6 IMIDAZOLIDINYLOVÁ MOČOVINA (INCI: IMIDAZOLIDINYL UREA) 24

3.7 ISOPROPANOL (INCI: ISOPROPANOL) 24

3.8 KVATERNIUM – 15 (INCI: QUATERNIUM – 15) 25

3.9 PARABENY (INCI: PARABENS) 25

3.10 SALICYLOVÁ KYSELINA (INCI: SALICYLIC ACID) 26

3.11 TRIKLOSAN (INCI: TRICLOSAN) 27

4 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ **28**

4.1 ZÁKLADNÍ SLOŽKY 28

4.2 MÝDLA 29

4.2.1 Klasická mýdla 29

4.2.2 Syntetická mýdla 31

4.2.3 Tekutá mýdla 31

4.2.4 Antibakteriální mýdla 32

4.3 SPRCHOVÉ GELY 33
4.4 DEZINFEKČNÍ PROSTŘEDKY NA ALKOHOLOVÉ BÁZI 33
5 CÍL PRÁCE 34
II PRAKTICKÁ ČÁST 35
6 MATERIÁL A METODY 36
6.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY 36
6.2 TESTOVANÉ PROSTŘEDKY 36
6.3 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ 36
6.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA 37
6.4.1 Masopeptonový agar 37
6.4.2 Masopeptonový bujón 37
6.4.3 Mueller-Hinton agar (MHA) 38
6.4.4 Plate count agar (PCA) 38
6.5 ROZTOKY 38
6.6 METODY STANOVENÍ 39
6.6.1 Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám difúzní diskovou metodou 39
6.6.1.1 Příprava vzorků 39
6.6.1.2 Příprava suspenze testovaných bakteriálních kmenů 39
6.6.1.3 Stanovení inhibičního účinku 39
6.6.2 Doplňková metoda pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám 39
6.6.2.1 Příprava vzorků 39
6.6.2.2 Příprava suspenze testovaných bakteriálních kmenů 39
6.6.2.3 Stanovení inhibičního účinku 40
6.6.3 Metoda otisků prstů pro stanovení účinnosti dezinfekce pokožky 40
7 VÝSLEDKY 41
7.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY TESTOVANÝCH SPRCHOVÝCH GELŮ 41
7.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK TESTOVANÝCH MÝDEL 42
7.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK TESTOVANÝCH MÝDEL S ANTIBAKTERIÁLNÍ PŘÍSADOU 44
7.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK TESTOVANÝCH PŘÍPRAVKŮ NA ALKOHOLOVÉ BÁZI 45
8 DISKUZE 49
ZÁVĚR 53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 60
SEZNAM OBRÁZKŮ 61
SEZNAM TABULEK 62
SEZNAM PŘÍLOH 63

ÚVOD

Antimikrobiální látky nalezly v kosmetickém průmyslu široké uplatnění. Pro zajištění mikrobiální bezpečnosti a nezávadnosti je jejich přítomnost v prostředcích nezbytná. Kromě toho jsou součástí pleťových vod určených k čištění problematické pleti, antibakteriálních mýdel, šamponů proti lupům, dezinfekčních gelů, deodorantů, antiperspirantů aj. V USA a západní Evropě se dokonce používají antibakteriální krémy na ruce či sprchové gely.

Lidé si pod tlakem nových skutečností a také vlivem reklamy stále výrazněji uvědomují, že dodržování správné hygieny je důležitým aspektem pro zajištění zdraví. Běžná mýdla se odedávna používají k mechanickému odstranění nečistot. Prostředky s antibakteriálními přísadami k tomuto účinku ještě přidávají baktericidní nebo bakteriostatické vlivy. Toto je také jeden z důvodů, proč jejich oblíbenost v posledních letech roste. Především dezinfekční gely našly své uplatnění v zařízeních, kde je kladen zvýšený důraz na hygienu prostředí – ve zdravotnictví nebo v potravinářském průmyslu. Kromě toho představují vhodnou náhradu mytí rukou v situacích, kde voda a mýdlo nejsou dostupné např. při cestování.

Vzhledem k stoupající oblibě antimikrobiálních přísad se vedou četné diskuze na téma vzniku rezistence v důsledku nadměrného používání těchto látek. Nicméně zatím jsou výsledky výzkumů sporné.

.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOŽNÍ MIKROFLÓRA

1.1 Mikrobiální osídlení člověka

Člověk se rodí sterilní a ihned po narození je postupně osídlován velkým množstvím bakterií, s nimiž pak koexistuje celý život. Lidské tělo je složeno z cca 10^{13} vlastních buněk, přičemž současně na něm žije asi 10^{14} buněk bakteriálních, jejichž hmotnost představuje 1 až 1,5 kg. Největší část bakterií osídluje zažívací trakt, menší část pak kůži, dutinu ústní a horní cesty dýchací, vagínu a oko. Jiné lokality, především krevní oběh, vyšší části močového traktu a další, by měly být u zdravého člověka sterilní [1].

Příslušníci mikrobiální flóry mohou být rozděleni na autochtonní, tj. původní flóru charakteristickou pro zdravý organizmus v daném prostředí, a alochtonní, tj. flóru vyskytující se náhodně nebo nepravidelně. Alochtonní flóra se uplatňuje zpravidla při narušení stability autochtonní flóry, např. podáním antibiotik, stresem atd. Mikroorganizmy tvořící stabilní flóru se označují jako rezidentní. Krátkodobá přechodná kolonizace nepatogenní flórou se označuje jako tranzientní [1].

Odpověď na otázku, zda je život vyšších organizmů včetně člověka možný bez soužití s mikroorganizmy, poskytly experimenty na bezmikrobních zvířatech. Bezmikrobní zvířata jsou na svět přiváděna sterilním císařským řezem a chována v izolátorech se sterilním vzduchem a sterilizovanou potravou. Tato zvířata pomalu rostou, trpí četnými defekty a po kontaktu s vnějším prostředím obvykle záhy hynou. Také pro člověka je v mnoha směrech trvalé osídlení mikroorganizmy životně důležité [1]. Význam rezidentní mikrobiální kolonizace lidského těla spočívá především ve schopnosti bránit usídlení patogenních mikroorganizmů a stimulovat imunitní systém [2].

1.2 Typická flóra kůže

Kůže má největší kontakt se zevním prostředím a je tak exponovaná různým druhům mikroorganizmů [3]. Nachází se na ní průměrně 2000 aerobních bakterií na 1 cm^2, ve vlhkých nebo zapařených kožních záhybech se na 1 cm^2 vyskytuje i více než 80 000 bakterií [1]. Složení mikroflóry se liší v závislosti na pohlaví, věku, zdravotním stavu a anatomické lokalizaci [4].

Rezidentní flóra nacházející se v hlubších vrstvách kůže, v okolí mazových žláz nebo nehtů je mnohem méně citlivá k mytí rukou či dezinfekci než flóra tranzientní [1, 5]. Je trvalá, nelze ji

odstranit mechanicky. Většinou nezpůsobuje infekce s výjimkou vnímavých, např. imunodeficitních osob, nebo pronikne-li do jiných lokalit či sterilních tkání [6]. Jestliže je porušena, dochází k její rychlé obnově [3]. Typickou rezidentní mikroflóru kůže tvoří především *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, Candida albicans* apod. [6]

Tranzientní flóra se skládá z nepatogenních nebo potenciálně patogenních mikroorganizmů, které osidlují kůži na několik hodin, dnů nebo týdnů [3]. Jejich množství a poměr odpovídá mikrobiálnímu zatížení prostředí a charakteru vykonávané práce. Přenáší se bezprostředním kontaktem pokožky s kontaminovanými předměty, dotykem rukou apod. Je častou příčinou nozokomiálních infekcí, tj. infekcí vzniklých v souvislosti s poskytováním zdravotní péče. K hlavním zástupcům této flóry se řadí zástupci rodu *Streptococcus*, rodu *Enterococcus*, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, enteroviry, rotaviry, viry hepatitid A apod. [6]

Kůže představuje první ochrannou bariéru před bakteriemi z okolí, a to jak mechanickou, tak i chemickou. Mechanickou bariéru zajišťuje především keratin, který většina bakterií nedovede rozložit. Z prostředků chemické ochrany je významné kyselé pH, pohybující se v různých oblastech těla v rozmezí 4,2 až 5,5. Kyselé substance jsou produkovány kožními žlázami a bakteriemi. Antibakteriálně dále působí mastné kyseliny (laurová, linolová, linoleová), poměrně vysoká koncentrace NaCl z odpařeného potu, řada složek imunitního systému, jakož i lysozym produkovaný mimo keratinocytů i stafylokoky [1].

1.3 Onemocnění vyvolaná mikroflórou kůže

Mikroorganizmy se vyskytují ve značné míře na kůži zdravého člověka, aniž by vyvolávaly onemocnění. To vzniká teprve při porušení struktury nebo kožního povrchu mikrotraumaty, při porušení ochranného kyselého pláště alkáliemi a vlivem některých dalších přídatných faktorů, např. v důsledku nedostatečné hygieny, vlhka nebo tepla. Snížená odolnost vůči mikroorganizmům se vyskytuje častěji u oslabených jedinců, např. u diabetu, imunodeficientních stavů, AIDS aj. [4] Běžní zástupci kožní mikroflóry jsou uvedeni v *Tab. 1*.

Tabulka 1 – Vybrané mikroorganizmy osidlující kůži [1].

Skupina, rod bakterií	**Obvyklé druhy**
Aerobní, fakultativně aerobní	
Gram-pozitivní koky	
Micrococcus	*M. luteus*
Staphylococcus	*S. aureus, S.epidermidis, S. hominis*
Streptococcus	*S. viridans*
Gram-pozitivní tyčinky	
Brevibacterium	*B. epidermidis*
Corynebacterium	*C. amycolatum, C. jeikeium, C. striatum*
Gram-negativní tyčinky	
Escherichia	*E. coli*
Aerobní	
Gram-pozitivní koky	
Peptococcus	*P. niger*
Gram-pozitivní tyčinky	
Propionibacterium	*P. acnes, P. avidum, P. propionicum*
Kvasinky, mikroskopické houby	
Aspergillus	*A. fumigatus*
Candida	*C. albicans, C. krusei*

2 MIKROBIÁLNÍ BEZPEČNOST KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ

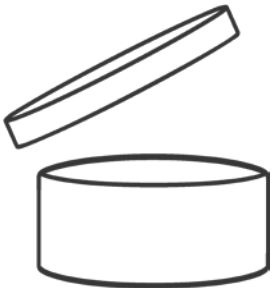
Zdrojem mikrobiální kontaminace kosmetických prostředků může být [7]:

- voda použitá při jejich výrobě, výchozí materiál biologického původu (extrakty z živočišných tkání, suroviny rostlinného původu, např. extrakty z různých částí rostlin, pryskyřice aj.), suroviny anorganického charakteru (kaolin, pigmenty) atd.
- některé výrobní operace a zařízení nedostatečně chráněné před mikrobiální kontaminací desinfekcí v přiměřených časových intervalech,
- mikrobiální kontaminace v povýrobní fázi,
- kontaminace u spotřebitele.

Proto z důvodu zajištění mikrobiální nezávadnosti výrobků, ochrany výrobků před rozkladem a znehodnocením způsobeným činností případných kontaminujících mikroorganizmů a také kvůli zajištění ochrany spotřebitele během používání, jsou do kosmetických kompozic zapracovány konzervační přísady zpomalující růst mikroorganizmů v těchto prostředcích [7, 9]. Při nedostatečné konzervaci dochází ke změně vlastností hotových preparátů. Především se jedná o změnu barvy, vůně, pH, flokulaci výrobku, vývoj plynu a změnu tokových vlastností atd. [7] Kromě rozkladu přípravku s možností následného podráždění pokožky mohou mikroorganizmy způsobit také její infekci s nebezpečím následných komplikací [8]. Seznam povolených konzervačních přísad, včetně jejich maximálních možných použitých koncentrací, uvádí šestá příloha směrnice 76/768/EHS a její prováděcí vyhlášky [10].

Účinná prevence mikrobiální kontaminace ve výrobním závodě je nutná pro zajištění výroby nezávadného kosmetického prostředku. Základním předpokladem bezpečného používání výrobku spotřebitelem je pak volba vhodných konzervačních systémů pro danou recepturu kosmetického prostředku s přihlédnutím ke způsobu jeho používání a použité formě obalu výrobku [11]. Mezi další kritéria ovlivňující výběr konzervantu patří jeho antimikrobní účinnost, legislativní překážky bránící použití látky v dané zemi či regionu, přítomnost ingrediencí v receptuře ovlivňujících účinnost konzervace a zpracovatelské podmínky přípravku [12]. Z nepřeberného množství konzervačních látek, jež jsou dnes výrobcům k dispozici, je obecně patrná snaha používat ty, o kterých existuje nejvíce informací z hlediska bezpečnosti a které jsou k dostání od mnoha dodavatelů za nízkou cenu [13].

2.1 Trvanlivost kosmetického prostředku po zahájení užívání spotřebitelem



Obrázek 1 – Symbol otevřené nádobky [14]

Nestačí, aby byl přípravek mikrobiálně nezávadný do doby svého prvního otevření a při prvním použití. Výrobek si musí vyhovující vlastnosti zachovat i po celou dobu, po kterou je používán spotřebitelem po otevření. Tato doba minimální trvanlivosti je vyznačena výrobcem na obalu výrobku pomocí loga otevřené nádobky na krém a údajem o době v měsících nebo rocích (*Obrázek 1*) [11].

Nejčastější příčinou zhoršení kvality kosmetického prostředku s následným poškozením spotřebitele je mikrobiální kontaminace přesahující limity, které jsou stanoveny pro bezpečnost výrobku v šesté revizi Návodu Vědeckého výboru pro kosmetiku a nepotravinové výrobky (SCCNFP/0690/03) [15]. Evropská komise vydala samostatně k provedení ustanovení, které se týká vyznačení doby minimální trvanlivosti kosmetického prostředku po otevření, návod pro praktické využití (04/ENTR/COS/28) [16]. Oba dokumenty uvádějí jako základní zdroj informace pro stanovení doby trvanlivosti po otevření mikrobiologické zátěžové testy, které jsou využívány při zkoušení léčiv [11].

Nejvíce vnímavé k mikrobiální kontaminaci v souvislosti s používáním spotřebitelem jsou ty kosmetické prostředky, jejichž receptura podporuje růst mikroorganizmů (emulze typu olej ve vodě, prostředky s vysokým obsahem nutričních látek), dále ty výrobky, které mají nedokonalý nebo neúčinný konzervační systém jako součást receptury a také ty výrobky, jejichž obal nezamezuje kontaktu mezi kosmetickým prostředkem, kůží spotřebitele nebo vnějším prostředím při obvyklém používání prostředku. Dalším rizikovým faktorem je skutečnost, zda používání výrobku je sdíleno více spotřebiteli (např. celou rodinou) nebo je výrobek určen k aplikaci na lokality zvýšeně vnímavé k mikrobiální kontaminaci (kolem očí, pro intimní hygienu) nebo je prostředek určen pro skupinu zvýšeně vnímavých osob (pro děti do 3 let, pro osoby s citlivou kůží, pro seniory), jejichž povrchový ochranný kožní film a další vlastnosti kůže nejsou ještě dokonale vyvinuty nebo jsou oslabeny [11].

Nejčastějšími mikrobiálními kontaminanty kosmetik jsou bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans,* dále mikrokoky, streptokoky, enterobakterie, bacily a klostridia [7, 15]. Jejich zvýšená přítomnost v kosmetickém prostředku může být zdrojem infekčního onemocnění kůže bakteriálního či plísňového původu s možností přenosu na další osoby [11].

2.2 Faktory kosmetických prostředků ovlivňující účinnost konzervace

Výsledný konzervační efekt ovlivňuje celá řada faktorů kosmetické receptury. Především se jedná o pH, vodní aktivitu a rozpustnost konzervační látky v přípravku [12].

2.2.1 Vodní aktivita a_w

Veškeré chemické reakce v živé buňce probíhají pouze ve vodném prostředí, proto vyžadují mikroorganizmy přítomnost vody v dostatečném množství a kapalném stavu. Snížení množství dostupné vody v prostředí vede k zastavení jejich činnosti [11].

Většina bakterií je schopna se rozmnožovat v živných prostředích o vodní aktivitě v rozmezí 0,99 až 0,93, přičemž samotná voda vykazuje vodní aktivitu rovnou jedné [11]. Majoritní část gram-pozitivních a gram-negativních bakterií není schopna se rozmnožovat v kosmetickém systému o vodní aktivitě nižší než 0,91 [12]. Výjimku představují halofilní bakterie rozmnožující se pouze za nízkých vodních aktivit (0,65 až 0,63), dále kvasinky, jejichž minimální vodní aktivita se pohybuje v rozmezí 0,91 až 0,88, osmotolerantní kvasinky schopné rozmnožovat se při $a_w = 0{,}73$ a plísně, jež většinou vyžadují nižší vodní aktivitu než většina baterií a kvasinek [17].

Kosmetické přípravky se podle hodnoty vodní aktivity receptury dělí na přípravky s nízkou a vysokou vodní aktivitou. Vysoká vodní aktivita představuje vyšší riziko kontaminace přípravku mikroorganizmy, protože bakterie mají k dispozici větší množství vody nezbytné pro jejich rozmnožování. Mezi tyto přípravky s vyšším podílem vodní fáze se řadí například krémy, pleťové vody, odličovače, šampóny. Nízkou vodní aktivitu, a tím sníženou citlivost k mikrobiální kontaminaci, mají například pudry, laky na nehty, rtěnky [12]. Nicméně i u těchto tzv. bezvodých přípravků může dojít k růstu nežádoucí mikroflóry v důsledku používání spotřebitelem [18]. Příklady vodních aktivit různých typů kosmetických prostředků s jejich potenciálními mikrobiálními kontaminanty jsou uvedeny v *Tab. 2* [12].

Snížení vodní aktivity v systému, a tím zabránění činnosti mikroorganizmů lze dosáhnout odstraněním vody nebo zvýšením koncentrace rozpuštěných látek v prostředí přídavkem vhodných chemikálií [19]. Ke snížení a_w kosmetické kompozice se nejčastěji používají aminokyseliny, chlorid sodný, dextriny, glycerol, etanol, xanthanová guma aj. Mechanizmus jejich působení spočívá v absorbování vody z preparátu, čímž klesne v systému množství dostupné vody pro mikroorganizmy. Další možností je zvýšení koncentrace rozpuštěné chemikálie, nečastěji glukózy, sacharózy, sorbitolu, jež vede k zvýšení osmotického tlaku

bakteriální buňky, což brání rozmnožování mikroorganismů [12]. Předpokládá se, že vysoký tlak působí nepříznivě především na syntézu buněčné stěny [17].

Tabulka 2 – Vodní aktivity kosmetických přípravků ve vztahu k mikrobiální kontaminaci [12].

Vodní aktivita	**Typy kosmetických přípravků**	**Typické mikrobiální kontaminanty**
0,96-0,99	Šampony, odličovače, krémy, pleťové vody, emulze, tekutý make-up	Gram-pozitivní a gram-negativní bakterie (např. *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens*), plísně, kvasinky
0,90-0,95	Šampony, vlasové kondicionéry, krémy, pleťové vody, ústní vody, některé pasty	Méně bakterií gram-negativních a více gram-pozitivních (např.*Bacillus* sp.), plísně, kvasinky
0,80-0,89	Většina zubních past, některá mýdla, rtěnky, krémy	Gram-pozitivní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*), plísně, kvasinky
0,70-0,79	Pudry, některé zubní gely, některá mýdla	Halofilní bakterie, plísně, kvasinky
0,65-0,69	Antiperspiranty	Osmotolerantní kvasinky
Méně než 0,6	Práškovité produkty	Žádné

2.2.2 pH

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí významně ovlivňuje růst mikroorganizmů i jejich biochemickou činnost. Každý mikroorganizmus je schopen se rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH [17]. Obecně jsou mikroorganizmy schopny růstu v rozmezí hodnot pH od 4,0 do 10,0 [12]. Optimální pH pro růst je dáno hodnotou nejvhodnější pro činnost životně důležitých enzymů [17]. Pro většinu bakterií se optimální pH pro růst nachází mezi hodnotami 5,5 až 8,5. Optimální pH pro růst kvasinek a plísní představuje rozmezí od 4,0 do 6,0 [12].

Na trhu jsou k dispozici kosmetické produkty s kyselým nebo alkalickým pH. Kyselé pH od 3,0 do 5,0 mají například pleťové vody obsahující kyselinu salicylovou nebo alfa-hydroxykyseliny (AHA), antiperspiranty obsahující 25% roztok chlorhydrátu hliníku či vlasové kondicionéry. Příklady kosmetických preparátů s alkalickým pH, pohybujícím se od 10,0 do 14,0, představují depilační krémy a vlasové balzámy. Pokud má kosmetikum hodnotu pH nižší než 4,0 nebo vyšší než 10,0, není potřeba do jeho kompozice přidávat konzervační přísadu, protože tyto extrémní hodnoty pH ochrání výrobek před znehodnocením mikrobiální činností po dlouhou dobu. Navíc, jestliže je součástí systému s extrémním pH konzervační

přísada, může toto extrémní pH poškozením bakteriálních buněk zvýšit antimikrobní účinek konzervantů [12].

Kromě vlivu na činnost mikroorganismů ovlivňuje pH systému také antimikrobiální účinek nebo chemickou stabilitu konzervační přísady, což bývá zřejmé zejména u ionizovatelných konzervantů. Některé látky působí především v neionizované formě, např. konzervanty kyselého charakteru jako kyselina benzoová nebo kyselina sorbová, které jsou účinné v kyselém prostředí [12, 20]. Posunutí pH do alkalické oblasti snižuje jejich antimikrobní aktivitu. Je proto doporučováno, aby se tyto organické kyseliny používaly pouze do přípravků s pH nižším než 5,0 [12]. Naopak kvarterní amoniové soli jako benzalkonium chlorid či cetylpyridinium chlorid jsou účinné ve formě ionizované, a tudíž bez efektu při vysokém pH [20]. Dobrou antimikrobní aktivitu mají v neutrální a slabě alkalické oblasti. Další ilustraci toho, jak pH systém ovlivňuje antimikrobní účinnost konzervantů, lze demonstrovat na solích organických kyselin, sorbátu draselném a benzoátu sodném, které samy nevykazují antimikrobní účinek. Aby se mohly používat jako konzervanty, musí být přidány do vodné fáze preparátu, kde snížením pH dojde k vyvázání aktivní volné kyseliny [12]. Parabeny (estery *p*-hydroxybenzoové kyseliny)vykazují dobré antimikrobní účinky v neutrální oblasti, nicméně optimální účinnost se nachází v kyselé oblasti. Při zvýšení pH nad 8,0 disociují na soli, které jsou antimikrobiálně neúčinné [21].

Mimo antimikrobního účinku může pH kompozice působit i na chemickou stabilitu konzervačního prostředku. Je známo, že některé konzervanty nejsou stabilní při kyselém pH [12]. Například kyselina sorbová oxiduje, jestliže je pH nižší než 5,0. Alkalické pH může, stejně jako kyselé, ovlivnit stabilitu konzervantu, např. parabeny při vysokém pH podléhají hydrolýze. Některé konzervační přísady jsou stabilní při nízkém i vysokém pH. Hlavní zástupce této skupiny, kvarterní amoniová sůl kvaternium–15, je stabilní v rozmezí hodnot pH od 4,0 do 10,0 [12].

2.2.3 Rozpustnost konzervační přísady

Mikroorganizmy se rozmnožují pouze ve vodné fázi přípravku. V případě vícefázového prostředí mohou mikroby růst buď ve vodné fázi, anebo se mohou hromadit na fázovém rozhraní voda-olej [12]. Je účelné, aby se v tomto případě konzervační přísada nacházela zejména ve vodné fázi, kde může působit na mikroorganizmy. Kumulace v olejové fázi má za následek redukci antimikrobní aktivity [20].

Příklady polárních konzervantů, jež mohou být přímo přidány do vodné fáze přípravku, jsou imidazolidinyl močovina, diazolidinyl močovina a kvaternium–15. Parabeny a chlorfenazin mají omezenou rozpustnost ve vodě, proto se musí před přidáním do vodné fáze nejprve rozpustit, přičemž rozpuštěny mohou být buď v rozpouštědle mísitelném s vodou (etanol, propylenglykol, glycerol), nebo v předehřáté vodě za stálého míchání [12].

Jestliže je konzervační přísada rozpustná ve vodné i olejové fázi, má tendenci se do nich distribuovat v určitém poměru koncentrací, který bývá nazýván tzv. rozdělovacím koeficientem. Pokud se konzervační přísada dostane do olejové fáze, nebude mít žádoucí antibakteriální účinek, protože mikroorganismy se nacházejí ve fázi vodné. Řešením tohoto problému je zvýšení koncentrace konzervantu ve vodné fázi nebo omezení jeho rozpustnosti v olejové fázi. Zvyšování koncentrace konzervačních přísad v přípravku ovšem vede k senzitizaci nebo podráždění kůže. Proto se do vodné fáze emulzních přípravků přidává 10% glycerol, etanol, butylenglykol, hexylenglykol nebo 5% propylenglykol, které omezují rozpustnost nepolárního konzervantu v oleji tím, že snižují jeho koncentraci ve vodné fázi emulze [12].

3 PŘEHLED ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

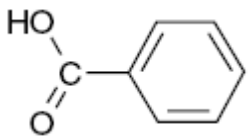
Látky s antimikrobními účinky se v kosmetických prostředcích nepoužívají výhradně pro účely konzervace. Některé z nich díky svým specifickým vlastnostem mohou tvořit aktivní složky deodorantů, šamponů proti lupům, přípravků k péči o zuby a k ústní hygieně, pleťových vod pro problematickou pleť s akné, přípravků k mytí či dezinfekci rukou atd. [22]

Ostatní substance tvořící recepturu kosmetického prostředku mohou mít také antimikrobiální vlastnosti a mohou tak napomáhat konzervaci výrobku. Jde například o řadu éterických olejů a některé alkoholy [23].

Antimikrobiální látky používané v kosmetice zahrnují velmi rozmanitou skupinu jinak navzájem nepříbuzných sloučenin, lišících se chemickou strukturou, původem, účinkem i způsobem použití [2].

3.1 Benzoová kyselina (INCI: Benzoic acid)

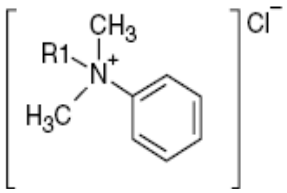
Pro konzervaci se kromě kyseliny benzoové využívají také její soli a estery [7]. Ve vodě je velmi málo rozpustná, lépe se rozpouštějí její soli. Je stabilní při nízkých hodnotách pH prostředí. Optimální účinnosti dosahuje při pH 2,0 až 5,0. Účinná je pouze v nedisociované formě. Inkompatibilita vzniká s kvarterními a neionogenními sloučeninami. V emulzních systémech typu olej ve vodě migruje do olejové fáze [24]. Působí především fungicidně. Mírnou bakteriostatickou aktivitu vykazuje proti většině gram-pozitivních bakterií. Méně účinná je proti gram-negativním bakteriím [25]. Antimikrobiální působení spočívá v narušení membránového elektrického potenciálu svými disociovanými ionty H^+, což má za následek porušení funkce cytoplazmatické membrány. Pravděpodobně také denaturuje proteiny. Používá se ke konzervaci v potravinářství i kosmetice [24]. Nejvyšší povolená koncentrace kyseliny benzoové je 0,4 % pro jeden ester a 0,8 % pro směs esterů [23].



Obrázek 2 – Benzoová kyselina [24]

3.2 Benzalkonium chlorid (INCI: Benzalkonium chloride)

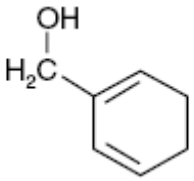
Jedná se o kvarterní amoniovou sloučeninu patřící do skupiny kation-aktivních tenzidů [1]. Benzalkonium chlorid je bílý nebo nažloutlý amorfní prášek velmi dobře rozpustný ve vodě a alkoholech. Používá se jako směs C_8 – C_{18} alkylů [7]. Optimálně účinný je při pH 4,0 až 10,0. Není kompatibilní s anionickými tenzidy a nitráty. Naopak stabilní je ve směsi s EDTA nebo neionogenními tenzidy [24]. Antimikrobiální činnost vykazuje proti bakteriím gram-pozitivním, kvasinkám a plísním, mírně účinný je proti gram-negativním bakteriím [7]. Poškozuje lipidy cytoplazmatické membrány, a tím narušuje integritu buňky [24]. V kosmetice se používá jako konzervační přísada do čisticích a dezinfekčních prostředků. Kromě toho se přidává do vlasových kondicionérů jako antistatická přísada. Maximální koncentrace v kosmetických prostředcích je 0,1% [23].



Obrázek 3 – Benzalkonium chlorid [24]

3.3 Benzylalkohol (INCI:Benzyl alcohol)

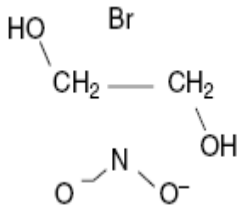
Benzylalkohol je čirá bezbarvá olejovitá tekutina se slabou vůní organického rozpouštědla [26]. Optimálně účinný je při pH nad 5. Pomalu oxiduje na benzaldehyd. Při nízkých pH dochází k jeho dehydrataci [24]. Inaktivuje se při pH vyšším než 8,0 [7]. Působí na gram-pozitivní bakterie, méně pak na gram-negativní, kvasinky a plísně [7]. Poškozuje funkci plazmatické membrány denaturací proteinů a rozpouštěním lipidů [24]. Může se používat v maximálně 1% koncentraci [23]. Bývá často využíván ke konzervaci především kosmetických a farmaceutických preparátů [22].



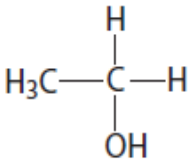
Obrázek 4 – Benzylalkohol [24]

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

Bronopol je bílý krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě a alkoholech [7, 24]. Optimální účinnosti dosahuje v rozmezí pH 5,0 až 7,0. Stabilní je při v kyselém pH [24]. Kompatibilní je s anion-aktivními, kation-aktivními i neionogenními surfaktanty [24]. Nitroskupinou může reagovat s aminy jako je dietanolamin (DEA), trietanolamin (TEA) nebo monoetanolamin (MEA), které jsou běžně součástí šamponů a jiných prostředků osobní hygieny, za vzniku nitrosaminů, jež jsou považovány za potenciální karcinogeny [27]. Nesnáší se s komponenty obsahujícími –SH skupiny a některými kovy (např. hliníkem) [7]. Vykazuje široký antimikrobiální účinek. Působí proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím, kvasinkám a plísním [12]. Vytvářením disulfidových můstků s –SH skupinami způsobuje denaturaci proteinů mikrobiálních buněk. Používá se v koncentraci od 0,01–0,1 % ke konzervaci krémů, šamponů, řasenek, mycích prostředků aj. [24]



Obrázek 6 – Bronopol [24]



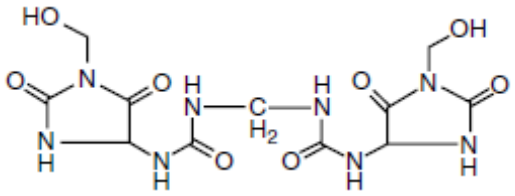
Obrázek 5 – Etanol [28]

3.5 Etanol (INCI: Ethanol)

Etanol je bezbarvá kapalina ostrého charakteristického zápachu. Dobře se mísí s vodou, glycerolem i acetonem. Optimum účinnosti se nachází v kyselém prostředí. Inkompatibilitu projevuje s chlorem, bromem, albuminen [24]. Pro jeho účinnost je nezbytná přítomnost vody. Proto je v 100% koncentraci neúčinný. V 60 - 90% koncentraci vykazuje baktericidní účinek, ale v dezinfekčních přípravcích se vykytuje většinou v 70 %. Ve vyšších koncentracích, např. 90%, účinkuje i proti většině virů včetně HIV [26]. Antimikrobiální účinek spočívá v poškození plazmatické membrány rozpouštěním lipidů a denaturaci proteinů [24]. Etanol je také oblíbený konzervant a rozpouštědlo kosmetických a farmaceutických přípravků [26].

3.6 Imidazolidinylová močovina (INCI: Imidazolidinyl urea)

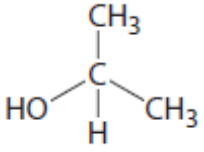
Imidazolidinylová močovina je hygroskopický bílý prášek velmi dobře rozpustný ve vodě, glycerolu a jejich směsích, stejně jako v některých dalších alkoholech [7]. Je inkompatibilní se silnými oxidačními činidly. Naopak kompatibilní je s většinou konzervantů i aktivních kosmetických přísad [25]. Látka je však citlivá na teploty nad 40 °C [7]. Má široké spektrum účinnosti s optimem v rozmezí pH 3,0 až 9,0 [9]. Působí především antibakteriálně, fungicidní účinek vykazuje menší. V kombinaci s parabeny dochází k výraznému posílení antimikrobiálního účinku, částečně i proti kvasinkám [25]. Působí jako donor formaldehydu. Ten reaguje s aminokyselinami proteinů buněčné stěny, plazmatické membrány a cytoplazmy, což vede k jejich denaturaci [24]. Imidurea se může aplikovat nejvýše v 0,6% koncentraci [23]. Bývá součástí krémů, šamponů, vlasových kondicionérů aj. [24]



Obrázek 7 – Imidazolidynylová močovina [26]

3.7 Izopropanol (INCI: Isopropanol)

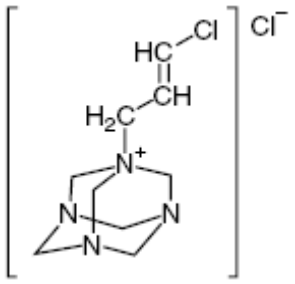
Izopropanol je bezbarvá kapalina charakteristické lihové vůně. Nesnáší se s oxidačními činidly, které jej rozkládají. Izopropanol působí baktericidně, v 70% roztoku je více účinný než 95% etanol [25]. Oproti etanolu ovšem účinkuje méně vůči virům, zejména neobaleným, a také má omezené virucidní spektrum [26]. Primárně se používá v kosmetických prostředcích jako rozpouštědlo. Bývá součástí pleťových vod, ale jeho výrazný odmašťovací účinek může frekvenci používání přípravku omezit [25]. V 60-70% koncentraci bývá součástí dezinfekčních prostředků nebo se používá jako konzervant kosmetických preparátů [26].



Obrázek 8 – Izopropanol [28]

3.8 Kvaternium – 15 (INCI: Quaternium – 15)

Jedná se o kvarterní sloučeninu, jejímž základem je cykloalkan adamantan. Vyskytuje se ve formě krémového prášku. Rozpouští se vodě, méně v glycerolu a etanolu. Snáší se s proteiny, anion-aktivními, kation-aktivními i neionogenními tenzidy. Optimálně účinkuje v rozmezí pH 4,0 až 10,0 [24]. Vykazuje účinek proti bakteriím. Méně účinný je vůči kvasinkám a plísním [7]. Ze své molekuly uvolňuje formaldehyd, který alkyluje $-NH_2$ a -SH skupiny aminokyselin, což má za následek denaturaci proteinů. Odštěpený formaldehyd se dále podílí na rozrušení dusíkatých bází a denaturuje tak DNA [24]. Nejvyšší přípustná koncentrace je 0,2 % [23]. Používá se ke konzervaci celé řady kosmetických prostředků např. krémů, šamponů, pleťových vod aj. [24]

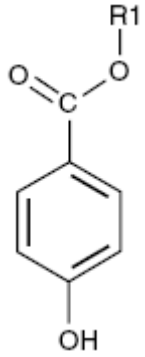


Obrázek 9 – Kvaternium – 15 [24]

3.9 Parabeny (INCI: Parabens)

Jedná se o metyl-, etyl-, propyl-, izopropyl-, butyl- nebo izobutyl estery kyseliny benzoové a jejich solí. Antimikrobiálně účinné jsou v širokém rozmezí hodnot pH od 3,0 do 9,5 [24]. Aktivita parabenů stoupá se vzrůstající délkou uhlovodíkového řetězce, přičemž jejich rozpustnost ve vodě se snižuje. Antimikrobiální aktivita se také zvyšuje ve směsi různých esterů, které zde na sebe působí synergicky. Dobrý účinek vykazují proti gram-pozitivním bakteriím, kvasinkám i plísním. Poněkud méně účinné jsou proti gram-negativním bakteriím [25]. Mechanismus antimikrobiálního účinku je založen na narušení membránového potenciálu, dochází tak k selhávání membránového transportu a tvorby energie. Mikrobiální buňky v jejich přítomnosti sice podléhají úniku intracelulárního obsahu, nicméně skelet zůstává zcela zachován a po odstranění parabenů se buněčný intracelulární obsah vrátí do původního stavu. To naznačuje, že parabeny nezpůsobují lýzu buňky ani poškození cytoplazmatické membrány [24]. Mohou být součástí přípravků buď samostatně v maximální

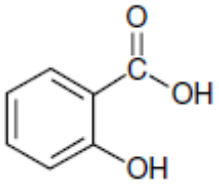
povolené koncentraci 0,4 %, nebo ve směsi esterů o celkové koncentraci 0,8 % [23]. V současnosti se jedná o nejrozšířenější konzervační systémy v kosmetice [29]. Nicméně některé nedávné studie vyvolávají obavy z jejich použití. Především se jedná o jejich estrogenní potenciál, jenž může mít podíl na výskytu rakoviny prsu a snížené schopnosti reprodukce. Publikované výzkumy nepřinesly zatím jednoznačné výsledky [30].



Obrázek 10 – Paraben [24]

3.10 Salicylová kyselina (INCI: Salicylic acid)

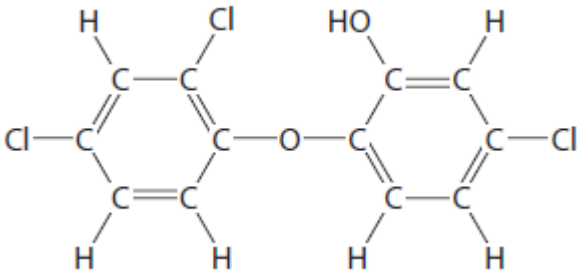
Za normálních podmínek se kyselina salicylová vyskytuje v krystalické formě. Špatně se rozpouští ve vodě, ve formě solí se rozpouští snadněji. Optimální účinnosti dosahuje při pH 2,0 až 5,0. Na světle je nestabilní. Inkompatibilní bývá v přítomnosti jódu a solí železa [24]. Proti bakteriím vykazuje lepší účinnost než kyselina benzoová, nicméně její fungicidní účinek je větší než antibakteriální [12]. Reakcí s proteiny poškozuje cytoplazmu mikrobiálních buněk. Také zasahuje do syntézy kyseliny pantotenové, která je nepostradatelná pro celou řadu mikroorganismů, především bakterií [31]. Nejčastěji bývá kyselina salicylová a její soli součástí pleťových vod pro pokožku se sklonem k akné a v přípravcích proti lupům. Může se používat v maximální koncentraci 2 %. Výjimkou jsou přípravky na vlasy, kde může být obsažena v 3% koncentraci. Nesmí se používat v přípravcích pro děti do 3 let, s výjimkou šamponů [23].



Obrázek 11 – Salicylová kyselina [24]

3.11 Triklosan (INCI: Triclosan)

Triklosan je bělavý, krystalický prášek slabého zápachu [22]. Antimikrobně působí vůči gram-pozitivním bakteriím, méně proti gram-negativním bakteriím, plísním a kvasinkám [7]. Optimálně je účinný při pH 4,0 až 8,0, přičemž optimum se nachází kolem 5,0 [22]. Nerozpouští se ve vodě, rozpustný je však ve vodně alkalickém prostředí a v řadě organických rozpouštědel. Nelze jej kombinovat s neionogenními tenzidy a lecitiny [7]. Bakteriostatický účinek je založen na inhibici příjmu esenciálních látek plazmatickou membránou, zatímco při baktericidní koncentraci triklosan naruší plazmatickou membránu a dojde tak k úniku nízkomolekulárních buněčných komponent. Široké spektrum účinku, stabilita a dobrá kožní snášenlivost umožňují jeho použití v toaletních mýdlech, medicinálních mýdlech, ústních vodách, antiperspirantech, deodorantech atd. [22] Nevyšší povolená koncentrace v kosmetických prostředcích je stanovena na 0,3 % [23].



Obrázek 12 – Triklosan [28]

4 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ

V praktické části této práce byla zhodnocena antimikrobiální účinnost různých prostředků osobní hygieny. Konkrétně se jednalo o toaletní a tekutá mýdla běžného typu, popř. s antibakteriální přísadou, sprchové gely a dezinfekční přípravky na alkoholové bázi.

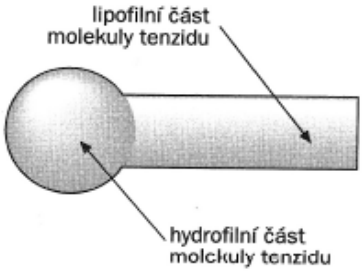
4.1 Základní složky

Prostředky k očistě kůže obsahují ve své receptuře v zásadě tyto složky: vodu, olej, tenzidy, barviva, vůně, konzervanty, vitaminy atd. [32] Nejdůležitější aktivní ingredienci tvoří tenzidy [27]. Tenzidy je skupinové označení povrchově aktivních látek (PAL), jejichž společnou charakteristikou je, že již při nízké koncentraci v soustavě jsou schopny se hromadit na fázovém rozhraní, a tak snižovat volnou mezifázovou, resp. povrchovou, energii soustavy (tj. snižují povrchové napětí) [33].

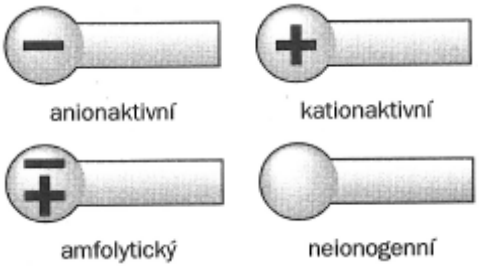
Povrchová aktivita tenzidu je významná zejména ve vodných roztocích, protože voda má poměrně vysoké povrchové napětí. Jestliže se povrchové napětí vody sníží rozpuštěním tenzidu, je práce potřebná k zvětšení povrchu poměrně nízká. To se projevuje v čisticím účinku, ve schopnosti vytvářet pěnu, emulgovat, smáčet, dispergovat apod. [33]. Povrchová aktivita tenzidů je podmíněna přítomností amfifilní molekulové struktury. Tu tvoří dvě části – hydrofilní a lipofilní (*Obrázek 13*) [8]. Tenzidy je možné dělit z mnoha hledisek, ale nejběžnější je dělení podle iontového charakteru, jak ilustruje *Obrázek 14*. Detergenční účinek těchto látek, např. při mytí pokožky, spočívá v tom, že hydrofobní část molekuly směřuje ven z povrchové vrstvy vody (zachytí se v částici nečistoty, např. mastnoty) a hydrofilní směřuje do objemu vody, kde se rozpustí. Hydrofobní část zachycená v částici nečistoty se pak spláchne vodou [33].

PAL používané v kosmetice nesmí vyvolávat alergické reakce, senzibilizaci a iritaci pokožky, ani obsahovat toxicky působící příměsi. Z důvodu minimalizace zdravotních rizik se projevuje tendence výrobců používat tenzidy na bázi polymerů, jež mají menší schopnost pronikat do *stratum corneum*, a tím způsobit poškození. Konvenční anion-aktivní, kation-aktivní, amfoterní a neionogenní PAL jsou také běžnou součástí kosmetik [32]. Vedle synteticky připravených tenzidů se stále značná část povrchově aktivních látek vyrábí z přírodních surovin [33].

Při formulaci kosmetických prostředků k čištění pleti a těla je kladen důraz zvláště na výběr povrchově aktivních ingrediencí šetrných a bezpečných k pokožce, vykazujících dobrý čisticí účinek, tvořících bohatou, hustou a stabilní pěnu, kondiciujících pleť, snadno oplachovatelných a biologicky rozložitelných [18].



Obrázek 13 – Schematické znázornění molekuly tenzidu [8]



Obrázek 14 – Rozdělení tenzidů na základě struktury [8]

4.2 Mýdla

Ačkoli původ mýdla není přesně zřejmý, předpokládá se, že výroba jeho primitivních forem se datuje do období 2000 let př. n. l. [34] Mýdla jsou i dnes stále považována za nejdůležitější prostředky pro čištění pokožky rukou nebo celého těla [7, 35]. Mytí rukou je již dlouhou dobu pokládáno za jednu z nejjednodušších a nejdůležitějších prevencí šíření onemocnění, jak ve zdravotnických, tak i nezdravotnických zařízeních [36]. Jedná se o mechanické odstranění nečistot a částečně i přechodné mikroflóry z pokožky rukou a na mikroorganizmy nepůsobí letálně [6, 43]. Podstatou mýdel jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin, avšak v poslední době se k nim přiřazují i produkty, které neodpovídají svou povahou striktně této definici [7].

4.2.1 Klasická mýdla

Klasická toaletní mýdla jsou sodné soli převážně nasycených mastných kyselin s délkou řetězce 16 – 18 uhlíků. Obsahují jen malé množství mono- nebo polyenových mastných kyselin s řetězcem o 12 – 14 atomech uhlíku [8]. Jsou vyráběny procesem zmýdelnění, což představuje působení alkálií na triacylglyceroly tuku nebo oleje [29]. Hlavními surovinami pro výrobu jsou hovězí lůj, kokosový a palmojádrový tuk [8].

Toaletní mýdla v sobě slučují výborné emulgační, smáčecí a čisticí účinky [33]. Naopak k nepříznivým účinkům se řadí iritace nebo senzibilizace pleti [8]. Za základní škodlivý vliv mýdla, z něhož vyplývá řada ostatních, je považována alkalizace pokožky [8]. Typické pH

mýdel se totiž pohybuje v rozmezí 9,0 – 11,0 [37]. Tato poměrně vysoká hodnota je dána hydrolýzou mýdla, kdy dochází k uvolňování rovnovážného množství zásad [33]. Při mytí tak kromě emulgace a odstranění ochranného kyselého kožního filmu dochází k přechodné alkalizaci pokožky a komplikacím mikrobiálním, popř. kvasinkovým, onemocněním. [38]. Vlastní odmašťovací účinky na pokožku jsou pouze mírné [8]. Nepříznivá je i tvorba sraženin s vápenatými a hořečnatými ionty z tvrdé vody, které ulpívají na pokožce [33]. Ve vodě jsou nerozpustná a vzniklé krystalky mohou mechanicky dráždit. Dalším nežádoucím důsledkem mytí je bobtnání kůže, které stoupá s alkalitou prostředí. Komplex uvedených faktorů se promítá do stavu kožního povrchu a je podstatou pálení, vysoušení, praskání, zarudnutí, zhrubění kůže, ať už u citlivých osob, nebo u jedinců s normálním kožním obrazem po neúnosně častém kontaktu kůže s alkylkarboxyláty [8].

Mýdla bývají obvykle obohacena o řadu složek, jež modifikují jejich vlastnosti. Z důvodu zlepšení fyziologického chování mýdel se do receptury přidávají tzv. přetučňující přísady (volné mastné kyseliny), které mají minimalizovat odmašťující účinek na pokožku [7, 38]. Kvalita se také výrazně vylepšuje přídavkem komponentů vázajících vodu (humektantů) jako glycerol a proteinové hydrolyzáty rostlinného nebo živočišného původu (sója, mandle, kolagen) [7]. Častá je rovněž kombinace se syntetickými tenzidy, které snižují iritační účinek alkylkarboxylátů, přičemž pH tím klesne přibližně na 9,0 – 9,5 [29]. Přídavkem jiných typů syntetických tenzidů lze omezit i jejich precipitaci v tvrdé vodě. Dalšími aditivy přidávanými do mýdlového základu jsou rovněž antioxidanty, chelatační činidla, barviva, optické zjasňovače, konzervanty, změkčovadla, pojiva, vůně, perletě atd. [32] Typická kompozice toaletního mýdla je uvedena v *Tab. 3*.

Tabulka 3 – Rámcové složení toaletního mýdla [39, 40, 41].

Složení	**Funkce**	**Obsah**
Sodné soli mastných kyselin (C12-C16)	Aktivní složka	< 80 %
Volné mastné kyseliny popř. oleje	Emolient, kondicionér	< 5 %
Glycerol	Humektant	5 %
Fragrance	Estetická složka	< 1 %
Konzervanty	Mikrobiální stabilita	< 1 %
Barviva	Estetická složka	< 0,5 %
Dextrin, křída	Plnivo	podle typu mýdla
Syntetický tenzid	Kosurfaktant	podle typu mýdla

4.2.2 Syntetická mýdla

Syntetická mýdla jsou velmi perspektivní skupinou nového typu mýdel. Jde o mýdla na bázi syntetických tenzidů (na rozdíl od klasických mýdel na bázi alkylkarboxylátů) [33]. Jako základ jsou používány převážně nejrůznější anion-aktivní tenzidy, např. alkylsulfáty a mnoho jiných v kombinaci s neionogenními či amfoterními tenzidy a případně s biopolymery. Výhodou tohoto typu mýdel je jejich stálost v tvrdé a mořské vodě, tedy i skutečnost, že nemůže dojít k poškození kůže krystaly vápenatých a hořečnatých precipitátů [8]. Nespornou výhodou je rovněž jejich pH příznivější pro pokožku, které se pohybuje v neutrální oblasti [29, 33]. Při používání však dochází k mnohem intenzivnějšímu odmašťování než při použití mýdel klasických. I z hlediska dráždivosti jsou syntetické tenzidy více škodlivé. Syndety jsou také náročnější na výrobu a při mytí mají větší spotřebu. Současný stav používání plně syntetických mýdel je možno uzavřít tak, že by tento druh přípravků měli volit zvláště ti jedinci, kteří působení alkalického mýdla z jakýchkoliv důvodů nesnášejí. Vzhledem k intenzivnějšímu čisticímu účinku se mohou dobře uplatnit také v profesích, kde dochází ve vyšší míře k znečišťování pokožky organickou špínou [8]. Přes řadu optimistických prognóz o rozšíření tohoto typu prostředků se syndety na evropském trhu dosud výrazněji neosvědčily [33].

Jako v klasických toaletních mýdlech jsou i zde přítomny nejrůznější aditivní látky typu parfémů, optických zjasňovačů, stabilizátorů, barviv, regulátorů viskozity atd. [8].

4.2.3 Tekutá mýdla

Podíl tekutých mýdel se na trhu postupně zvyšuje na úkor mýdel toaletních [33, 40]. Jedná se o zahuštěné roztoky tenzidů, které se jednoduše aplikují pomocí dávkovače nebo stlačením plastové láhve [32]. PAL zastoupené v tekutých mýdlech mohou být dvojího typu. Jedná se buď o klasické alkylkarboxyláty nebo syntetické tenzidy. Tekuté prostředky na trhu v Evropě a USA jsou téměř výhradně na bázi syntetických tenzidů [40]. Jejich výroba je založena na kombinaci primárního tenzidu, převážně anion-aktivního charakteru a dále tzv. sekundárních tenzidů, zejména amfoterních a neionogenních [33]. Hlavní funkcí primárních tenzidů je zajistit žádoucí čisticí efekt, dále jsou nezbytné pro tvorbu adekvátní pěny a viskozity přípravku [40]. Sekundární tenzidy ve spojení s primárními zvyšují pěnivost nebo zjemňují výslednou formulaci [42]. K těmto základním aktivním složkám jsou přidávány stabilizátory pěny, zahušťující přísady, parfémy, ztučňující přísady, barviva, perleťující látky atd. [33]. Hodnota pH tekutých mýdel je pro pokožku ještě příznivější než u syntetických

toaletních mýdel a pohybuje se v oblasti 5,5 – 7,0 [40]. V poslední době se do některých tekutých mýdel používá přídavek krému. Nejde většinou o klasický krém, ale o olejovou, snadno emulgovatelnou složku, působící příznivě na snížení dermální iritace vlivem obsažených syntetických tenzidů [33]. Základní receptura tekutého mýdla je znázorněna v *Tab. 4*.

Tekutá mýdla mají svojí nenahraditelnou funkci při použití na veřejných místech, kde z hygienických důvodů jsou dávkovače zamezující vzájemnému kontaktu uživatelů ideální volbou [33].

Tabulka 4 – Rámcové složení tekutého mýdla [39, 40].

Složení	**Funkce**	**Obsah**
Anionický tenzid	Primární tenzid	30 %
Neionický tenzid	Sekundární tenzid	3 – 5 %
Amfoterní tenzid	Sekundární tenzid	3 – 5 %
Glycerol	Humektant	5 %
Deriváty tuků + estery	Kondicionéry	3 – 5 %
Parfém	Estetická funkce	0,3 – 1,5%
Barviva	Estetická funkce	< 0,1%
Konzervant	Mikrobiální stabilita	< 1%
NaCl	Úprava viskozity	< 5 %
Voda	Vehikulum	ad 100 %

4.2.4 Antibakteriální mýdla

Antibakteriální mýdla jsou přípravky, které kombinují mechanické odstranění nečistot a mikroorganizmů s účinkem antimikrobní přísady, jež zůstává na kůži i po umytí, což vede k další redukci mikroflóry [43]. Důležitou podmínkou jejich antimikrobní účinnosti je doba, po kterou jsou zanechány na pokožce a dostatečná koncentrace aktivní složky [44]. Odborná veřejnost se shoduje v tom, že mytí rukou vodou a mýdlem vede ke snížení množství infekčních onemocnění. Neustále však přetrvávají pochybnosti, zda mýdla s antibakteriálními přísadami jsou v tomto směru více efektivní [36]. První antibakteriální mýdlo se objevilo na trhu v roce 1994 v USA. Tento trend se odtud začal postupně šířit i do Evropy a zbytku světa. V Evropě se ovšem tyto produkty netěší takové oblibě jako v USA [40]. Nejvíce využívanými antimikrobními přísadami jsou triklosan a triklokarban [42]. Nejvyšší povolené koncentrace v kosmetice jsou vyhláškou stanoveny na 0,3% pro triklosan a na 1,5% pro triklokarban [23].

Kromě nich se zvláště v Evropě využívá antimikrobního účinku éterických olejů, např. geraniolu, limonenu nebo přídavku organických kyselin, které snižují celkové pH systému [40]. Na přípravky určené pro pracovníky ve zdravotnictví nebo potravinářství jsou z hlediska antimikrobní účinnosti kladeny přísnější požadavky, a proto obsahují silná baktericidní činidla jako chlorhexidin nebo benzalkonium chlorid [29].

4.3 Sprchové gely

Sprchové gely slouží k mytí pokožky celého těla. Mohou to být až do gelů zahuštěná tekutá mýdla nebo gely s určitým množstvím povrchově aktivní látky [35]. Hodnota pH je velmi příznivá k pokožce, pohybuje se kolem 5,5 [40]. Tvorba gelů je založena na úpravě pH polyakrylátových polymerů, tzv. karbomerů. Při nízkém pH tyto gelotvorné látky tvoří řídký roztok, neutralizací na pH těsně pod 7 tvoří podle typu karbomeru husté viskózní gely [33]. Sprchové gely obecně obsahují tenzidy více šetrné k pokožce. Další rysem je vyšší zastoupení hydratačních a kondiciujicích složek [42]. K dispozici jsou dnes gely s aromaterapeutickými složkami na bázi éterických olejů, které navíc přinášejí relaxační účinky. Touha pro mladistvý vzhled vede k vývoji a uvádění na trh celé řady tzv. antiaging sprchových gelů, které slibují zpevnění, exfoliaci kůže atd. [40]

4.4 Dezinfekční prostředky na alkoholové bázi

Prostředky na alkoholové bázi jsou speciálně určeny k dezinfekci rukou [45]. Většina z nich obsahuje buď etanol, izopropanol, nebo n-propanol, popřípadě jejich kombinace [46]. Jsou k dispozici v různých koncentracích, někdy s přídavkem malého množství jiných antiseptik. Jejich antimikrobiální aktivita spočívá v schopnosti denaturovat proteiny [43]. Vykazují antibakteriální, antimykotické i antivirové účinky. Rychle a trvale redukují počty mikroorganizmů na kůži. Alkoholy ovšem vedou k vysušování pokožky, proto se do komerčních přípravků přidávají emolienty, humektanty a další složky k minimalizaci tohoto nežádoucího jevu [4]. Díky své vyšší efektivitě, rychlejší aplikaci bez nutnosti oplachování, větší šetrnosti k pokožce a významnému podílu na snížení počtu infekčních onemocnění tyto přípravky nahradily antimikrobiální mýdla v dezinfekci rukou [45, 46]. Představují rovněž vhodnou alternativu, jestliže mýdlo a voda nejsou dostupné [47]. Nedoporučuje se je používat, pokud jsou ruce viditelně znečištěny nebo kontaminovány organickým materiálem, protože by došlo k snížení jejich účinku [5, 44]. Na trhu se vyskytují v několika formách, nejčastěji se jedná o gely, roztoky a pěny [48].

5 CÍL PRÁCE

Cíle této práce byly formulovány takto:

- shrnout dostupné poznatky týkající se kožní mikroflóry a jejího podílu na vzniku onemocnění,
- popsat problematiku mikrobiální bezpečnosti kosmetických prostředků,
- charakterizovat nejpoužívanější antimikrobiální látky v kosmetice,
- porovnat antimikrobní účinky běžných mýdel, antibakteriálních mýdel a dezinfekčních gelů popř. roztoků na alkoholové bázi.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Bakteriální kmeny

Antimikrobiální účinek vybraných prostředků byl testován na čtyřech bakteriálních kmenech, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně.

- Grampozitivní kmeny:

Micrococcus luteus CCM 732

Staphylococcus aureus subps. *aureus* CCM 3953

- Gramnegativní kmeny:

Escherichia coli CCM 3954

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

6.2 Testované prostředky

K testu bylo vybráno celkem 80 přípravků, které byly pořízeny v běžné obchodní síti a lékárnách. Jednalo se o:

- 27 sprchových gelů,
- 11 tekutých mýdel, 13 toaletních mýdel,
- 6 antibakteriálních toaletních mýdel, 7 antibakteriálních tekutých mýdel,
- 13 antibakteriálních gelů na alkoholové bázi,
- 3 antibakteriální alkoholové roztoky.

6.3 Přístroje a vybavení

Autokláv

Automatické mikropipety

Biologický termostat

Horkovzdušná sušárna

Chladnička

Laboratorní sklo

Očkovací pomůcky

Plastové zkumavky

Předvážky

Plynový kahan

Třepačka

6.4 Kultivační média

6.4.1 Masopeptonový agar

Složení:

Masový výtažek (HiMedia, Bombai, Indie)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (LachNer, Neratovice, ČR)	3,0 g
Agar (HiMedia)	15,0 g
H_2O	1000,0 ml

Příprava: Bylo naváženo 26 g přípravku do 1000 ml destilované vody a rozpuštěno v zásobní láhvi. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

6.4.2 Masopeptonový bujón

Složení:

Masový výtažek (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (LachNer)	3,0 g
H_2O	1000,0 ml

Příprava: 11 g směsi bylo naváženo do 1000 ml destilované vody, rozpuštěno a dáno ke sterilizaci v autoklávu při 121°C po dobu 15 min.

6.4.3 Mueller-Hinton agar (MHA)

Složení:

Hovězí masová infuse	2,0 g
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g
Škrob	1,5 g
Agar	17,0 g
H_2O	1000,0 ml

Příprava: 38 g přípravku (HiMedia) bylo naváženo do 1000 ml destilované vody, rozpuštěno a následně sterilizováno při teplotě 121°C po dobu 15 minut.

6.4.4 Plate count agar (PCA)

Složení:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasničný extrakt	2,5 g
Glukosa	1,0 g
Agar	15,0 g
H_2O	1000,0 ml

Příprava: 23,5 g směsi (HiMedia) bylo naváženo do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění bylo dáno sterilizovat do autoklávu při teplotě 121°C na dobu 15 minut.

6.5 Roztoky

Denaturovaný líh

Fyziologický roztok

NaCl (LachNer)	8,5 g
H_2O	1000, 0 ml

Příprava: 8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

6.6 Metody stanovení

6.6.1 Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám difúzní diskovou metodou

6.6.1.1 Příprava vzorků

Do plastových zkumavek byly odebrány vzorky testovaných přípravků. Přípravky husté konzistence byly pro potřeby stanovení zředěny sterilní destilovanou vodou v poměru 1:1. U antibakteriálních gelů toto nebylo možné, protože se po aplikaci na kůži nemají dle návodu na použití oplachovat.

6.6.1.2 Příprava suspenze testovaných bakteriálních kmenů

Čistá kultura byla naočkována z Petriho misky do zkumavky s MPB. Následně byla kultivována za stálého protřepávání po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě.

6.6.1.3 Stanovení inhibičního účinku

Bakteriální suspenze (kultivovaná přes noc) byla stokrát zředěna sterilním fyziologickým roztokem a v množství 150 µl naočkována na sterilní plotnu s MHA. Sterilní hokejkou pak byla rozetřena po celé ploše plotny. Po zaschnutí byly na povrch půdy za aseptických podmínek pinzetou položeny sterilní disky z filtračního papíru. Na disky byly postupně pipetovány vzorky v množství 7,5 µl na jeden disk. Výjimkou byl disk kontrolní, na který byla pipetována sterilní destilovaná voda. Misky byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly změřeny inhibiční zóny (mm) vzniklé v okolí disků inhibičním působením zvolených prostředků.

6.6.2 Doplňková metoda pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám

6.6.2.1 Příprava vzorků

Testované kosmetické prostředky byly za aseptických podmínek naředěny destilovanou vodou v poměru 1:1.

6.6.2.2 Příprava suspenze testovaných bakteriálních kmenů

Inokulum bylo naočkováno z Petriho misky do sterilní Erlenmeyerovy baňky s masopeptonovým bujonem. Poté bylo kultivováno po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě.

Některé z pomnožených kultur bylo nutné z důvodu vysoké hustoty inokula zředit fyziologickým roztokem v požadovaném poměru na hodnotu 1,5 dle McFarlandovy stupnice.

6.6.2.3 Stanovení inhibičního účinku

Připravené suspenze byly postupně očkovány v množství 100 µl do zkumavek s testovaným vzorkem a nechány inkubovat při 30°C po dobu 30 minut. Suspenze vzorků s pomnoženou kulturou byly po skončení kultivace naočkovány po 100 µl na Petriho misky s PCA. Stejně se postupovalo i v případě jejich desetinásobného zředění. Kultivace misek položených dnem vzhůru probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byl sledován nárůst bakteriálních kolonií na miskách. Antimikrobiální účinky vzorků se projevily nepřítomností nárůstu daného kmene bakterií.

6.6.3 Metoda otisků prstů pro stanovení účinnosti dezinfekce pokožky

Konečky prstů přirozeně kontaminovaných rukou pokusných osob byly otisknuty na kontrolní pevné agarové plotny s PCA. Poté byla stejná místa na rukou ošetřena neředěným přípravkem na alkoholové bázi, který se nechal působit 5 minut, a otisknuta obdobným způsobem. Všechny agarové plotny položené dnem vzhůru, se pak 24 hodin inkubovaly v termostatu při 37 °C. Hodnotil se nárůst kolonií na kontrolních a pokusných plotnách.

7 VÝSLEDKY

7.1 Antimikrobiální účinky testovaných sprchových gelů

Na základě výsledků uvedených v *Tabulce 5* lze vyvodit, že na vybrané bakteriální kmeny, s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa*, působily sprchové gely prokazatelně inhibičně. Projevily se zde ovšem výrazné rozdíly v citlivosti kmenů na přípravky v závislosti na složení bakteriální buněčné stěny. U bakterií gram-negativních bylo dosaženo mnohem menšího antimikrobního účinku, než tomu bylo u bakterií gram-pozitivních. Zvláště citlivá byla k působení sprchových gelů bakterie *Micrococcus luteus*, kterou se podařilo inhibovat bez výjimky všemi testovanými přípravky. Nejzřetelnější antimikrobní aktivita byla zaznamenána u sprchového gelu IR Aloe Barbadensis. Tento přípravek společně s gelem Oriflame Lime and Ginger vykazoval nejkomplexnější inhibiční účinek z celé testované skupiny.

Tabulka 5 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků sprchových gelů na vybrané mikroorganizmy.

Číslo	Název přípravku	Ø inhibiční zóny (v mm) u testovaných kmenů			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
1+	Nivea Yoghurt and Aloe vera	10*	15	-	-
2+	Oriflame Lime and Ginger	10*	25	-	8*
3+	Adidas Hair and Body	-	22	-	-
4+	Nivea Vitality fresh	-	15	-	-
5+	Radox Milk and Berries	8	25	-	-
6+	Radox Energy Boost	-	25	-	10*
7+	Adidas Soft Cotton	8*	21	-	-
8+	Avon Sense Reflection	13*	26	-	-
9+	Fa Rose and Almond Milk	-	19	-	-
10+	Ballea Men	7	23	-	-
11+	Fa Silk and Magnolia	9*	17	-	-
12+	Nivea Lemon and Ginger	7*	19	-	-
13+	Isana	7*	20	-	-
14+	Avon Triple Senses	8*	25	-	-
15+	Fa Yoghurt and Aloe vera	-	20	-	-
16+	Avon Floral prints Lavender	10	28	-	-
17+	Radox Milk and Pearls	8*	25	-	-
18+	Dove Cream Oil Rosewood and Cocoa Butter	-	16	-	-
19+	Avon Senses Tropic	11*	25	-	-
20+	Avon Senses Aloha	12*	23	-	-
21+	IR Aloe Barbadensis	16	24	-	8*
22+	Johnson´s Be Fresh and Escape	-	18	-	-
23+	Johnson´s Be Fresh and Imagine	-	12	-	-
24+	Dove Beauty Care	7*	20	-	-
25+	Rosmann Men	7*	20	-	-
26+	Ballea Young Peachy Rose	7*	19	-	-
27+	Pí Pěničková vinný gel	-	19	-	-

Pozn. + vzorek ředěn v poměru 1:1 z důvodu jeho husté popř. pevné konzistence,
* nevýrazná inhibiční zóna, - nepřítomnosti inhibiční zóny

7.2 Antimikrobiální účinek testovaných mýdel

Z naměřených hodnot inhibičních zón uvedených v *Tabulkách 6 a 7* je patrné, že běžně používaná mýdla vykazují antimikrobiální účinek. Mýdla toaletní inhibičně téměř nepůsobila, vyjma toaletního mýdla Fa Natural and Soft, k němuž byla citlivá gram-pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*.

Tabulka 6 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků tekutých mýdel na vybrané mikroorganizmy.

Číslo	Název přípravku	Ø inhibiční zóny (v mm) u testovaných kmenů			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
28+	Lilien med a propolis	-	25	-	-
29+	Ecovira	-	20	-	11
30+	Euroshopper mango	11	20*	-	-
31+	Lilien Exklusive olivy	8*	21	-	-
32+	Bohemia jogurt třešeň	11*	22	8*	11
33+	Palmolive Sublime Purity	-	21	7	-
34+	Palmolive Sublime Beauty	12*	25	-	9*
35+	Radox Clean and Replenish	8	23	-	-
36+	McBride	-	26	8	-
37+	Tesco broskev	-	25	8	10*
38+	Radox Clean and Protect	9	25	-	7

Pozn. + vzorek ředěn v poměru 1:1 z důvodu jeho husté popř. pevné konzistence,
* nevýrazná inhibiční zóna, - nepřítomnosti inhibiční zóny

Tabulka 7 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků toaletních mýdel na vybrané mikroorganizmy.

Číslo	Název přípravku	Ø inhibiční zóny (v mm) u testovaných kmenů			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
39+	Lux Lilie	-	-	-	-
40+	Ailé orchid	-	-	-	-
41+	Nivea Cream soft	-	-	-	-
42+	Dove Go Fresh Touch	-	-	-	-
43+	Camay Creme Delice	-	-	-	-
44+	Ballea krémové	-	-	-	-
45+	Arko Peach	-	-	-	-
46+	Palmolive Cashmere	-	-	-	-
47+	Miléne Aloe Vera	-	-	-	-
48+	Fa Natural and Soft	-	9	-	-
49+	Ream Quartet	-	-	-	-
50+	Palmolive Naturals Citrus and Cream	-	-	-	-
51+	Lux mandlový olej	-	-	-	-

Pozn. + vzorek ředěn v poměru 1:1 z důvodu jeho husté popř. pevné konzistence,
* nevýrazná inhibiční zóna, - nepřítomnosti inhibiční zóny

Naproti tomu tekutá mýdla působila inhibičně v daleko větší míře. Zvláště výrazné byly antimikrobiální účinky přípravku Radox Clean and Protect s výtažky tymiánu a tea tree olejem. Vzniklé inhibiční zóny měly ostré jasné ohraničení. Jediným přípravkem, který působil inhibičně napříč celým testovaným bakteriálním spektrem, bylo Bohemia jogurtové

mýdlo. Ovšem v jeho případě se jednalo o nevýrazné inhibiční zóny. Dále byl zjištěn významný rozdíl v citlivosti bakteriálních kmenů na vybrané přípravky. Gram-negativní bakterie byly mnohem méně vnímavé k působení přípravků než baterie gram-pozitivní.

7.3 Antimikrobiální účinek testovaných mýdel s antibakteriální přísadou

V této skupině, jak dokládá *Tabulka 8*, se nenacházel ani jeden přípravek, který by byl schopen inhibovat růst všech testovaných bakterií. Pokud byly pozorovány inhibiční zóny, byly téměř ve všech případech zřetelně ohraničené.

Tabulka 8 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků mýdel s antibakteriální přísadou na vybrané mikroorganizmy.

Číslo	**Název přípravku**	**Ø inhibiční zóny (v mm) u testovaných kmenů**			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
52+	Dettol toaletní mýdlo Fresh	-	-	-	-
53+	Dettol toaletní mýdlo Sensitive	-	-	-	-
54+	Protex toaletní mýdlo Aloe	12	10	-	-
55+	Protex toaletní mýdlo Fresh	12	11	-	-
56+	Protex toaletní mýdlo Herbal	11	9	-	-
57+	Protex toaletní mýdlo Propolis	12	9	-	-
58+	Protex tekuté mýdlo Ultra	32	13	-	28
59+	Protex tekuté mýdlo Herbal	33	18	-	27
60+	Mika Classic tekuté mýdlo Kiss	25	40	-	-
61+	Prosavon dezinfekční mýdlo	-	40	-	11*
62+	Prosavon tekuté mýdlo	-	30	-	12
63+	Bohemia tekuté mýdlo antibakteriální	11*	36	-	9*
64+	Dettol tekuté mýdlo Fresh	11*	22	-	-

Pozn. + vzorek ředěn v poměru 1:1 z důvodu jeho husté popř. pevné konzistence,
* nevýrazná inhibiční zóna, - nepřítomnosti inhibiční zóny

Nejvýraznější antimikrobiální účinnost prokázala tekutá mýdla Protex, která působila na všechny testované bakterie téměř identicky. Nejvíce citlivý na tuto skupinu mýdel byl *Micrococcus luteus*. *Pseudomonas aeruginosa* naopak vykazovala nejvyšší odolnost.

Výsledky získané difúzní diskovou metodou byly poněkud překvapivé, vzhledem ke skutečnosti, že výrobci na obalech deklarují jejich antimikrobiální účinnost. Z tohoto důvodu byla použita doplňková metoda stanovení citlivosti k vybraným přípravkům. *Z Tabulky 9* pak vyplývá, že v přítomnosti použitých přípravků s deklarovaným účinkem opravdu většina testovaných kmenů nepřežívá. Toto zjištění je v přímém rozporu s výsledkem difúzní diskové

metody. Rozdíly mohou být způsobeny dvojnásobným ředěním přípravků nebo také horší schopností difundovat v pevné kultivační půdě.

Tabulka 9 – Růst testovaných kmenů bakterií v přítomnosti vybraných přípravků.

Název přípravku	**Ředění**	**Bakteriální kmeny**			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
Dettol toaletní mýdlo Fresh		+	-	-	+
	10^{-2}	+	-	-	+
Protex toaletní mýdlo Aloe		-	-	-	+
	10^{-2}	-	-	-	+
Dettol tekuté mýdlo Fresh		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-

Pozn. + nárůst bakteriálního kmene na pevném médiu
- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

7.4 Antimikrobiální účinek testovaných přípravků na alkoholové bázi

Testovaná kategorie zahrnuje antibakteriální gely a roztoky, jejichž antimikrobiální účinnost je deklarovaná výrobcem na obalu. Jak vyplývá z *Tabulky 10*, největší inhibiční zóny se objevily v okolí disku obsahujícím přípravek Bode sterillium. Průměr zón byl v rozmezí 15 – 21 mm napříč testovaným bakteriálním spektrem. Dobré inhibiční schopnosti v testu vykazovaly také další přípravky ve formě roztoku – Virusept spray a Softa Man roztok. Naopak gely dopadly v tomto testu o poznání hůře. Průkazně nejvyšší inhibiční aktivitu prokázal gel Septivon. Zbytek přípravků s gelovou konzistencí, oproti očekávání, inhibičně nepůsobil téměř vůbec. Stejně jako v případě antibakteriálních mýdel se provedl i u gelů pro srovnání doplňkový test *(Tabulka 11)*, který prokázal, že použité bakteriální kmeny v jejich přítomnosti nerostou, což svědčí o jejich antimikrobním účinku.

Tabulka 10 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných přípravků na alkoholové bázi na vybrané mikroorganizmy.

Číslo	**Název přípravku**	**Ø inhibiční zóny (v mm) u testovaných kmenů**			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
65	Prosavon desinfekční gel	-	7	-	-
66	Virusept gel na ruce	8	-	-	-
67	Virusept spray	10	13	11	13
68	Isana Med gel na ruce	8	-	-	-
69	Dettol gel na ruce	-	-	-	-
70	Adonis gel na ruce	-	-	-	-
71	Cussons carex gel na ruce	-	-	-	-
72	Cleanese gel na ruce	-	-	-	-
73	Bode sterillium roztok	15	21	13	15
74	Ballea gel na ruce	-	-	-	-
75	Septivon gel na ruce	15	12	8	8
76	Amukina gel na ruce	-	-	-	-
77	Sanytol gel na ruce	-	-	-	-
78	Aromatika gel na ruce	-	-	-	-
79	Lilien gel na ruce	-	-	-	-
80	Softa Man roztok	11	8	-	8

Pozn. * nevýrazná inhibiční zóna
- nepřítomnosti inhibiční zóny

Přípravky na alkoholové bázi byly navíc podrobeny testu napodobujícímu podmínky při dezinfekci rukou v praxi *(Tabulka 12)*. Na základě provedené zkoušky vykázaly všechny dezinfekční gely a roztoky různě intenzivní antimikrobní účinek. Z celkového počtu 16 přípravků, dokázalo 9 z nich zabránit nárůstu veškeré přirozené mikrobiální flóry rukou, tzn. že na otiscích konečků prstů nevyrostly žádné kolonie. Zbylých 7 přípravků inhibovalo nárůst mikrobů zčásti.

Tabulka 11 – Růst testovaných kmenů bakterií v přítomnosti gelových přípravků.

Název přípravku	**Ředění**	**Bakteriální kmeny**			
		S. aureus	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***
Prosavon desinfekční gel		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Virusept gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Isana Med gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Dettol gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Adonis gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Cussons carex gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Cleanese gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Ballea gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Amukina gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Sanytol gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Aromatika gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-
Lilien gel na ruce		-	-	-	-
	10^{-2}	-	-	-	-

Pozn. * nevýrazná inhibiční zóna
- nepřítomnosti inhibiční zóny

Tabulka 12 – Dezinfekce pokožky s přirozenou mikrobiální kontaminací.

Název přípravku	**Nárůst mikrobů před dezinfekcí**	**Nárůst mikrobů po dezinfekci**
Prosavon desinfekční gel	+++	-
Virusept gel na ruce	+++	++
Virusept spray	+++	-
Isana Med gel na ruce	+++	+
Dettol gel na ruce	+++	-
Adonis gel na ruce	+++	++
Cussons carex gel na ruce	+++	+
Cleanese gel na ruce	+++	-
Bode sterillium roztok	+++	-
Ballea gel na ruce	++	+
Septivon gel na ruce	+++	-
Amukina gel na ruce	+++	+
Sanytol gel na ruce	+++	-
Aromatika gel na ruce	+++	+
Lilien gel na ruce	+++	-
Softa Man roztok	+++	-

Pozn. - na otiscích nevyrostly žádné kolonie
+ ++ +++ intenzita nárůstu mikroorganizmů

8 DISKUZE

Mytí rukou vodou a mýdlem je považován za základní pilíř osobní hygieny již po staletí, ale souvislost mezi mytím rukou a omezením šíření nemocí byla objevena teprve v posledních 200 letech [49]. Dnes jsou na trhu k dostání mýdla i ve formě tekuté, jejichž oblíbenost v posledních letech roste na úkor mýdel toaletních. Kromě nich jsou k dispozici i další prostředky určené k očistě rukou i celého těla – sprchové gely, tělové šampony, mycí emulze a mycí oleje. Důraz na nezbytnost správné hygieny se stal podnětem pro vývoj nových typů přípravků, jako jsou mýdla s antibakteriálními přísadami, alkoholové gely, pěny či roztoky apod., jež byly původně určeny pro zdravotnické, potravinářské nebo farmaceutické provozy, ale dnes jsou již dostupné běžným spotřebitelům.

Cílem této práce bylo mimo jiné zjistit, zda mají mýdla antibakteriální účinek, a pokud ano, porovnat jej vůči působení deklarovaných přípravků. Testy citlivosti prováděné na vybraných bakteriálních kmenech difúzní diskovou metodou následně odhalily, že toaletní mýdla vykazují mnohem menší antimikrobní účinky než mýdla tekutá. Na základě celé řady studií, by ale měla i klasická toaletní mýdla mít určitý antimikrobní účinek.

Jako první se touto problematikou zabýval v roce 1881 Koch, který potvrdil antimikrobní účinnost klasických mýdel a zároveň vyslovil domněnku, že aktivní složkou způsobující inhibici mikrobiální růstu jsou mastné kyseliny [50, 51]. Na Kochovu studii navázaly další rané výzkumy ověřující možné antimikrobiální účinky mýdel. Jednou z nich byla Behringova studie z roku 1890, která připisovala antimikrobiální účinek přítomnosti volných hydroxylových skupin [50, 52]. Další nejasnosti do této problematiky vnesl v roce 1902 Konrádi, kdy ve studii parfemovaných mýdel tvrdil, že antimikrobní aktivita souvisí s přídavkem esenciálních olejů do mýdlového základu [50, 53]. Z důvodu dosavadních nejednoznačných výsledků provedl Reichenbach v roce 1908 samostatné testy antimikrobní aktivity hlavních součástí mýdel. Jednalo se o soli masných kyselin, volné alkálie a různá aditiva. Svou systematickou prací s čistými chemikáliemi zjistil, že antimikrobní účinky opravdu souvisejí s aktivitou mastných kyselin [50, 54].

Možnou příčinou nedostatečné inhibice růstu bakterií toaletními mýdly v našem experimentu může být příliš hutná konzistence testovaného vzorku, která zabránila adekvátní difúzi složek mýdel na pevné médium. Naproti tomu testovaná tekutá mýdla, i když se nejedná o sodné soli vyšších mastných kyselin, ale o směsi syntetických tenzidů, vykazovala podstatně vyšší aktivitu v redukci mikroorganizmů. Možných příčin existuje několik. Tekutá mýdla jako

svou hlavní složku, někdy až v 30% zastoupení obsahují syntetické anionické tenzidy, které právě ve vyšších koncentracích poškozují cytoplazmatickou membránu, a tím usmrcují buňky. Vyšší koncentrace některých z nich také denaturují bílkoviny [17]. Kvůli obsažené vodě a kožním nutrientům jsou z důvodu prevence mikrobiální kontaminace přidávány do tekutých mýdel v mnohem větší míře konzervanty (viz Příloha IV), které také mohou mít inhibiční účinky na růst mikroorganizmů. Kromě konzervantů obsahují tekutá mýdla rozmanitou škálu dalších složek, které rovněž mohou vykazovat antimikrobní potenciál. Vliv může mít především větší zastoupení esenciálních olejů. Antibakteriální účinek rostlinných extraktů byl nejvíce patrný u tekutého mýdla Radox Clean and Replenish. Toto mýdlo obsahovalo thymolové silice a *Melaleuceae aetheroleum*, které podle studií mají zřetelnou antimikrobiální aktivitu [55, 56]. Všechny tyto faktory se mohou v různé míře spolupodílet na výsledném antimikrobním účinku tekutých mýdel, jak bylo zaznamenáno v testu. Další příčinou může být také vhodná konzistence testovaných vzorků, která umožnila dostatečnou difúzi na povrch agarové plotny.

Sprchové gely mají obdobné složení jako tekutá mýdla a i během testu byla jejich antimikrobní účinnost téměř totožná.

Výsledky praktické části dále ukázaly, že běžná mýdla sice prokazují redukci růstu bakterií, ovšem je menší než v případě mýdel antibakteriálních. Toto zjištění koresponduje s výsledky většiny podobně založených studií, nicméně přímé srovnání s nimi není možné z důvodu rozdílné metodiky. Rotter ve své studii uvádí [57], že mytí rukou běžným mýdlem a vodou pouze mechanicky odstraňuje tranzientní flóru, zatímco mýdla s obsahem antimikrobních přísad kromě toho ještě bakterie usmrcují nebo inhibují [57]. Výsledky studie Fulsové a kol. [58] naznačují, že antibakteriální mýdla jsou více efektivní než běžná mýdla a také, že jejich efektivitu lze zlepšit delším mytím rukou a větším objemem nanášeného mýdla. Přenos bakterií na sledované předměty byl v průběhu experimentu významně snížen díky vyšší redukci bakterií těmito mýdly [58]. Jako další příklad lze uvést experiment Fishera a kol. [59], který demonstroval, že antibakteriální mýdla mají mnohem větší potenciál zabránit přenosu onemocnění než běžná mýdla [59].

Nejčastěji použité antibakteriální přísady v našem testu byly chlorhexidin, triklosan, chloroxylenol a benzalkonium chlorid. I přes přítomnost antimikrobika v každém ze vzorků, nevykazovaly při použití diskové metody některé přípravky inhibiční účinky. Jednalo se především o antibakteriální toaletní mýdla. Negativní reakce mohla být způsobena dvojnásobným ředěním přípravků nebo také špatnou difúzí účinných látek do kultivačního

média. Tyto možné příčiny byly eliminovány použitím doplňkové metody, jejíž výsledky prokázaly antimikrobní účinnost deklarovaných přípravků.

Poslední testovanou skupinu tvořily přípravky na alkoholové bázi. Dezinfekční gely a roztoky nejčastěji obsahovaly kombinaci etanolu, izopropanolu a propylalkoholu ve vysokých koncentracích, které měly zajistit baktericidní účinek. Přípravky ve formě gelu ovšem podle výsledků difúzního testu významně větší účinek než antibakteriální mýdla nevykazovaly, přestože byly na rozdíl od nich aplikovány v koncentrovaném stavu. Následně provedená doplňková metoda nakonec prokázala jejich antibakteriální účinek. Tento výsledný rozdíl mohl být způsoben viskozitou gelů, která zabránila distribuci aktivních látek do kultivační půdy. K správnosti této hypotézy se přiklání i fakt, že každý z testovaných alkoholových roztoků působil antimikrobiálně v celé testované škále bakterií, přičemž zóny inhibice byly u všech výrazné. Navíc byl u této skupiny proveden test otisků prstů, který u všech potvrdil různou míru antimikrobního účinku.

Při srovnání výsledné účinnosti jednotlivých forem alkoholových dezinfekčních prostředků se ukázalo, že roztoky byly mnohem účinnější než gely, ačkoliv složení měly identické (viz Příloha IV). Tento výsledek odpovídá závěru, jenž publikoval Pietsch v roce 2001 [60], kdy studoval účinnost dezinfekce rukou podle EN 1500 [61]. V experimentu žádný gel této normě nevyhovoval, na rozdíl od roztoků [60].

Paulsonová a kol. [62] srovnávali antimikrobní účinek běžného mýdla, antimikrobiálního mýdla, dezinfekčního gelu, kombinace běžného mýdla s dezinfekčním gelem a spojení antibakteriální mýdla s dezinfekčním gelem. Běžná mýdla byla v této skupině nejméně účinná, za nimi následovala antibakteriální mýdla. Nejvíce efektivní byl dezinfekční gel. Nejúčinnější formou se ovšem stala kombinace dezinfekčního gelu s běžným nebo antibakteriálním mýdlem. Obě z těchto konfigurací prokázaly bezprostřední a výrazné snížení tranzientní mikroflóry v důsledku propojení mechanického odstranění mikrobů mýdlem a baktericidních vlastností alkoholů. Navíc tento účinek dlouho přetrvával [62].

Z porovnání obou skupin testovaných bakterií vyplývá, že gram-pozitivní bakterie reagovaly na přítomnost antimikrobiálních látek mnohem citlivěji než gram-negativní. Nejspíše bude tato větší odolnost způsobena rozdílným složením buněčné stěny obou skupin bakterií, zejména přítomností vnější membrány gram-negativních bakterií, která pro řadu antimikrobiálních látek představuje nepropustnou bariéru [63]. Největší citlivost k testovaným přípravkům byla zaznamenána u gram-pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*.

Nejvíce rezistentní naopak byla gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Za hlavní příčiny její výrazné rezistence k antibiotikům a dezinfekčním látkám je podle Lamberta [64] zodpovědná kombinace hned několika faktorů. Jsou to nízká permeabilita buněčné stěny, genetická výbava umožňující vznik celé řady rezistentních mechanizmů, možnost mutace chromozomálních regulačních genů zodpovědných za rezistenci, schopnost převzetí rezistentních genů od jiných mikroorganizmů pomocí plazmidů, transpozonů nebo bakteriofágů a tvorba mikrokolonií a biofilmů [64]. Díky své odolnosti a podmíněné patogenitě představuje tato bakterie jeden z nejpalčivějších problémů v nemocnicích, ale i kosmetických závodech [65].

Ve spojitosti s nárůstem spotřeby přípravků s antimikrobními složkami dochází k četným debatám o jejich podílu na vzniku rezistence k antibiotikům. Russel [66] na toto téma ve své práci uvádí, že zatímco prostředky s dezinfekčními složkami mohou vést v laboratorních podmínkách k této rezistenci, nemusí tomu tak nutně být v přirozeném nebo klinickém prostředí [66].

ZÁVĚR

Tato práce se zabývala testováním antimikrobní účinnosti běžných mýdel, mýdel s antibakteriální přísadou a přípravků k dezinfekci rukou na alkoholové bázi. Na základě získaných výsledků se došlo následujícím poznatkům:

- nejcitlivější bakterií vůči inhibičním účinkům přípravků byl *Micrococcus luteus* CCM 732,
- nejodolnější byla bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955,
- běžná tekutá mýdla vykazovala zřetelný antimikrobní účinek, naopak toaletní mýdla byla až na jeden případ neúčinná,
- sprchové gely redukovaly testované mikroorganizmy téměř srovnatelně jako tekutá mýdla,
- mýdla s antimikrobiální přísadou působily na růst vybraných kmenů výrazně větším inhibičním účinkem než běžná mýdla,
- přípravky na alkoholové bázi neprokázaly při testování pomocí difúzní diskové metody významně vyšší antimikrobní účinky než mýdla s antibakteriální přísadou, použití dalších metod, včetně metody otisků prstů, bez výjimky potvrdilo jejich deklarovaný antimikrobní účinek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 80-246-1270-4.

[2] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.

[3] DOHNAL, K., GÖPFERTOVÁ, D., JANOVSKÁ, D. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena.* 3. vyd. Praha: Triton, 2002. 148 s. ISBN 80-7254-223-0-3.

[4] KATZ, J. D. Hand washing and hand disinfection: more than your mother taught you. *Anesthesiology Clinics of North America*, 2004, vol. 22, no. 3, p. 457–471.

[5] BOYCE, J. M., PITTET, D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2002, vol. 51, no. RR-16, p. 1–44.

[6] MAĎAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ, J. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 178 s. ISBN 80-247-1673-9.

[7] LANGMAIER, F. *Základy kosmetických výrob*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001. 160 s. ISBN 80-7318-016-2.

[8] FEŘTEKOVÁ, V., et al. *Kosmetika v teorii a praxi*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 2000. 336 s. ISBN 80-85912-19-8.

[9] *Účinnost konzervace kosmetiky* [online]. [cit. 2010-9-30] Dostupný z WWW: http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky

[10] COUNCIL OF EUROPE. *Consolidated version of Cosmetics Directive 76/768/EEC* [online]. [cit. 2011-23-01]. Dostupný z WWW: http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:en:PDF

[11] *Kosmetické přípravky po otevření* [online]. [2010-10-7] Dostupný z WWW: http://www.mzcr.cz/Soubor.ashx?souborID=7755&typ=application/msword&nazev=kosmeticke_pripravky_po_otevreni.doc

[12] ORTH, D. J., et al. *Cosmetic and drug microbiology*. New York: Informa Healthcare, 2006. 375 s. ISBN 0-8493-7266-6.

[13] KULSHRESHTHA, A. K., SINGH, O. N., WALL, M. *Pharmaceutical suspensions: From Formulation Development to Manufacturing*. 1st ed. New York: Springer, 2010. 323 p. ISBN 978-1-4419-1086-8.

[14] *Period after opening – labelling* [online]. [cit. 2011-04-8] Dostupný z WWW: http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/media/zip/labelling.zip

[15] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS. *The SCCP´S notes of Guiance for the testing of cosmetics ingredients and thein safety evaluation 6TH revision* [online]. 2006. [cit. 2010-4-29]. Dostupný z WWW: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_03j.pdf

[16] EUROPEAN COMMISSION. *Practical implementation of Article 6 (1) (c) of the Cosmetics Directive (76/768/EEC): Labelling of product durability: Period of time after opening.* [online]. [cit. 2010-5-12]. Dostupný z WWW: http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/wd-04-entr-cos_28_rev_version_adoptee20040419_en.pdf

[17] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9.

[18] REIGER, M. M. *Harry's Cosmeticology: Volumes I-II*. 8th ed. New York: Chemical Publishing Company Inc., 2000. 1161 p. ISBN 978-0-8206-0002-4.

[19] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

[20] BUCHTA, V., et al. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 192 s. ISBN 80-7184-565-5.

[21] STEINBERG, D. C. *Preservatives for Cosmetics*. 2nd ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2006. 137 p. ISBN 978-1-932633-12-2.

[22] PAULUS, W. *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook*. 1st ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 804 p. ISBN 978-1-4020-2818-2.

[23] Vyhláška č. 448/2009 Sb. o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky.

[24] GEIS, P. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. 312 p. ISBN 978-0-849314-53-7.

[25] ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 928 p. ISBN 978-1-582120-58-4.

[26] HUGO, W. B., RUSSEL, A. D. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1998. 510 p. ISBN 978-0632041961.

[27] SALVADOR, A., CHISVERT, A. *Analysis of cosmetic products*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 487 s. ISBN 978-0-444-52260-3.

[28] SCHLAGER, N., WEISBLATT, J., NEWTON, D. E. *Chemical compounds*. 1st ed. Detroit: Thomson Gale, 2006. 888 p. ISBN 978-1414401508.

[29] BAUMANN, L. *Cosmetic Dermatology: Principles and Practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2009. 336 p. ISBN 978-0-07-164128-9.

[30] SONI, M. G., CARABIN, I. G., BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.*, 2005, vol. 43, no. 7, p. 985–1015.

[31] LÜCK, E., JAGER, M. *Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects*. 2nd ed. New York: Springer, 1997. 260 p. ISBN 978-3540611387.

[32] TADROS, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*. 1st ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. 654 p. ISBN 978-3-527-30629-9.

[33] KRS, V. *Materiály I.* 1 vyd. Praha: Informatorium, 2001. 135 p. ISBN 80-86073-73-4.

[34] BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 886 s. ISBN 0-8247-0292-1.

[35] ZAHRADNÍK, M. *Materiály II*. 1. vydání. Praha: Informatorium, 2001. 103 s. ISBN 80-86073-83-1.

[36] FULS, J. L., et al. Alternative hand contamination technique to compare the activities of antimicrobial and nonantimicrobial soaps under different test conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 12, p. 3739–3744.

[37] DRAELOS, Z. D. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. 548 p. ISBN 978-1405186353.

[38] ZÁHEJSKÝ, J. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2006. 133 s. ISBN 80-247-1551-1.

[39] KREJČÍ, J. *Materiály k předmětu Kosmetické přísady a prostředky: Funkční kosmetika*. 2010. 2 s.

[40] LAI, K. Y. *Liquid Detergents*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. 712 p. ISBN 978-0-8247-5835-6.

[41] BOARD, N. *Modern Technology Of Cosmetics*. 1st ed. Delhi: Asia Pacific Business Press Inc., 2004. 659 p. ISBN 978-8178330815.

[42] SPITZ, L. *SODEOPEC: soaps, detergents, oleochemicals, and personal care products*. 1st ed. Champaign: AOCS Press, 2004. 472 p. ISBN 1-893997-76-6.

[43] LANGLEY, J. From soap and water, to waterless agents: Update on hand hygiene in health care settings. *Can J Infect Dis.*, 2002, vol. 13, no. 5, p. 285–286.

[44] SIMONNE, A. *Hand Hygiene and Hand Sanitizers* [online]. [cit. 2010-5-15]. Dostupný z WWW: http://www.mmc.org/workfiles/mh_professional/IPCC/ ArticleHandHygieneSanitizers.pdf

[45] GIRARD, R. A Review of Hand Rub Products. *European Infectious Disease*, 2010, vol. 4, no. 2, p. 61–64.

[46] ZIMMERMAN, M., TERNSTRÖM, B. Hand Hygiene: Compliance with Guidelines Is Poor. *US Surgery*, 2007, vol. 1, p. 53–54.

[47] *Wash Your Hands* [online]. [cit. 2010-5-14]. Dostupný z WWW: http://www.cdc.gov/Features/HandWashing/

[48] HELLER, M. E., VEACH, L. M. *Clinical Medical Assisting: A Professional, Field Smart Approach to the Workplace*. 1st ed. New York: Delmar Cengage Learning, 2008. 1008 p. ISBN 978-1401827182.

[49] JARVIS, W. R. (ed.). *Bennett and Brachman's Hospital Infections*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 816 p. ISBN 978-0781763837.

[50] THORMAR, H. (ed.). *Lipids and Essentials oils as antimicrobial agents*. 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. 334 p. ISBN 978-0-470-97662-3.

[51] KOCH, R. Ueber Desinfection. *Mittheil. des kaiserl. Gesundheitsamtes.*, 1881, vol. 1, p. 234–282.

[52] BEHRING, E. A. Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1890, vol. 9, p. 395–478.

[53] KONRÁDI, D. Ueber die baktericide Wirkung der Seifen. *Arch. f. Hyg.*, 1902, vol. 44, p. 101–112.

[54] REICHENBACH, H. Die desinfizierenden Bestandteile der Seifen. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1908, vol. 59, p. 296–316.

[55] WANG, P., KONG, C. H., ZHANG, C. X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from Ambrosia trifida. *Molecules*, 2006, vol. 11, no. 7, p. 549–555.

[56] HARKENTHAL, N., et al. Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*, 1999, vol. 54, no. 6, p. 460–463.

[57] ROTTER, M. L. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 96, Hand washing and hand disinfection, p. 1339–1355. ISBN 978-0781742580.

[58] FULS, J. L., et al. Alternative hand contamination technique to compare the activities of antimicrobial and non-antimicrobial soaps under different test conditions. *Appl.Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 12, p. 3739–3744.

[59] FISCHLER, G. E., et al. Effect of hand wash agents on controlling the transmission of pathogenic bacteria from hands to food.. *J. Food Prot.*, 2007, vol. 70, no. 12, p. 2873–2877.

[60] PIETSCH, H. Hand Antiseptics: Rubs Versus Scrubs, Alcoholic Solutions Versus Alcoholic Gels. *J. Hosp. Infect.*, 2001, vol. 48, p. S33–S36.

[61] ČSN EN 1500. Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Hygienická dezinfekce rukou - Zkušební metoda a požadavky. Praha, 1999. 24 s.

[62] PAULSON, D. S., et al. A close look at alcohol gel as an antimicrobial sanitizing agent. *Am J Infect Control.*, 1999, vol. 27, no. 4, p. 332–338.

[63] ALAKOMI, H. L. *Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane*. 1st ed. Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland, 2007. 95 p. ISBN 978-951-38-7014-0.

[64] LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *J. R. Soc. Med.*, 2002, vol. 95, no. 41, p. 22–26.

[65] ORTH, D. *Insights into Cosmetic Microbiology*. 1st ed. Allure: Carol Stream, 2009. 350 p. ISBN 978-1932633627.

[66] RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, vol. 3, no. 12, p. 794–803

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AHA Alfa-hydroxykyseliny.

AIDS Syndrom získaného selhání imunity.

DEA Dietanolamin.

DNA Deoxyribonukleová kyselina.

EDTA Ethylendiamintetraoctová kyselina.

HIV Virus lidské imunitní nedostatečnosti.

MEA Monoetanolamin.

MHA Mueller-Hinton agar.

MPB Masopeptonový bujón.

PAL Povrchově aktivní látka.

PCA Plate count agar.

pH Záporná hodnota dekadického logaritmu koncentrace oxoniových iontů.

TEA Trietanolamin.

USA Spojené státy americké.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Symbol otevřené nádobky [14] 16
Obrázek 2 – Benzoová kyselina [24] 21
Obrázek 4 – Benzylalkohol [24] 22
Obrázek 3 – Benzalkonium chlorid [24] 22
Obrázek 5 – Etanol [28] 23
Obrázek 6 – Bronopol [24] 23
Obrázek 8 – Izopropanol [28] 24
Obrázek 7 – Imidazolidynylová močovina [26] 24
Obrázek 10 – Paraben [24] 26
Obrázek 11 – Salicylová kyselina [24] 26
Obrázek 12 – Triklosan [28] 27
Obrázek 13 – Schematické znázornění molekuly tenzidu [8] 29
Obrázek 14 – Rozdělení tenzidů na základě struktury [8] 29

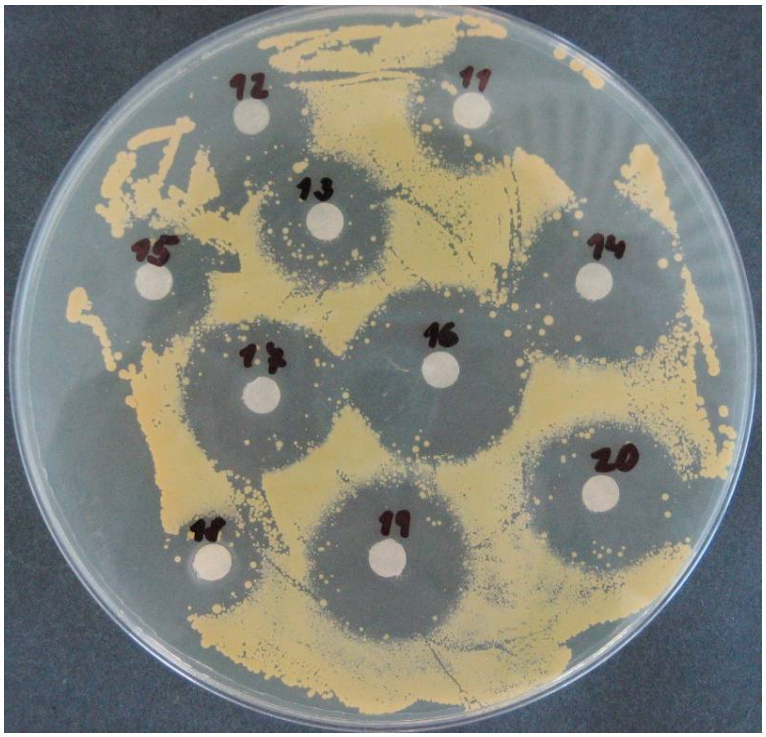
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Vybrané mikroorganizmy osidlující kůži [1]. 14
Tabulka 2 – Vodní aktivity kosmetických přípravků ve vztahu k mikrobiální kontaminaci [12]. 18
Tabulka 3 – Rámcové složení toaletního mýdla [39, 40, 41]. 30
Tabulka 4 – Rámcové složení tekutého mýdla [39, 40]. 32
Tabulka 5 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků sprchových gelů na vybrané mikroorganizmy. 42
Tabulka 6 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků tekutých mýdel na vybrané mikroorganizmy..... 43
Tabulka 7 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků toaletních mýdel na vybrané mikroorganizmy. 43
Tabulka 8 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných vzorků mýdel s antibakteriální přísadou na vybrané mikroorganizmy. 44
Tabulka 9 – Růst testovaných kmenů bakterií v přítomnosti vybraných přípravků. 45
Tabulka 10 – Velikost inhibičních zón (v mm) vzniklých vlivem inhibičního účinku testovaných přípravků na alkoholové bázi na vybrané mikroorganizmy. 46
Tabulka 11 – Růst testovaných kmenů bakterií v přítomnosti gelových přípravků. 47
Tabulka 12 – Dezinfekce pokožky s přirozenou mikrobiální kontaminací...... 48

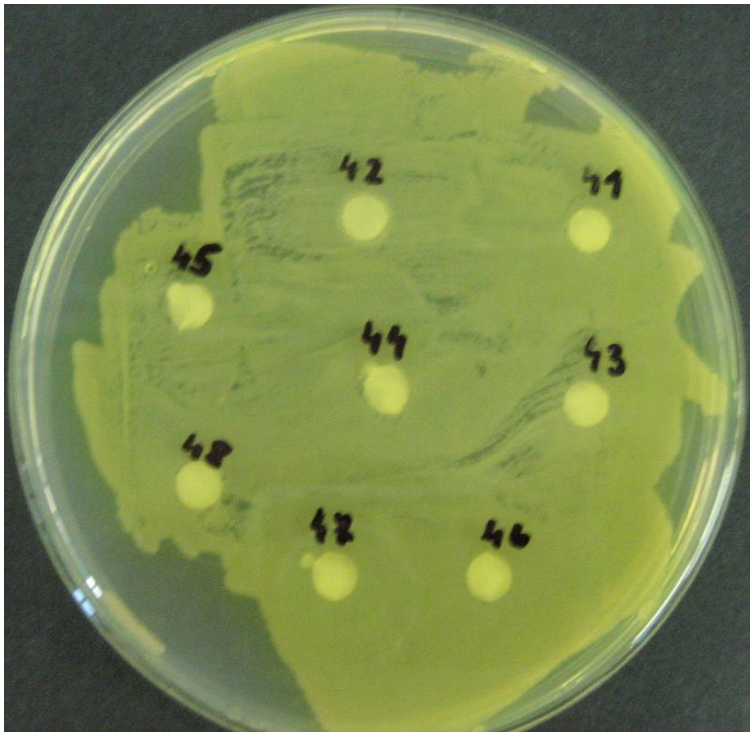
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DIFÚZNÍ DISKOVÉ METODY
PŘÍLOHA PII: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DOPLŇKOVÉ METODY
PŘÍLOHA PIII: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ OTISKOVÉ METODY
PŘÍLOHA PIV: ANTIMIKROBNÍ PŘÍSADY VYBRANÝCH PROSTŘEDKŮ

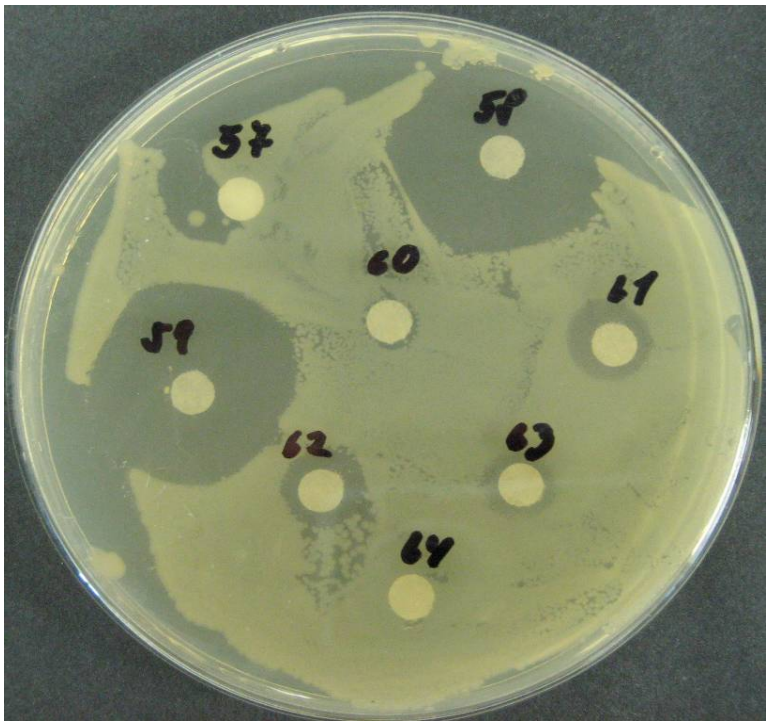
PŘÍLOHA PI: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DIFÚZNÍ DISKOVÉ METODY



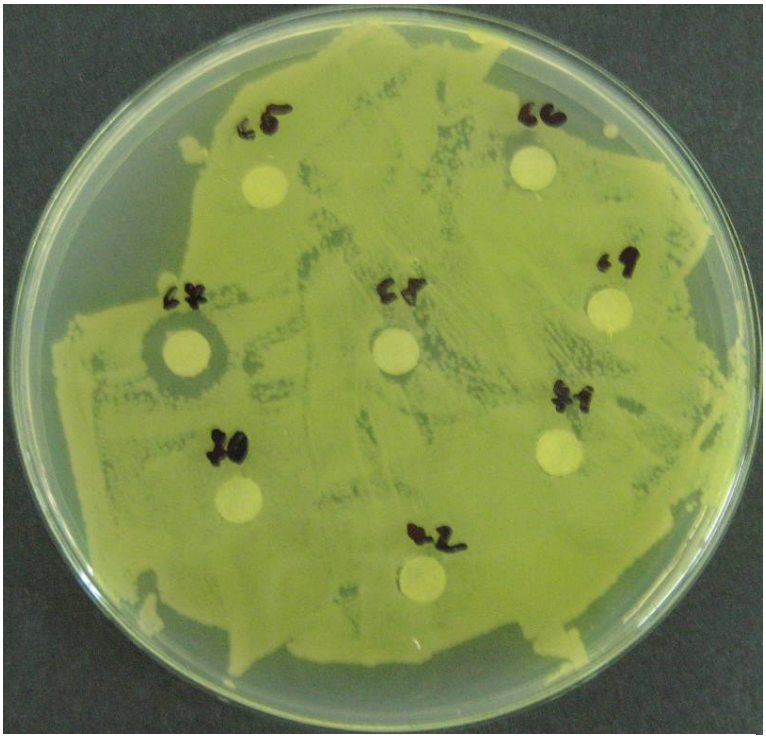
PI A – Vliv sprchových gelů na Micrococcus luteus.



PI B – Vliv mýdel na Staphylococcus aureus.



PI C – Vliv antibakteriálních mýdel na Escherichia coli.

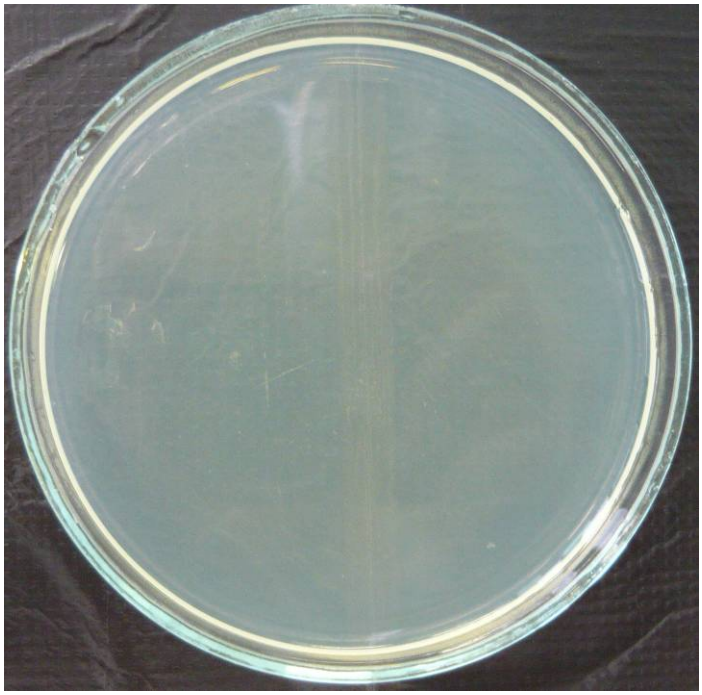


PI D – Vliv dezinfekčních prostředků na Staphylococcus aureus.

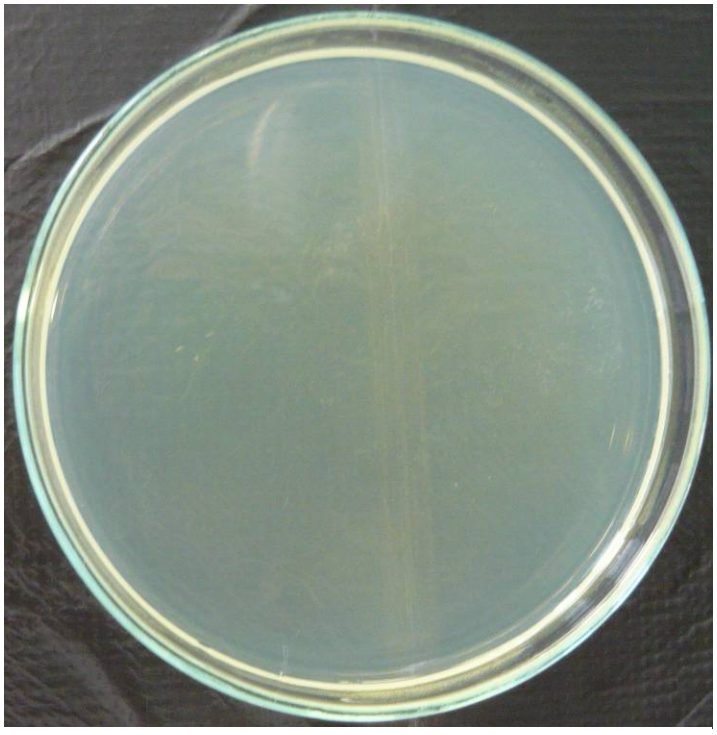
PŘÍLOHA PII: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DOPLŇKOVÉ METODY

PII A – Růst Staphyloccocus aureus v přítomnosti toaletního mýdla Dettol.

PII B – Růst Staphyloccocus aureus v přítomnosti toaletního mýdla Dettol při desetinásobném ředění.

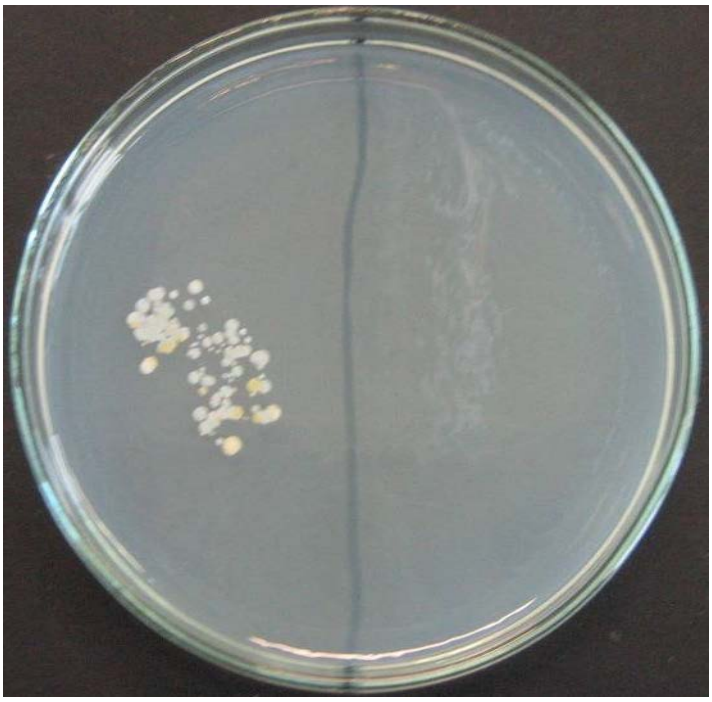


PII C - Absence růstu Pseudomonas aeruginosa v přítomnosti přípravku Dettol gel na ruce.

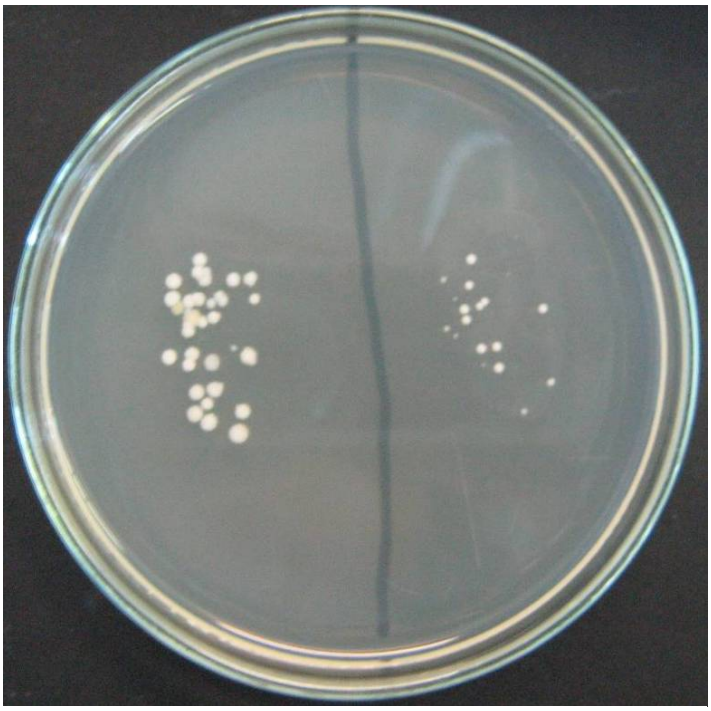


PII D - Absence růstu Pseudomonas aeruginosa v přítomnosti přípravku Dettol gel na ruce při desetinásobném ředění.

PŘÍLOHA PIII: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ OTISKOVÉ METODY



PIII A – Výsledná kultivace před (vlevo) a po aplikaci dezinfekčního gelu Prosavon.



PIII B – Výsledná kultivace před (vlevo) a po aplikaci dezinfekčního gelu Ballea.

PŘÍLOHA PIV: ANTIMIKROBNÍ PŘÍSADY VYBRANÝCH PROSTŘEDKŮ

Číslo	Název prostředku	Antimikrobiální a konzervační přísady ve smyslu směrnice 2006/257/EEC podle INCI
2	Oriflame Lime and Ginger sprchový gel	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol
4	Nivea Vitality fresh sprchový gel	Sodium Benzoate, Sodium Salicylate
21	IR Barbadensis sprchový gel	Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Ethylparaben, Methylisothiazolinone, Methylchloroisothiazolinone, 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol
32	Bohemia jogurt třešeň mýdlo	Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Methylisothiazolinone, Methylchloroisothiazolinone
38	Radox Clean and Protect mýdlo	Melaleuca Alternifolia Leaf Oil, Sodium Benzoate
42	Camay Silky Belly Bliss mýdlo	
52	Dettol Fresh mýdlo	Chloroxylenol, Tetrabutyl Ammonium Bromide
58	Protex mýdlo	DMDM Hydantoin, Triclosan
61	Prosavon dezinfekční mýdlo	Polyaminopropyl Biguanide, Benzalkonium Chloride, Chlorhexidine
62	Prosavon tekuté mýdlo	Chlorhexidine, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, o-Phenylphenol,
64	Dettol Fresh mýdlo	Salicylic Acid, Chloroxylenol, Tetrasodium EDTA, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone
63	Bohemia mýdlo	Chlorhexidine, Benzyl Alcohol, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone
66	Virusept gel	Alcohol Denat., Isopropyl Alcohol
67	Virusept spray	Alcohol Denat., Isopropyl Alcohol
75	Septivon gel	Alcohol Denat., Isopropyl Alcohol
80	Softa Man roztok	Alcohol, Propyl Alcohol