

# Konzervanty v kosmetice a jejich aktivita

Bc. Ivana Kolářová

---

Diplomová práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Kolářová**  
Osobní číslo: **T20007**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Konzervanty v kosmetice a jejich aktivita**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část:

1. V teoretické části popište roli konzervantů v kosmetice a uveďte jejich základní typy a mechanismy účinku.
2. Popište důvody pro jejich použití a způsoby a zdroje kontaminace kosmetických přípravků.

#### II. Praktická část:

1. V praktické části analyzujte soubor alespoň pěti typologicky odlišných konzervantů povolených v kosmetice.
2. Stanovte jejich účinnost proti různým typům patogenů.
3. Hodnoťte případně i další parametry, zejména jejich legislativní omezení.
4. Výsledky vzájemně diskutujte a přehledně zpracujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Bernal-Ballen A., Lopez-Garcia J., Merchan-Merchan M. A. and Lehocý M.: Synthesis and Characterization of a Bioartificial Polymeric System with Potential Antibacterial Activity: Chitosan-Polyvinyl Alcohol-Ampicillin, *Molecules*, 23 (2018) 3109 (17pp).
- [2] Rašková Kolářová Z., Stahel P., Sedlaříková J., Musilová L., Stupavská M. and Lehocý M.: The Effect of Plasma Pretreatment and Cross-Linking Degree on the Physical and Antimicrobial Properties of Nisin-Coated PVA Films, *Materials*, 11 (2018) 1451 (14pp).
- [3] Popelka A., Novák I., Lehocý M., Bílek F., Kleinová A., Mozetič M., Špírková M. and Chodák I.: Antibacterial Treatment of LDPE with Halogen Derivatives via Cold Plasma, *Express Polymer Letters*, 9 (2015) 402-411.
- [4] Karbassi E., Asadinezhad A., Lehocý M., Humpolíček P. and Sába P.: Bacteriostatic Activity of Fluoroquinolone Coatings on Polyethylene Films, *Polymer Bulletin*, 72 (2015) 2049-2058.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Hana Pištěková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocý, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta



## ABSTRAKT

Konzervanty hrají klíčovou roli v zachování kosmetických přípravků v nezávadném a senzoricky přijatelném stavu pro spotřebitele po celou dobu trvanlivosti. Jednotlivé kategorie konzervačních přísad nabízí účinnost na různé spektrum mikroorganismů a jejich použití se liší podle typu produktu, obalu produktu, obsahu vody a ostatních složek, pH produktu, podmínek zpracování a používání a podle dalších důležitých faktorů. Obvyklé je použití směsi různých konzervantů, někdy mohou konzervovat i složky kosmetického přípravku nebo při snížení možnosti mikrobiální kontaminace, např. obalem, je dokonce možné koncentraci nebo počet konzervantů snížit. Konzervační přísady jsou častými alergeny a příčinou různých zdravotních komplikací, proto jsou legislativou omezeny na nejnižší možné účinné koncentrace. V případě nových formulací produktů je potřeba testovat účinnost konzervantů při nových podmínkách. Ke zhodnocení účinnosti konzervantů byla v této práci použita disková difúzní metoda, modifikovaná difúzní metoda s jamkami v agaru a diluční metoda stanovení minimální inhibiční koncentrace. Výše uvedenými metodami byly hodnoceny konzervační účinky benzalkonium chloridu, bronopolu, phenoxyethanolu, kyseliny citronové a tymiánové silice proti mikroorganismům *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis* a *Candida albicans*.

Klíčová slova: konzervant, konzervace, difúzní metoda, diluční metoda stanovení MIC, benzalkonium chlorid, bronopol, phenoxyethanol, kyselina citronová, tymiánová silice, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*.

## ABSTRACT

Preservatives play a key role in keeping cosmetic products in a safe and sensory acceptable condition for the consumer throughout their shelf life. Individual categories of preservatives offer efficacy on a different spectrum of microorganisms and their use varies according to the type of the product, product packaging, water content and other ingredients, pH of the product, processing and use conditions and other important factors. It is customary to use a mixture of different preservatives, sometimes the components of the cosmetic product can also preserve, or if the possibility of microbial contamination is being lower, e. g. packaging, it is even possible to reduce the concentration or an number of preservatives. Preservatives are frequent allergens and the cause of various health complications therefore they are limited by legislation to the lowest possible effective concentrations. In the case of new product formulations, it is necessary to test the effectiveness of preservatives under new conditions. To evaluate the effectiveness of preservatives, the disc diffusion method, the modified diffusion method with holes in the agar and the dilution method for determining the minimum inhibitory concentration were used in this work. The above methods evaluated the preservative effects of benzalkonium chloride, bronopol, phenoxyethanol, citric acid and thyme essential oils against the microorganisms *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis* and *Candida albicans*.

Keywords: preservative, preservation, diffusion method, dilution method for the determination of MIC, benzalkonium chloride, bronopol, phenoxyethanol, citric acid, thyme essential oil, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*.

Děkuji paní Ing. Haně Pištěkové Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, rady a inspirace, které mi pomohly ke zdárnému vytvoření mé diplomové práce. Zároveň chci poděkovat i celému kolektivu laboratoře za spolupráci na praktické části.

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



# OBSAH

ÚVOD.....	12
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
<b>1 KONZERVANTY .....</b>	<b>15</b>
1.1 KONZERVANTY – LEGISLATIVA .....	15
1.2 KONZERVANTY – OBECNÁ CHARAKTERISTIKA .....	15
1.3 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE.....	16
1.4 KRITÉRIA VÝBĚRU KONZERVANTŮ .....	16
1.4.1 Stabilita konzervantů.....	16
1.4.2 Kompatibilita.....	17
1.4.3 Bezpečnost .....	17
1.4.4 Soulad s kosmetickou legislativou .....	17
<b>2 SYNTETICKÉ KONZERVANTY .....</b>	<b>18</b>
2.1 ORGANICKÉ KYSELINY .....	18
2.1.1 Kyselina benzoová (kyselina benzenkarboxylová).....	19
2.1.2 Kyselina salicylová (kyselina 2-hydroxybenzenkarboxylová) .....	19
2.1.3 Kyselina dehydrooctová (3-acetyl-6-methylpyran-2,4(3H)-dion) .....	20
2.1.4 Kyselina propionová (kyselina propanová) .....	21
2.1.5 Kyselina sorbová (kyselina hexa 2,4 dienová).....	21
2.1.6 Kyselina mravenčí (kyselina methanová) .....	22
2.1.7 Kyselina citronová (kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová či kyselina 3-karboxy-3-hydroxypentandiová) .....	22
2.2 ALKOHOLY A FENOLY .....	23
2.2.1 Benzyl alkohol (fenylmetanol).....	23
2.2.2 4-Isopropyl-m-kresol (o-Cymen-5-ol) .....	24
2.2.3 Parabeny .....	24
2.2.4 Phenoxyethanol (2-Phenoxyethan-1-ol).....	26
2.2.5 Bifenylyl-2-ol (o-Phenylphenol) .....	27
2.3 ALDEHYDY.....	27
2.3.1 Formaldehyd (methanal) a paraformaldehyd .....	27
2.4 FORMALDEHYDOVÉ UVOLŇOVAČE.....	28
2.4.1 Imidazolidinyl urea (1,1'-metylenbis{3-[ 4- (hydroxymethyl)-2,5- dioxoimidazolidin-4-yl] močovina} .....	29
2.4.2 Diazolidinyl urea (1-[3,4-bis(hydroxymethyl)-2,5-dioxoimidazolidin- 4-yl]-1,3-bis(hydroxymethyl)urea) .....	29
2.4.3 DMDM hydantoin(1,3-Bis(hydroxymethyl)-5,5- dimethylimidazolidin-2,4-dion) .....	30
2.4.4 Methenamine (hexamethylentetramin) (1,3,5,7-tetrazatricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] dekan).....	30
2.4.5 Quaternium-15 (methenamin-3-chlorallylchlorid).....	31
2.4.6 Bronopol (2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol) .....	31
2.5 DERIVÁTY ISOTHIAZOLINU .....	32

2.5.1	Methylisothiazolinone a methylchloroisothiazolinone (2-methyl-1,2-thiazol-3(2 <i>H</i> )-on), (5-chlor-2-methyl-1,2-thiazol-3(2 <i>H</i> )-on).....	32
2.6	HALOGENOVANÉ SLOUČENINY .....	32
2.6.1	5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.....	33
2.6.2	Chloracetamide (2-chloroacetamide) .....	33
2.6.3	Chlorbutanol (1,1,1-trichlor-2-methylpropan-2-ol) .....	34
2.6.4	Chlorphenesin (3-(4-chlorfenoxy)-propan-1,2 diol .....	34
2.7	KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SLOUČENINY (QUATERNIA) .....	34
2.7.1	Benzalkonium chlorid (N-alkyl-N-benzyl-N,N-dimethylamoniumchlorid).....	35
2.8	BIGUANIDY .....	35
2.8.1	Chlorhexidin (N,N-bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimin-2,4,11,13-tetraazatetradekanediamidine).....	36
2.8.2	Polyaminopropyl biguanid .....	36
<b>3</b>	<b>PŘÍRODNÍ KONZERVANTY .....</b>	<b>37</b>
3.1	ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	37
3.2	DALŠÍ KONZERVANTY PŘÍRODNÍHO PŮVODU .....	38
3.2.1	Kyselina kaprylhydroxymová (N-hydroxy octanamid) .....	38
3.2.2	Pentylene glycol (natural) (1,2 Pentadiol) .....	38
3.2.3	Monoacylglyceroly .....	39
<b>4</b>	<b>MOŽNOSTI SNÍŽENÍ MNOŽSTVÍ KONZERVANTŮ V KOSMETICKÝCH PRODUKTECH .....</b>	<b>40</b>
4.1	VODNÍ AKTIVITA .....	40
4.2	VYUŽITÍ SYNERGIE KONZERVAČNÍCH LÁTEK A DALŠÍCH SLOUČENIN .....	40
<b>5</b>	<b>METODY HODNOCENÍ ÚČINKU KONZERVAČNÍCH PŘÍRAD .....</b>	<b>41</b>
5.1	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA A MODIFIKOVANÁ DIFÚZNÍ METODA.....	42
5.2	DILUČNÍ METODA .....	42
5.3	ZHODNOCENÍ METOD.....	43
<b>6</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>44</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>46</b>
7.1	VZORKY KONZERVANTŮ .....	46
7.2	MIKROORGANISMY .....	47
7.3	PŮDY A CHEMIKÁLIE .....	47
7.4	POUŽITÉ METODY .....	48
7.5	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	48
7.6	POMŮCKY.....	48
7.7	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA .....	49

7.7.1	Princip metody .....	49
7.7.2	Pracovní postup .....	49
7.8	MODIFIKOVANÁ DIFÚZNÍ METODA .....	51
7.8.1	Princip metody .....	51
7.8.2	Pracovní postup .....	51
7.9	DILUČNÍ METODA .....	53
7.9.1	Princip metody .....	53
7.9.2	Pracovní postup .....	53
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>56</b>
8.1	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA .....	56
8.1.1	Výpočet inhibičních zón .....	56
8.1.2	Vyhodnocení inhibičních zón .....	56
8.2	MODIFIKOVANÁ DIFÚZNÍ METODA .....	64
8.2.1	Výpočet a vyhodnocení měření inhibičních zón .....	64
8.3	DILUČNÍ METODA STANOVENÍ MIC .....	71
8.3.1	Vyhodnocení mikrobiálního růstu na agarových plotnách a stanovení MIC .....	71
8.4	POROVNÁNÍ A ZHODNOCENÍ VŠECH METOD .....	76
8.4.1	Difúzní metody .....	76
8.4.2	Diluční metoda .....	78
8.4.3	Porovnání výsledků difúzních metod a diluční metody .....	78
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>88</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>89</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>93</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>94</b>

## ÚVOD

Kosmetický průmysl lze zařadit vedle farmaceutického průmyslu mezi rychle se vyvíjející a velmi zisková odvětví průmyslu vůbec. Kosmetika se stala součástí našeho života a každý z nás se denně setkává s řadou kosmetických produktů. Považujeme to za standard, bez kterého si většina z nás neumí představit normální život. Z definice jsou kosmetické produkty určeny k očištění, péstění a udržování dobrého stavu povrchu těla a některých sliznic, dále jsou to přípravky určené k parfemaci nebo potlačení tělesného pachu a také sem lze zahrnout produkty určené ke zkrášlení a změně vzhledu. Některé produkty působí na povrch lidského těla krátkodobě, například při mytí a jiné zůstávají na povrchu těla delší dobu, např. péstící nebo dekorativní kosmetika. Všechny tyto produkty se skládají buď z několika nebo z většího množství chemických nebo přírodních ingrediencí, z nichž každá má v přípravku svůj smysl a účel a zajišťuje správnou funkci výrobku. Pro všechny kosmetické přípravky platí jednotná legislativa, která má zajistit nejen složení z povolených ingrediencí a účinnost přípravku pro dané účely, ale také nezávadnost a použitelnost přípravku po určitou dobu.

Faktory, které mohou ovlivnit trvanlivost a nezávadnost kosmetických přípravků, jsou mikrobiální kontaminace a degradační pochody v důsledku oxidace nebo jiných chemických pochodů.

Konzervace je obecně možná různými způsoby. Konzervační metody zabraňují mikroorganismům v rozmnožování nebo v jejich aktivitě, případně je usmrcují nebo inaktivují. Ve výsledku jde o prodloužení doby, po kterou je zaručena zdravotní nezávadnost a použitelnost výrobku. Inhibici růstu mikroorganismů v kosmetice lze ovlivnit nízkou teplotou skladování, nízkou aktivitou vody, snížením přístupu k živinám a nižším obsahem kyslíku. Pro dezinfekci obalů je možné použít i vysokou teplotu nebo ozáření. Účinek nižších teplot a nižší obsah kyslíku je možné využít hlavně při stanovení podmínek pro skladování a uchovávání produktu. Pokud však chceme zabezpečit nezávadnost a dobu použitelnosti, je nutné použít konzervační přísadu. [1]

I když je tlak od spotřebitele na co nejmenší množství konzervantů v kosmetice a na jejich šetrnost a nezávadnost z hlediska možné dráždivosti, případně alergií, je v podstatě nemožné vyrobit kosmetický přípravek bez obsahu konzervantů (ať už syntetických nebo přírodních), případně mohou obsahovat nějakou složku, která sama o sobě má konzervační účinek.

Konzervanty jsou tedy pevnou součástí kosmetických přípravků a jejich volba závisí na celé řadě faktorů, ať už na složení přípravku nebo na funkci a způsobu používání a na době kontaktu s povrchem těla.

Cílem této práce je zhodnotit různé kategorie konzervantů a srovnat účinnost nejčastěji používaných konzervantů vůči vybraným mikroorganismům.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KONZERVANTY

### 1.1 Konzervanty – legislativa

Dle nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1223/2009 je konzervační přísadou látka, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku (dále KP). KP přípravek může obsahovat i jiné antimikrobní látky, které nejsou konzervanty, ale mají v KP jinou funkci, která souvisí s účelem použití, např. šampon proti lupům apod. Dle výše uvedené legislativy pro konzervanty platí, že KP nesmí obsahovat konzervační přísady, které nejsou uvedené v příloze V výše uvedeného nařízení a konzervační přísady uvedené v této příloze lze použít pouze v souladu s uvedenými podmínkami. [2]

### 1.2 Konzervanty – obecná charakteristika

Konzervační přísady k prevenci omezení růstu bakterií, kvasinek a plísní jsou nutné u všech formulací KP, zvláště u těch, které obsahují vodu, ale mikroorganismy se vyskytují i v suchých produktech jako jsou např. pudry a zásypy. Mikrobiální kontaminace způsobuje změnu organoleptických vlastností jako je pach, barva a viskozita a může také ohrozit zdraví spotřebitele. Klíčovou roli hraje koncentrace konzervantu. Rozlišujeme minimální inhibiční koncentraci, což je minimální koncentrace antimikrobiální látky, u které je prokázáno, že inhibuje viditelný růst mikroorganismů. Dále existuje minimální biocidní koncentrace, což je nejnižší koncentrace látky, která znemožní růst mikroorganismů během prvních 24 hodin. [3]

Správná volba konzervačních přípravků a jejich koncentrace musí zaručit nejen antimikrobní účinek, který má být delší, než je doba použitelnosti KP, ale musí být také zaručeno bezpečné použití KP s ohledem na toxicitu konzervační látky. Mikrobiální látka musí být natolik účinná, aby nedošlo k adaptaci mikroorganismů na látku. Ideální konzervační prostředek by měl být účinný v nízkých koncentracích, bez chuti, bez zápachu, bezbarvý, účinný proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím a houbám (kvasinkám a plísním), použitelný v horké i studené fázi, účinný a stabilní v rozsahu pH od 2,5 do 10,5, přijatelný pro regulační agentury po celém světě a nákladově efektivní. Protože takový konzervant v praxi neexistuje, vždy bude výběr, koncentrace a kombinace konzervačních látek pro KP specifický proces, který se bude odvíjet od funkce, složení a způsobu používání KP a od kompatibility s ostatními složkami KP. [3,4]

Odlišnou kapitolou je kosmetika s antimikrobním účinkem, která obsahuje také antimikrobní látky, ale ty jsou zde jako účinná látka, a ne jako konzervant. Jedná se například o přípravky na akné, na lupy, ústní vody, antibakteriální mýdla, dezinfekce na kůži apod. Zde potom záleží na klasifikaci produktu, zda se jedná o KP nebo léčivo. Rozhoduje zde základní funkce přípravku, tedy jestli je kosmetická nebo léčivá. [4]

Aby se snížila spotřeba konzervačních látek, je snaha využívat i jiné metody antimikrobiální ochrany, jako je např. ozáření nebo speciální obaly. Zvyšuje se také podíl přírodních konzervačních látek, u kterých je možná nižší toxicita a při získání konzervantu z přírodní složky odpadá riziko zbytkového rezidua jako z chemické výroby. [3]

### 1.3 Mikrobiální kontaminace

Studie ukázaly, že mezi nejčastěji se vyskytující mikroorganismy v kosmetice patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens* a další bakterie, houby a kvasinky. K primární mikrobiální kontaminaci může dojít ve výrobě buď ze vstupních surovin nebo při výrobním procesu, anebo sekundárně dochází ke kontaminaci spotřebitelem. Tato kontaminace může být eliminována vhodným obalem (dávkovač s pístem) nebo opatrnou manipulací spotřebitele (např. nabírání krému z dózy čistou špachtlí). Pokud se kontrolními mechanismy zjistí v KP mikrobiální kontaminace, dochází ke stažení KP z prodeje. Systém zachycení a stažení z prodeje mikrobiálně znehodnocených KP v rámci EU se nazývá Rapid Alert System (RAPEX). [4]

### 1.4 Kritéria výběru konzervantů

#### 1.4.1 Stabilita konzervantů

Stabilitu konzervačních látek ovlivňuje řada faktorů. Patří mezi ně rozpustnost a rozdělení v emulzích typů olej ve vodě (O/V) nebo voda v oleji (V/O). Je vhodné, aby měl konzervant vhodný rozdělovací koeficient v emulzi O/V, protože bude výrazná jeho aktivita ve vodné fázi. U opačných emulzí V/O je potřeba, aby měl konzervant afinitu k olejové fázi. Typ emulze je tedy jedním z důležitých faktorů výběru.

Dalším důležitým faktorem je pH produktu, které ovlivňuje stabilitu konzervantu. Např. parabeny jsou účinné v acidickém prostředí, zatímco bronopol podléhá v kyselém prostředí rozkladu. [4]



### 1.4.2 Kompatibilita

Konzervant musí být kompatibilní se složkami produktu, např. aktivitu parabenů může ovlivnit neionická povrchově aktivní látka, celulóza nebo škrob může absorbovat konzervační látky, mastek snižuje z 90 % účinnost methyl parabenu, a naopak EDTA je známá synergii s některými konzervanty. Koncentraci a aktivitu konzervantu může ovlivnit i materiál obalu. Např. polyethylen není kompatibilní s některými fenolovými sloučeninami. [4]

### 1.4.3 Bezpečnost

Použití konzervačních přípravků může vyvolat nežádoucí účinky. Po parfemacích jsou konzervanty druhou největší skupinou vyvolávající alergie a podráždění. Konzervanty v KP mohou vyvolat alergickou kontaktní dermatitidu nebo dráždivou kontaktní dermatitidu. Reakce může být mírná až velmi silná, u některých konzervantů se mohou projevit i estrogenní účinky. U některých konzervačních složek bylo dokonce diskutováno, že by mohly způsobit rakovinu prsu (parabeny). Konzervační přísady mohou vyvolat okamžitou reakci, nebo naopak, k reakci dochází až po letech používání. Mezi konzervační účinností a toxicitou existuje přímá souvislost. Ty nejméně účinnější konzervanty bývají často ty nejtoxičtější. Proto se nařízení ohledně používání konzervačních látek neustále mění a doplňuje, ať už na úrovni EU nebo jednotlivých států. Jedná se například o zákaz používání chloracetamidu v KP ve Francii (2012), omezení některých parabenů v KP v rámci EU (2013), omezení triclosanu na některé KP v rámci EU (2014), zákaz používání některých látek v KP apod. [3,4]

### 1.4.4 Soulad s kosmetickou legislativou

EU a Japonsko regulují použití konzervačních látek pozitivním seznamem, tedy seznamem povolených látek včetně jejich maximálních povolených koncentrací. Jak již bylo výše uvedeno, v EU je to příloha nařízení č. 1223/2009 a v Japonsku jsou všechny konzervační látky povolené pro kosmetiku v příloze 3 Standardů pro kosmetiku ministerstva zdravotnictví a sociálních věcí č. 331/2000.

Jiná situace je v USA. Zde neexistuje žádný seznam povolených látek, výrobce zde přebírá zodpovědnost za bezpečnost svých výrobků. Existuje zde nezávislá skupina vědců a lékařů (Cosmetic Ingredient Review), která posuzuje bezpečnost kosmetických přísad. [4]

## 2 SYNTETICKÉ KONZERVANTY

Jedná se o konzervační látky cíleně vyrobené chemickým procesem. Dělí se podle chemického složení na několik skupin. Jsou to organické kyseliny, alkoholy a fenoly, aldehydy a formaldehydové uvolňovače, deriváty isothiazolinu, halogenované sloučeniny, kvarterní amoniové sloučeniny (quaternia), biguanidy a další konzervanty, které nejsou zařazené v žádné skupině. Naopak některé lze zařadit do více skupin, např. bronopol je halogenovaná sloučenina, ale patří i mezi uvolňovače formaldehydu. Pro jednotlivé skupiny jsou obvykle typické podobné mechanismy účinku, podobné podmínky, které potřebují, aby vykazovaly antimikrobiální aktivitu a podobné inaktivační mechanismy. V kapitole dvě jsou uvedeny nejpoužívanější zástupci z každé chemické skupiny syntetických konzervantů. Nutno dodat, že konzervačními účinky disponují mnohé kosmetické suroviny, které nejsou zahrnuty do seznamu konzervačních látek přílohy V Nařízení EU, ale používají se v KP z jiných důvodů. [4]

### 2.1 Organické kyseliny

Organické kyseliny mají široké spektrum účinku. Aktivita jednotlivých organických kyselin závisí na různých faktorech. Zcela jistě je důležitým faktorem délka řetězce. Dlouhý řetězec zvyšuje antimikrobiální účinky, je však důvodem horší rozpustnosti ve vodě. Zásadním faktorem účinků organických kyselin je pH, protože ovlivňuje koncentraci nedisociovaných forem. Tato forma je sice schopna penetrovat do buňky, ale mikrobiální aktivitu organických kyselin zajišťují právě disociované formy. Při zvýšení pH o více jak 1,5 nad neutrální už ztrácí antimikrobiální účinek. [4]

Mechanismus účinku organických kyselin probíhá ve více úrovních. Jako první je okyselení vnějšího prostředí buňky, které je nepříznivé pro mikrobiální růst. K tomu se hojně využívají kyseliny octová, propionová, mravenčí, máselná a benzoová. [4,5]

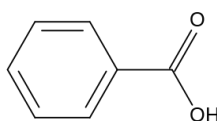
Dalším mechanismem je penetrace nedisociovaných kyselin do buňky a okyselení cytoplazmy, což způsobí díky vnitřnímu neutrálnímu pH disociaci kyseliny na anionty a protony, dojde ke snížení pH a tím se blokují některé enzymatické pochody, např. glykolýza, aktivní transport a buněčná signalizace. [4] Zároveň se při odstraňování protonů spotřebovává energie ATP a dochází k vyčerpání buněčné energie. K tomu se využívá kyselina propionová, mravenčí, benzoová a sorbová. [4,5]

Organické kyseliny se středním nebo dlouhým řetězcem způsobují změnu tekutosti cytoplazmatické membrány, např. kyselina sorbová. [4,5]

Negativně nabité ionty organických kyselin způsobují navázání kovových iontů z mikrobiálního obalu, kyselina sorbová zase způsobuje inhibici některých enzymů buněčného metabolismu a kyselina benzoová inhibuje aktivní transport některých aminokyselin a oxokyselin. [4]

V pozitivním seznamu přílohy V (ES) č. 1223/2009 jsou nejdůležitější kyseliny benzoová, propionová, salicylová, sorbová, dehydrooctová, mravenčí, undecylenová, citrónová a hydroxymethylaminoacetát sodný. [4]

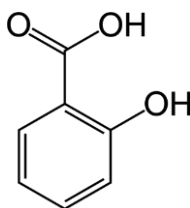
### 2.1.1 Kyselina benzoová (kyselina benzenkarboxylová)



Obrázek 1 Kyselina benzoová (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Kyselina benzoová se vyskytuje ve formě bílého krystalického prášku. Jako konzervant si zachovává své vlastnosti při pH produktu do 5, jinak ztrácí antimikrobní účinky. Používá se nejen jako konzervant, ale také jako účinná látka k léčbě plísňových infekcí buď samostatně nebo ve spojení s dalšími látkami. Její aktivita je hlavně protiplísňová, ale vykazuje i určitou aktivitu vůči bakteriím. Nicméně některé mikroorganismy dokáží tuto kyselinu metabolizovat, a to rod bakterií *Pseudomonas* a druh *Acinetobacter calcoaceticus*. [6] Kromě vyššího pH tuto kyselinu inaktivují neionické povrchově aktivní látky nebo ionty železa. Jinak vykazuje dobrou stabilitu, kromě vysokých teplot. Je rozpustná ve vodě, v glycerinu a v glykolech. V přípravcích se přidává do vodné fáze. [7] Dle EU legislativy se kyselina benzoová používá do oplachových přípravků do koncentrace 2,5 %, do přípravků pro ústní hygienu do 1,7 % a do neoplachových přípravků do 0,5 %. Soli kyseliny benzoové se v KP používají v koncentraci do 0,5 %. [2]

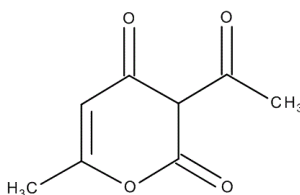
### 2.1.2 Kyselina salicylová (kyselina 2-hydroxybenzenkarboxylová)



Obrázek 2 Kyselina salicylová (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Kyselina salicylová se v přírodě vyskytuje v kůře vrby. Je to bezbarvá krystalická látka. Kyselina salicylová se využívá jako konzervant ve farmacii a v kosmetice, a kromě toho se používá jako účinná látka k léčbě plísňových infekcí spolu s kyselinou benzoovou, při léčbě akné, lupů, seborhoické dermatitidy, lupénky nebo při odstraňování bradavic. Je mírně rozpustná ve vodě a plně rozpustná v alkoholu a v tucích. Aktivní je kyselina, ne její soli. Největšího antimikrobiálního účinku dosahuje při pH 2, to až 90 %, s rostoucím pH aktivita klesá, při pH 4 už je účinnost jen 8,6 % a při pH 6 už vykazuje téměř nulovou aktivitu. Je nekompatibilní se solemi železa a její stabilitu snižuje UV záření. [6,7] Jako konzervant se používá v koncentraci do 0,5 %, je zakázáno její používání v kosmetice pro děti do tří let s výjimkou šamponů, nesmí se používat v produktech pro péči o dutinu ústní a do přípravků k inhalaci. [2]

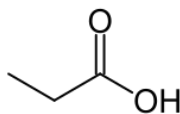
### 2.1.3 Kyselina dehydrooctová (3-acetyl-6-methylpyran-2,4(3H)-dion)



Obrázek 3 Kyselina dehydrooctová (Upraveno z: [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com))

Kyselina dehydrooctová je bílá nebo světle žlutá krystalická látka bez zápachu. Je rozpustná ve vodě v koncentraci do 0,1 %. [6] Pro nízkou rozpustnost ve vodě se někdy používá její sodná sůl. Nejlepší antimikrobní účinky vykazuje do pH 6, při zvýšení pH dochází k deaktivaci. Je stabilní až do teploty 120 °C po dobu jedné hodiny. Nejsilnější účinek má proti houbám, ale účinkuje i u řady bakterií. [7] Typické inhibiční koncentrace pro vybrané mikroorganismy jsou: pro *Aerobacter aerogenes* 0,3 %, pro *Bacillus cereus* 0,3 %, pro *Lactobacillus plantarum* 0,1 %, pro *Staphylococcus aureus* 0,3 % pro *Pseudomonas aeruginosa* 0,4 %, pro *Aspergillus niger* 0,05 %, pro *Penicillium expansum* 0,01 %, pro *Rhizopus nigricans* 0,05 %, pro *Trichophyton interdigitale* 0,005 %, pro *Saccharomyces cerevisiae* 0,1 %. [6] Nevykazuje účinky vůči rodu *Pseudomonas*. [7] Toxikologickými studiemi bylo prokázáno, že přípravek je přijatelný jako konzervační prostředek pro potraviny, kosmetiku a léky. [6] Tato kyselina a její soli jsou v kosmetických přípravcích povolené dle legislativy EU v koncentraci do 0,6 % a nesmí se používat v aerosolech. [2]

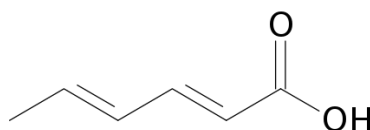
#### 2.1.4 Kyselina propionová (kyselina propanová)



Obrázek 4 Kyselina propionová (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Kyselina propionová se vyrábí reakcí ethylenu a oxidu uhelnatého, ale je také přirozeně produkována bakterií *Propionibacterium acnes*, která se běžně vyskytuje na kůži. Antimikrobní vlastnosti vykazuje pouze kyselina, nikoliv její soli. S rostoucím pH se snižuje její účinek. Největší antimikrobní vlastnosti vykazuje při pH 3, a to až 99 %, při pH 4 už je to 88 % a při pH 6 je to už jen 79 %. Největší účinky vykazuje proti plísním. Je stabilní a rozpustná ve vodě nebo v alkoholu. [7] Využívá se hlavně v potravinářství k potlačení plísní a bakterií v pečivu, při výrobě sýrů a sladového extraktu, [6] nicméně její využití je i v kosmetice, kde se smí používat v koncentraci do 2 %. [2]

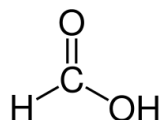
#### 2.1.5 Kyselina sorbová (kyselina hexa 2,4 dienová)



Obrázek 5 Kyselina sorbová (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Tato kyselina si zachovává antimikrobní aktivitu při pH do 4,5. Rozpustnost kyseliny ve vodě je velmi omezená, zatímco rozpustnost draselné soli kyseliny sorbové je asi 58 %. Proto je samotná kyselina vhodná pro lipofilní prostředí. Vykazuje silnou aktivitu proti plísním i kvasinkám, ale menší proti bakteriím. Je citlivá na UV záření a v roztoku žlutne. [7] Využívá se ve farmacii a kosmetice, ale také v potravinářství. Jak již bylo výše uvedeno, mechanismus účinku spočívá ve změně tekutosti cytoplazmatické membrány a v inhibici enzymů buněčného metabolismu a aktivního transportu aminokyselin a oxokyselin, a to hlavně u *E. coli* a *Bacillus subtilis*. [6,8] Dle legislativy je možné kyselinu sorbovou používat v koncentraci do 0,6 %. [2]

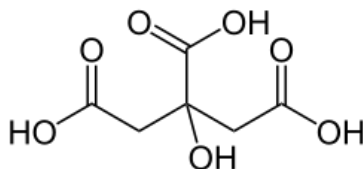
### 2.1.6 Kyselina mravenčí (kyselina methanová)



Obrázek 6 Kyselina mravenčí (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Kyselina mravenčí je organická kyselina s nejkratším řetězcem. Kromě chemické výroby vzniká jako vedlejší produkt při výrobě kyseliny octové a nachází se v jedu mravenců a včel. Jedná se o bezbarvou kapalinu, je zcela mísitelná s vodou, glycerinem a alkoholem. Největší antimikrobiální aktivitu vykazuje při pH 3, při zvýšení pH tato aktivita postupně klesá, a u pH 6 je již na úrovni 1 %. Její antimikrobiální účinky nejsou silné. Je citlivá na teplo a na silné kyseliny a zásady. Nejvhodnější použití je smíchání s vodnou fází. [7] EU legislativa umožňuje použití kyseliny v kosmetických přípravcích v koncentraci do 0,5 %. [2]

### 2.1.7 Kyselina citronová (kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová či kyselina 3-karboxy-3-hydroxypentandiová)



Obrázek 7 Kyselina citronová (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Kyselina citronová je jednou z nejpoužívanějších organických kyselin. Využívá se jako konzervant v potravinářství, ve farmacii a v kosmetice. Dále se používá jako antioxidant, ochucovadlo a ke snížení pH výrobku. Vyrábí se pomocí produkce kultury *Aspergillus niger*. Je meziproduktem citrátového cyklu. [9] Kyselina citronová synergicky zvyšuje konzervační účinek jiné látky s antimikrobními účinky, např. byl tento efekt prokázán u kyseliny linolenové. [10] Dále zesiluje antifungální účinky u kmene *Bacillus subtilis*. [11] Kyselina citronová je tedy konzervační činidlo se slabším účinkem, ale může zesilovat konzervační efekt ve spojení s jinými konzervanty nebo dalšími složkami produktu. Legislativa povoluje její použití v koncentraci do 0,2 %. [2]

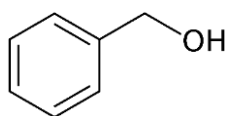
## 2.2 Alkoholy a fenoly

Alkoholy jsou nearomatické hydroxylové deriváty uhlovodíků, které mohou být jednosytné nebo vícesytné a mohou mít lineární nebo rozvětvený řetězec. Fenoly obsahují také hydroxylovou skupinu, ta je však vázána na benzenové jádro, jedná se tedy o aromatické deriváty uhlovodíků. U fenolů bylo zjištěno, že para substituce alkylového řetězce s šesti uhlíky zvyšuje antibakteriální aktivitu. Vyšší antibakteriální aktivita je rovněž prokázána u lineárních řetězců než u rozvětvených se stejným počtem uhlíků. [4]

Na druhou stranu Park a kolektiv (2001) uvádí, že antibakteriální aktivita nezávisí na délce para substituovaného řetězce. Antimikrobiální aktivitu zvyšuje halogenace fenolu a nejvyšší aktivita je dosažena, když je alkylová skupina v poloze orto a halogen v poloze para. Aktivitu zvyšuje i nitro skupina, zatímco antibakteriální aktivita klesá, pokud jsou u bisfenolů kruhy spojeny skupinou CO, SO, CH. [4]

Mechanismus účinku souvisí s denaturací proteinů a narušením syntézy proteinů. Fenol vyvolává indukovaný stres, který ovlivňuje reakci buňky na oxidační stres, zasahuje do metabolismu lipidů, aminokyselin, nukleotidů a do buněčné motility a buněčného dělení. Benzylalkohol a phenoxyethanol způsobují již v nízkých koncentracích lýzu membrány, o-phenylphenol inhibuje syntézu peptidoglykanu inhibicí syntézy lysinu u *Staphylococcus aureus*, triclosan inhybuje enzymy biosyntézy mastných kyselin u *Mycobacterium spp.* Parabeny zase způsobují inhibici syntézy proteinů včetně klíčových enzymů reakcí s volnými aminokyselinami, dále se podílejí na inhibici syntézy DNA a RNA, ovlivňují transport živin přes membránu, interagují s mechanosenzitivními kanály a u hub ovlivňují funkci mitochondrií. [4]

### 2.2.1 Benzyl alkohol (fenylmetanol)

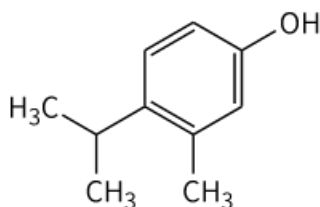


Obrázek 8 Benzyl alkohol (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Přirozeně se nachází v ovoci, v čajích a v esenciálních olejích. Vyrábí se synteticky reakcí benzylchloridu s hydroxidem sodným. Využívá se jako rozpouštědlo i pro jiné konzervanty a jako vonná a chuťová látka. Benzyl alkohol je rozpustný ve vodě v koncentraci do 4 %. Je nejaktivnější proti G<sup>+</sup> bakteriím a kvasinkám a vykazuje i aktivitu proti plísním. Inaktivují ho neionické látky a pH nad 7. Může oxidovat na benzaldehyd, proto se doporučuje přidávat

do směsi antioxidanty. Má také mírné anestetické účinky. [7] V kosmetice je dle legislativy EU povolen v koncentraci do 1 % a je uveden v seznamu alergenů. [2]

### 2.2.2 4-Isopropyl-m-kresol (o-Cymen-5-ol)

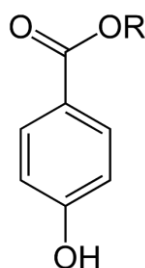


Obrázek 9 4-Isopropyl-m-kresol (Upraveno z: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

Jedná se o derivát kresolu a má podobnou strukturu jako thymol (složka éterických olejů s vysokou antibakteriální aktivitou). Je rozpustný v alkoholech a glykolech a prodává se v nich rozpuštěný a je špatně rozpustný ve vodě. Působí hlavně proti kvasinkám a plísním. Lze ho inaktivovat neionickými látkami, je stabilní až do pH 11. [7] Legislativa umožňuje jeho použití v kosmetice v koncentraci do 0,1 %. [2]

### 2.2.3 Parabeny

Parabeny jsou estery kyseliny para-hydroxybenzoové, které mají hydroxylovou skupinu na čtvrtém uhlíku a alkylovou skupinu v poloze para.



Obrázek 10 Paraben (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Jedná se o metylparaben, etylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben a benzylparaben. Samotná kyselina para-hydroxybenzoová má antimikrobiální účinky do pH 6, soli kyseliny vykazují aktivitu až do pH 8. [7] Výhodou parabenů je, že jsou chemicky inertní, málo toxické, levné, stabilní a účinné. Nemají barvu ani zápach a jsou nejúčinnější při neutrálním pH. Používají se většinou v kombinacích a kombinují se i s jinými konzervanty. Jsou to bílé krystalické látky. Antimikrobiální účinek



spočívá podle typu parabenu v narušení transportního mechanismu membrány a následně k omezení funkce mitochondrií a vyčerpání buněčného ATP anebo k inhibici syntézy DNA a RNA. Největších účinků dosahují parabeny proti G<sup>+</sup> bakteriím a proti houbám. Proti G<sup>-</sup> bakteriím je účinnost omezená. Běžně používané parabeny vykazují dobrou inhibici vůči *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* a *Staphylococcus aureus*. Co se týká minimální inhibiční koncentrace, jednotlivé parabeny jsou méně účinné oproti jiným konzervantům a je vyžadována vyšší koncentrace. Aktivita se liší od druhu parabenu a typu mikroorganismu. Jako účinnější se ukázaly kombinace více parabenů o menší koncentraci. Parabeny se kombinují na základě požadavku rozpustnosti, požadované doby trvanlivosti a spektru aktivity. S rostoucí délkou řetězce roste antimikrobní účinek, ale snižuje se rozpustnost ve vodě a zvyšuje v alkoholu a v tucích. Isoparabeny nejsou vůbec rozpustné ve vodě a benzylparaben je hůře rozpustný ve vodě i v propylenglykolu. Parabeny jsou funkční pouze ve vodné fázi, v olejové fázi nevykazují žádnou aktivitu. Objevují se kombinace dvou až pěti parabenů, Nejčastěji se používá kombinace metylparaben a etylparaben. [12]

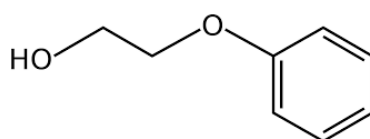
Parabeny jsou inaktivovány sloučeninami s vodíkovými můstky, např. polysorbáty, deriváty celulózy, proteiny, lecitinem. Inaktivace je také ovlivněna pořadím přidávání do přípravku nebo způsobem přípravy, například zahřívání v aniontové emulzi zvýší hydrolyzu na volnou kyselinu. Při degradaci mohou parabeny migrovat do tukové fáze a tím pozbývají účinnosti. Při nižším pH mohou způsobit disociaci ionty železa. Dále mohou být parabeny absorbovány polyetylenovými nádobami.

V kosmetice se používají i soli parabenů, u nichž hrozí riziko, že mohou ovlivnit stabilitu emulze. V rámci EU jsou povoleny soli draslíku, vápníku, sodíku, hořčíku. [7]

Parabeny jsou konzervanty hojně používané v kosmetice, farmacii, v potravinářství a dlouho byly považovány za netoxické, nedráždivé a bezpečné. Kosmetické studie byly zaměřeny pouze na kožní dráždivost a prokázaly, že u citlivých osob mohou parabeny vyvolat dermatitidu a otoky a zarudnutí víček. Farmakologické studie však prokázaly možnou estrogení aktivitu, za kterou je zodpovědný metabolit kyselina para-hydroxybenzoová. Existují hypotézy, že při perorálním podávání by se mohly parabeny podílet na karcinomu prsu. Parabeny tedy v potravinách podléhají omezením. Přestože nebyla prokázána nebezpečnost použití parabenů v antiperspirantech a deodorantech, zastánci teorie nebezpečnosti tvrdí, že při holení podpaží vznikají drobná poranění, a tedy i možnost vstupu parabenů do těla, a že by se v těchto kosmetických přípravcích parabeny používat neměly. [13] V rámci EU i jednotlivých států postupně došlo k úpravám a omezením používání

parabenů v kosmetice. Ve zprávě Evropské komise z roku 2018 jsou uvedeny parabeny jako látky, u kterých existuje podezření narušení endokrinního systému. Přestože SCCS (Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů) potvrdil bezpečnost používání některých parabenů v kosmetice, nebylo vyloučeno riziko pro lidské zdraví při použití dalších parabenů a celkově se s parabeny zachází jako s látkami vzbuzujícími obavy o lidské zdraví, které podléhají případ od případu regulaci. V současnosti se smí v EU používat jednotlivé parabeny a jejich soli v koncentraci do 0,4 % a ve směsi do 0,8 %. [2]

#### 2.2.4 Phenoxyethanol (2-Phenoxyethan-1-ol)



Obrázek 11 Phenoxyethanol (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

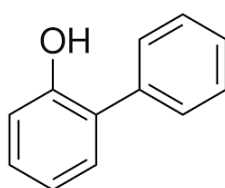
Phenoxyethanol je olejovitá kapalina s vůní. Jedná se o produkt reakce ethylenoxidu a fenolu. Využití phenoxyethanolu je širší, používá se i jako vonná fragrance s květinovým aroma, při syntéze chemických barviv, jako repelent proti hmyzu, v technické kvalitě při odstraňování nátěrů a má anestetické účinky. Jako konzervant se využívá ve farmacii, v kosmetice a u některých průmyslových výrobců. Jeho použití se odvíjí od čistoty. Pro kosmetické použití je rozhodující hladina čistého fenolu, která by měla být pod 0,1 %. Jako další nečistota se vyskytuje diethylether a další stopové produkty. Zajímavé je, že při 5 % obsahu ethyletheru vykazuje phenoxyethanol vyšší antibakteriální aktivitu než při čistotě 99 %. Phenoxyethanol je výborné rozpouštědlo pro parabeny a další konzervační látky a vždy se používá v kombinaci s jinými konzervanty. [7]

Phenoxyethanol je rozpustný ve vodě v koncentraci do 2,67 %. Je mísitelný s propylenglykolem a glycerinem. Ve srovnání s jinými konzervačními látkami jsou jeho účinky slabší. V systémech roztoků s anionickými povrchově aktivními látkami musí být voda nasycena phenoxyethanolem, při nízké koncentraci by působil pro bakterie jako živná půda. Nejaktivnější je proti G<sup>-</sup> bakteriím. [7] Nejvyššího antimikrobiálního účinku se dá dosáhnout, pokud v emulzi převažuje lipofilní fáze a vodná fáze je v co nejmenším poměru. Rozpuštěním phenoxyethanolu ve vodné fázi se potom dá docílit vyšší koncentrace a tím i většího účinku. Proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis* je potřeba alespoň 0,6 % koncentrace phenoxyethanolu ve vodné

fázi. V emulzích O/V byl vůči phenoxyethanolu nejodolnější *Aspergillus brasiliensis*, a naopak nejcitlivější *Staphylococcus aureus*. [14]

Inaktivaci phenoxyethanolu způsobují vysoce ethoxylované sloučeniny. Koncová hydroxylová skupina podléhá oxidaci a esterifikaci. Stabilní je do teploty 85 °C. Jeho antimikrobní aktivita je možná v rozmezí pH 3 až 10, což je oproti ostatním konzervantům poměrně široké rozmezí. [7] V rámci EU je povolen v kosmetických přípravcích v koncentraci do 1 %. [2]

### 2.2.5 Bifenyl-2-ol (o-Phenylphenol)



Obrázek 12 Bifenyl-2-ol (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

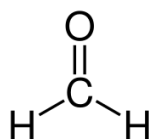
Bifenyl-2-ol se používá kromě kosmetiky jako potravinářská přísada, průmyslová a spotřební dezinfekce a jako zemědělský fungicid. Je nerozpustný ve vodě, ale sodná sůl je zcela rozpustná ve vodě. Sůl ale nevykazuje antimikrobní účinky, zatímco bifenyl-2-ol je neaktivnější proti houbám. Inaktivuje ho ředění, jinak se jedná o stabilní konzervant.

V konzervaci kosmetických přípravků se používá v menší míře, povolená koncentrace je v EU do 0,2 %, stejně jako fenol.

## 2.3 Aldehydy

Aldehydy mohou reagovat s různými chemickými substituenty (aminy, karboxyly, thioly, hydroxyly, iminy a amidy) na biomolekulách včetně proteinů a DNA. Proteiny s formaldehydem tvoří síťování, což vede k agregaci proteinů a dochází k nevratné chemické modifikaci, která vede ke ztrátě metabolických schopností. [4]

### 2.3.1 Formaldehyd (methanal) a paraformaldehyd



Obrázek 13 Formaldehyd (Upraveno z: [www.cs.wikipedie.org](http://www.cs.wikipedie.org))

Formaldehyd je nejjednodušší aldehyd, který vzniká oxidací methanolu nebo reakcí oxidu uhelnatého s vodíkem za přítomnosti katalyzátoru. Formaldehyd je jedovatý plyn a reakcí s vodou vzniká formalín (methylen glykol), který je stabilizován methanolem, aby nedošlo k polymeraci. Formalín je tedy 37 % roztok formaldehydu ve vodě a ten se používá jako konzervační činidlo. Paraformaldehyd je potom polymer formaldehydu s různým stupněm polymerace, který má konzistenci prášku. I když se tedy uvádí jako konzervat formaldehyd, ve skutečnosti působí jako konzervant methylen glykol, tedy formaldehyd rozpuštěný ve vodě. [7]

Formaldehyd je neaktivnější proti bakteriím, ale vykazuje i aktivitu proti plísním. Inaktivují ho proteiny a želatina. Je stabilní při pH 3–9. Je vysoce těkavý a může se odpařovat z hotových výrobků. Přípravky se nesmí kvůli těkavosti zahřívát. Může reagovat s vonnými složkami, amoniakem nebo kyselinou dehydrooctovou. [7]

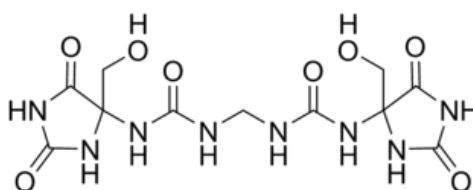
Formaldehyd je obecně považován za silný alergen, který může vyvolat chronický alergický ekzém. Bylo zjištěno, že používání kosmetiky, které obsahovalo nízké množství formaldehydu, vedlo u lidí s alergiemi k dermatitidě (Hauksson a kol., 2016). Byla zkoumána souvislost mezi expozicí formaldehydu a rozvojem akutní myeloidní leukémie (Zhang a kol., 2010), ale podezření nebylo jinými studiemi potvrzeno. [15] V rámci EU je formaldehyd a paraformaldehyd povolen v koncentraci 0,1 % v přípravcích pro ústní hygienu, v koncentraci 0,2 % v ostatních přípravcích a je zakázán v rozprašovačích. Přesto, že je formaldehyd povolen v příslušných koncentracích, používá se v kosmetice velmi omezeně. [2]

## 2.4 Formaldehydové uvolňovače

Aby se minimalizovaly vedlejší účinky formaldehydu, používají se tzv. formaldehydové uvolňovače neboli donory formaldehydu. Jsou to sloučeniny, které pomalu uvolňují formaldehyd, např. imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, hexeditin, DMDM hydantoin, methenamin, quaternium-15 a bronopol. Rychlost uvolňování formaldehydu závisí na teplotě, pH, době skladování a složení produktu. [15] Uvolňovače formaldehydu pomalu uvolňují formaldehyd degradací nebo rozkladem vyplývajících z podmínek použití. Antimikrobiální aktivita těchto konzervačních látek pravděpodobně vyplývá z formaldehydu uvolněného hydrolyzou za přítomnosti vody. Uvolňovače formaldehydu jsou regulovány na základě obsahu uvolňování formaldehydu. Biocidní účinek je způsoben stejně jako u formaldehydu síťováním proteinů a také síťováním DNA a RNA. Kierche a kolektiv

(2010) prokázali, že reaktivita některých uvolňovačů s volnými aminokyselinami nesouvisí s uvolňováním formaldehydu. Např. antimikrobiální aktivitu bronidoxu a bronopolu způsobuje oxidace proteinového thiolu, která zapříčiňuje inhibici enzymatických aktivit a následně zastavuje mikrobiální růst. [4]

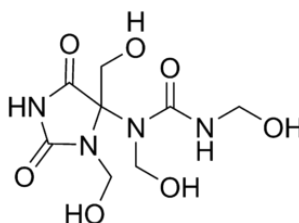
#### 2.4.1 Imidazolidinyl urea (1,1'-metylenbis{3-[ 4- (hydroxymethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl] močovina})



Obrázek 14 Imidazolodinylní urea (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Jedná se heterocyklickou substituovanou ureu, která se vyrábí reakcí alantoinu s formaldehydem. Využívá se jako konzervant v kosmetice a ve farmacii. Používá se ve formě prášku, který je rozpustný ve vodě. Vykazuje antimikrobní účinky proti G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím a menší aktivitu vůči plísním. Je synergická s parabeny. Nejsou známy inaktivátory, pouze ředěním pozbývá účinku. Je stabilní do pH 8,5, rozkládá se při vystavení emulgačním teplotám více jak čtyři hodiny a zvýšením pH nad 9. Zpracovává se z roztoku ředěním 50:50. [7] Legislativa povoluje použití v kosmetice do 0,6 % koncentrace. [2]

#### 2.4.2 Diazolidinyl urea (1-[3,4-bis(hydroxymethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]-1,3-bis(hydroxymethyl)urea)

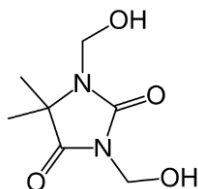


Obrázek 15 Diazolidinyl urea (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Opět se jedná o heterocyklickou substituovanou ureu, která se vyrábí reakcí alantoinu a formaldehydu, poměr vstupních látek je však jiný. Je opět ve formě prášku, který je silně hygroskopický, je rozpustná ve vodě, synergická s parabeny, ale vykazuje dvakrát vyšší aktivitu proti všem bakteriím než imidazolidinyl urea. Menší aktivitu vykazuje proti plísním.

Nejsou známé inaktivátory, kromě ředění. Je stabilní při pH 2–9, při 60 °C se rozkládá a nesmí být vystavena déle než hodinu teplotě nad 75 °C. [7] Dle legislativy EU je možné použití v koncentraci do 0,5 %. [2]

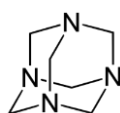
#### 2.4.3 DMDM hydantoin(1,3-Bis(hydroxymethyl)-5,5-dimethylimidazolidin-2,4-dion)



Obrázek 16 DMDM hydantoin (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Jedná se o prášek, který se komerčně prodává jako 55 % roztok ve vodě. Vzniká reakcí methylen glykolu a dimethyloldimethylhydantoinu. Kromě kosmetiky se využívá jako konzervant pro barvy, lepidla, roztoky polymerů atd. Je rozpustný ve vodě a propylen glykolu. Vykazuje velmi dobrou aktivitu vůči bakteriím, slabě proti plísním. Je stabilní při pH 3–9 a při teplotách do 80 °C. Vykazuje nižší aktivitu v přítomnosti hydrogensířičitanů. [7] Dle legislativy EU je možné použití v kosmetice do koncentrace 0,6 %. [2]

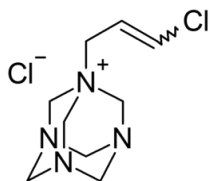
#### 2.4.4 Methenamine (hexamethylentetramin) (1,3,5,7-tetrazatricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] dekan)



Obrázek 17 Methenamine (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Jedná se o heterocyklickou sloučeninu s klecovitou strukturou. Připravuje se reakcí formaldehydu a amoniaku. Prodává se jako prášek, který se dobře rozpouští ve vodě. Je aktivní proti většině bakterií, inaktivuje ho pouze ředění. Rozkládá se v kyselém prostředí. Byl schválen jako konzervant v kosmetice a potravinářství, používá se také jako léčivo k infekci močových cest. [7] V EU bylo schváleno použití do koncentrace 0,15 %. [2]

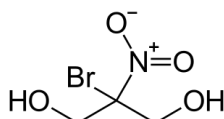
#### 2.4.5 Quaternium-15 (methenamin-3-chlorallylchlorid)



Obrázek 18 Quaternium 15 (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Jedná se o kvartérní amoniovou sůl, která využívá jako konzervant v kosmetice a jako antistatické činidlo. Quaternium-15 je krémový prášek se štiplavým zápachem. Snadno se rozpouští ve vodě a téměř se nerozpouští v minerálním oleji. Přípravuje se reakcí hexaminu s halogenovaným uhlovodíkem. Je poměrně stabilní v přítomnosti anionických, neionických a kationických látek a v přítomnosti proteinů a je stabilní v rozmezí pH 4–10,5. Při teplotě nad 60 °C se rozkládá a při požáru uvolňuje toxické zplodiny. [15] Quaternium-15 je účinné proti bakteriím a nejvyšší aktivitu vykazuje proti G– bakteriím. Proti houbám vykazuje slabší účinky. [7] Kromě využití jako kosmetický konzervant se používá i ke konzervaci lepidel, přidává se do papíru, lepenky apod. [14] V EU je povolena koncentrace v kosmetických přípravcích do 0,2 %. [2]

#### 2.4.6 Bronopol (2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol)



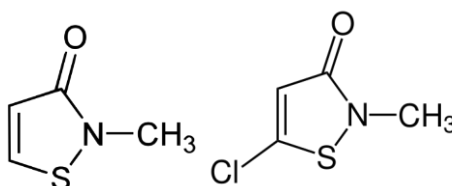
Obrázek 22 Bronopol (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Bronopol se připravuje reakcí nitromethanu s formaldehydem a potom bromem. Kromě kosmetiky se používá v řadě průmyslových aplikací a také u perorálních léčiv. Bronopol je z 28 % rozpustný ve vodě, z 52 % v propyleglykolu, do určité míry se rozpouští v esterech mastných kyselin a je nerozpustný v minerálním oleji. Bronopol je účinný proti bakteriím, proti plísním má menší účinky. Může být deaktivován thioly a hliníkem. Reaguje s kyselinou dehydrooctovou, s thiosíranem sodným a disířičitanem sodným. Rozkládá se v alkalickém prostředí za vyšších teplot. Neměl by se používat s aminy, protože za určitých podmínek může fungovat jako katalyzátor tvorby nitrosaminu. [7] Legislativa EU umožňuje jeho použití do koncentrace 0,1 %, za podmínky zabránění vzniku nitrosoaminů. [2]

## 2.5 Deriváty isothiazolinu

Antimikrobní aktivita derivátů isothiazolinu je způsobena oxidačním účinkem na proteiny, hlavně na thiolové skupiny cysteinových zbytků. Tím dochází k inhibici metabolismu enzymů a k disfunkci strukturních proteinů v buněčné stěně a membráně. [4]

### 2.5.1 Methylisothiazolinone a methylchlorisothiazolinone (2-methyl-1,2-thiazol-3(2H)-on), (5-chlor-2-methyl-1,2-thiazol-3(2H)-on)



Obrázek 19 Methylisothiazolinone, Obrázek 20 Methylchlorisothiazolinone

(Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

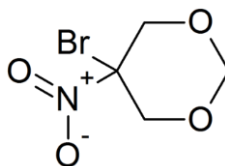
Tyto dva konzervanty se používají ve směsi. Methylchlorisothiazolinone se vyrábí chlorací methylisothiazolinone a chlór výrazně zvyšuje aktivitu proti bakteriím a přidává aktivitu proti plísním a celkově je to výborný širokospektrý biocid s účinkem proti všem mikroorganismům. Jsou oba mísitelné s vodou, s propylenglykolem, ale jsou nerozpustné v olejích. Mohou je inaktivovat bisulfidy, sekundární aminy, silné nukleofily, hydrogensířičitany, kyselina stearová musí být před přidáním neutralizována. Jsou ve směsi stabilní do pH 9 a neměly by být zahřívány nad 50 °C. Dlouhodobě není směs stabilní, a proto se používá v kombinaci s jinými konzervanty. Velmi časté je využití v šamponech a v kondicionérech. [7] V rámci EU je povoleno použití směsi do koncentrace 0,0015 % v poměru 3:1 (MCI:MI). [2]

## 2.6 Halogenované sloučeniny

Přidáním halogenu se stávají konzervanty účinnější, zvyšuje se aktivita vůči bakteriím a přidává se aktivita proti plísním. Mnoho halogenovaných sloučenin je ve vodě špatně rozpustných, což komplikuje přidávání do směsí. [7]



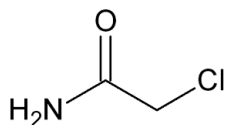
### 2.6.1 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan



Obrázek 21 5-brom-5-nitro-1,3-dioxan (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Připravuje se reakcí formaldehydu s bronopolem. Prodává se buď jako čistý prášek nebo v 10 % roztoku propylenglykolu nebo phenoxyethanolu. Je mírně rozpustný ve vodě (asi 0,4 %), ale dobře rozpustný v alkoholech a glykolech. Je aktivní proti všem mikroorganismům, hlavně proti houbám. Inaktivují ho aminy, je nestabilní pod pH 5 a nad teploty 50 °C. [7] Tento konzervant je poměrně dráždivý a je v EU povolen pouze v oplachových přípravcích v koncentraci do 0,1 %. [2]

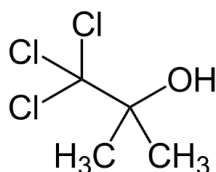
### 2.6.2 Chloracetamide (2-chloroacetamide)



Obrázek 23 Chloracetamide ( Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Jedná se o chlorovaný alifatický amid. Připravuje se reakcí methylchloracetátu a roztoku amoniaku. Původně se vyráběl jako herbicid a jeho využití je kromě kosmetiky hlavně v průmyslu. Prodává se buď jako čistý prášek nebo ve směsi s benzoátem sodným. Ve vodě je rozpustný do 9 %. Je to širokospektrý konzervant, který je poměrně stabilní, inaktivován může být naředěním. Chloracetamid je uveden v příloze I směrnice EU o nebezpečných látkách. Je to potenciální alergen a může dráždit oči a kůži. [7] V EU je povolen v koncentraci do 0,3 % a na obalu musí být uvedeno, že přípravek obsahuje chloracetamid. [2]

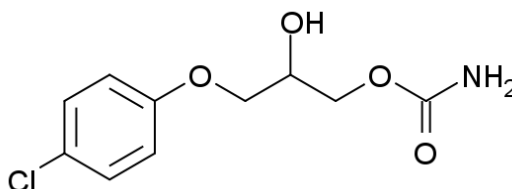
### 2.6.3 Chlorbutanol (1,1,1-trichlor-2-methylpropan-2-ol)



Obrázek 24 Chlorbutanol (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Připravuje se přidáním chloroformu do acetonu za katalytického působení práškového hydroxidu draselného. Kromě kosmetiky se používá ve farmacii. Prodává se jako prášek. Je rozpustný ve studené vodě do koncentrace 0,8 %, teplá voda rozpustnost zvyšuje a nejlépe je rozpustný v glycerinu a alkoholu. Nejvyšší aktivitu vykazuje proti G<sup>+</sup> bakteriím a mírnější účinek má proti plísním. Nejvhodnější pH je do 4. Inaktivují ho alkálie, neionické látky a PVP a je nestabilní v PE obalu. V alkalickém prostředí ve spojení s teplem se rozloží. Použití chlorbutanolu je omezeno silným kafrovým zápachem. [7] V EU se nesmí používat v rozprašovačích, v ostatní kosmetice do 0,5 % a obal musí být označen obsahem chlorbutanolu. [2]

### 2.6.4 Chlorphenesin (3-(4-chlorfenoxy)-propan-1,2 diol)



Obrázek 25 Chlorphenesin ( Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

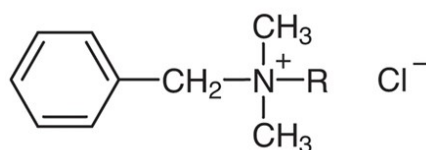
Jedná se o chlorovaný aromatický alkohol. Chlorphenesin je využíván nejen jako konzervant, ale také se používá ve farmacii k topické léčbě plísní. Je špatně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v glycerinu, acetonu a propylenglykolu. Nejaktivnější je proti plísním, jinak je jako konzervant slabší. Je stabilní do 45 °C. Inaktivují ho polysorbáty. [7] Legislativa EU ho povoluje jako konzervant do koncentrace 0,3 %. [2]

## 2.7 Kvartérní amoniové sloučeniny (quaternia)

Jedná se o soli kvartérních amoniových kationtů. Na kladně nabitém dusíku jsou navázány čtyři alkylové skupiny. Tyto sloučeniny patří mezi kationické povrchově aktivní látky. [17] Jejich princip působení spočívá v destabilizaci lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány

bakterií nebo kvasinek a asociací kladného náboje kvartérního dusíku s hlavními polárními skupinami fosfolipidů, které jsou záporně nabitě. [4] Jsou nejúčinnější proti grampozitivním bakteriím, ale inhibují i další mikroorganismy, včetně virů, působí dokonce na bakteriální spory. Používají se jako dezinfekce, konzervanty, antistatická a změkčující činidla. [17] Největší aktivita proti G<sup>+</sup> bakteriím byla pozorována u řetězce C12–C14 a proti G<sup>-</sup> bakteriím u řetězce C14–C16. Alkylový řetězec kratší než 4C a delší než 18C nevykazoval žádnou aktivitu proti bakteriím. [4]

### 2.7.1 Benzalkonium chlorid (N-alkyl-N-benzyl-N,N-dimethylamoniumchlorid)



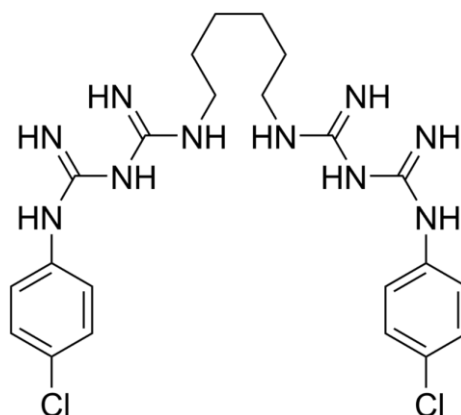
Obrázek 26 Benzalkonium chlorid (Upraveno z: [www.tcichemicals.com](http://www.tcichemicals.com))

Vyrábí se reakcí aminu s R-alkylačním činidlem, obvykle se řetězec pohybuje mezi C12 a C16. Používá se jako dezinfekční látka a jako konzervant. Je zcela rozpustný ve vodě. Nejvyšší aktivitu vykazuje proti bakteriím, kromě rodu *Pseudomonas*, slabší účinky vykazuje vůči plísním. Neaktivnější je při pH vyšším než 6. Špatnou aktivitu vykazuje v emulzích. Inaktivují ho anionické látky, polysorbáty a lecitin, jinak je velmi stabilní. [7] Legislativa povoluje jeho použití do koncentrace 0,1 % a nesmí se používat u přípravků, které přichází do kontaktu s očima. [2]

## 2.8 Biguanidy

Biguanidy jsou sloučeniny používané nejen jako kosmetické konzervanty, ale některé typy se využívají také jako antidiabetika. Antimikrobiální aktivitu zde zajišťují rozvětvené řetězce, lipofilní biguanidy vykazují lepší antimikrobní účinky. [4]

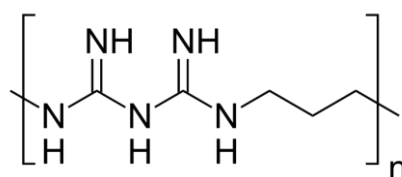
### 2.8.1 Chlorhexidin (N,N-bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimin-2,4,11,13-tetraazatetradekanediamidine)



Obrázek 27 Chlorhexidin (Upraveno z: [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org))

Chemicky se jedná o kationický biguanid. Vzhledem ke své struktuře je omezeně rozpustný. Využívá se jako antiseptikum a konzervační přísada. Podobně jako benzalkonium chlorid dobře působí proti bakteriím, kromě rodu *Pseudomonas* a slabší je účinnost proti plísním. [7] Kladně nabitý chlorhexidin se váže na záporně nabitou buněčnou stěnu a membránu a narušuje její integritu. [4] Nejlépe funguje při pH 5,5–6,5. Inaktivují ho anionické látky včetně mýdla. Při vyšších teplotách je nestabilní. [7] Jeho nejvyšší povolená koncentrace v EU je do 0,3 %. [2]

### 2.8.2 Polyaminopropyl biguanid



Obrázek 28 Polyaminopropyl biguanid (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Chemicky se jedná o kationický polymer. Používá se jako dezinfekční prostředek v potravinářském průmyslu, konzervuje roztoky na kontaktní čočky a jeho využití je i v kosmetice. Je rozpustný ve vodě, v alifatických alkoholech a v glykolech. Nejlépe účinkuje proti bakteriím, méně proti plísním. Inaktivují ho anionické povrchově aktivní látky a pH nad 8. Je stabilní do 80 °C. [7] V rámci EU je možné ho v kosmetice používat do koncentrace 0,1 %, nesmí se používat u aplikací, kde je možná inhalace. [2]

### 3 PŘÍRODNÍ KONZERVANTY

V současné době je v kosmetickém průmyslu snaha stále více omezovat a měnit nařízení, týkající se tradičních syntetických konzervantů a zároveň roste poptávka po přírodní kosmetice, která splňuje nějaké certifikované standardy. Protože oficiálně není přírodní kosmetika v legislativě zatím zakotvena, pro certifikaci se využívají v rámci Evropy standardy Cosmos a certifikace v České republice uděluje KEZ (Kontrola ekologického zemědělství). Pro kosmetiku se jedná o certifikáty CPK (Certifikovaná přírodní kosmetika) a BIO CPK. Ale i když kosmetika nesplňuje žádné certifikované standardy, přesto je s ohledem na přání spotřebitele větší snaha aplikovat do kosmetiky více přírodních produktů. Často dochází k využití látek, které sice nejsou na seznamu legislativně povolených konzervantů, ale výrobci je zařazují do produktu jako látku s jinou funkcí a přípravek pak mohou označit, že neobsahuje konzervační přísady. Každopádně obsah přírodních složek včetně přírodních konzervantů má odezvu u spotřebitele a má pozitivní marketingový efekt, i když je to mnohdy za cenu kratší doby použitelnosti nebo zvláštních podmínek skladování. [7,18,19]

Přírodní konzervanty mohou být šetrnější pro spotřebitele, ale často jsou potřeba ve větších koncentracích než syntetické a mohou způsobit u KP výraznější aroma nebo barvu, což může být někdy sensoricky nepříjemné. [7]

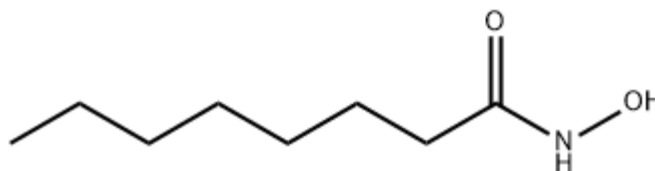
#### 3.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje obsahují řadu chemických sloučenin, které vykazují antimikrobní účinky. Největší antimikrobiální aktivitu vykazují éterické oleje, které obsahují větší podíl některých fenolů, aldehydů, a terpenických alkoholů. U ketonů a esterů je tato aktivita vůči mikroorganismům nižší. Bylo zjištěno, že komplexní esenciální olej vykazuje vyšší účinek než jednotlivé sloučeniny. Antimikrobiální sloučeniny v éterických olejích inhibují růst mikroorganismů nebo vedou k jejich smrti. Mechanismus účinku spočívá v interakci sloučenin esenciálních olejů s buněčnou stěnou a s buněčnou membránou a narušení její integrity a následně buněčných pochodů. Esenciální oleje nejsou na seznamu konzervantů přílohy V nařízení 1223/2009 EU, ale používají se v kosmetice jako účinné látky a zároveň dodávají přípravkům vůni. Antimikrobní vlastnosti mají všechny éterické oleje, liší se pouze v intenzitě účinku. Mezi esenciální oleje, které se používají hlavně pro antimikrobní efekt, patří esenciální oleje tymián obecný, tea tree oil, rozmarýn lékařský, mateřídouška obecná, oregano, levandule lékařská, hřebíček a řada dalších. Silný antimikrobní účinek vykazuje

velké množství sloučenin, např. thymol, karvakrol, phenylpropen, eugenol, cymen, pinen, benzylaldehyd, citral, farnesol a mnoho dalších. Běžně se v kosmetice, ale i v potravinářství a ve spotřební chemii používají nejen komplexní esenciální oleje, ale i jednotlivé složky esenciálních olejů, ať už z důvodu konzervace nebo vůně. [20, 21] Do kosmetiky se přidávají esenciální oleje dle doporučení výrobců v koncentraci 0,5–5 %, podle typu použití. [22] U většiny esenciálních olejů se uvádí, že při použití do koncentrace 4 %, je nutno použít ještě další konzervant. Nutno podotknout, že jelikož se jedná o přírodní látky, jejich chemické složení je proměnlivé a proměnlivé jsou i vlastnosti těchto produktů. [7]

## 3.2 Další konzervanty přírodního původu

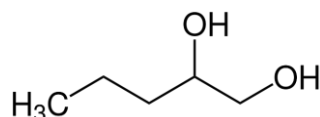
### 3.2.1 Kyselina kaprylhydroxymová (N-hydroxy octanamid)



Obrázek 29 Kyselina kaprylhydroxymová (Upraveno z: [www.m.chemicalbook.com](http://www.m.chemicalbook.com))

Jedná se o aminokyselinu získanou z kokosového oleje. Tato kyselina je při použití jako konzervant poměrně nová. Na rozdíl od ostatních vykazuje aktivitu bez ohledu na pH, a to hlavně proti plísním. Je rozpustná ve vodě, v glykolech a v glycerinu, proto je vhodná do vodné fáze. Je stabilní kromě vysokých teplot a aktivitu snižují ionty železa. Často se používá v kombinaci s glykoly pro zlepšení konzervačního účinku. V rámci legislativy EU není nijak omezena, není ani v pozitivních seznamech, ani není zakázaná. [7]

### 3.2.2 Pentylene glycol (natural) (1,2 Pentadiol)

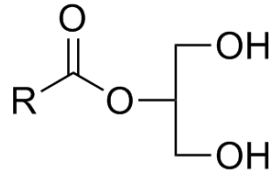


Obrázek 30 Pentylene glycol (Upraveno z: [www.wikidata.org](http://www.wikidata.org))

Vyrábí se z cukrové třtiny a kukuřice a má certifikaci Ecocert a Cosmos. V kosmetice se používá jako humektant, ale vykazuje také účinky vůči mikroorganismům. Používá se v koncentraci 3-5 % a od 5 % ve vodní fázi má konzervační účinky. [23] Ve směsi si

zachovává vlastnosti humektačního a emoliačního činidla a je možné ho kombinovat s přírodním fenylypropanolem. Jako konzervant je účinný již mezi 1–3 % koncentrace. Antimikrobní účinek je převážně nezávislý na hodnotě pH. [24]

### 3.2.3 Monoacylglyceroly



Obrázek 31 2–monoacylglycerol (Upraveno z: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

Monoacylglyceroly jsou přirozeně se vyskytující látky u nichž byl prokázán antimikrobní účinek a jako alternativa k chemickým konzervantům se využívají v potravinářství i v kosmetice. Z monoacylglycerolů vykazovaly nejvyšší účinnost vůči bakteriím monoacylglyceroly kyseliny kaprynové, undekanové a laurové. [25,26]

## 4 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ MNOŽSTVÍ KONZERVANTŮ V KOSMETICKÝCH PRODUKTECH

### 4.1 Vodní aktivita

Vodní aktivita je jeden ze zásadních faktorů, který ovlivňuje růst mikroorganismů. Růst neovlivňuje celkový obsah vlhkosti, ale voda, která je v přípravku dostupná. Aktivita vody se dá definovat jako poměr tlaku vodní páry produktu k tlaku par čisté vody při stejné teplotě. Čím je roztok koncentrovanější, tím je nižší tlak par a nižší aktivita vody. Nižší aktivita vody působí snížení turgoru v buňce, což má za následek pomalejší růst až smrt buňky. Většina bakterií vyžaduje aktivitu vody nad 0,90, *Staphylococcus aureus* vystačí i s 0,86, pro kvasinky je dostačující vodní aktivita nad 0,70 a pro plísně nad 0,60. [27]

Studie, která se zabývala vlivem obsahu glykolu a glycerinu na vodní aktivitu prokázala, že čím je v kosmetickém produktu větší obsah humektantů, tím nižší je jeho vodní aktivita. [28]

### 4.2 Využití synergie konzervačních látek a dalších sloučenin

Studie prokázaly, že některé kombinace konzervantů působí synergicky a k potlačení růstu mikroorganismů je v těchto kombinacích potřeba daleko menší koncentrace konzervantů než při samostatném použití. Například bylo prokázáno, že diazolidinyl urea, methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone a methylisothiazolinone, které vykazují poměrně značné iritační působení, vykazují v kombinaci s phenoxyethanolem inhibiční účinek vůči mikroorganismům při 10 až 20krát nižší koncentraci než samostatně. [29]

Dále bylo prokázáno, že směs některých přírodních látek, které nejsou registrované jako konzervanty, může synergickým působením zcela nahradit klasické chemické konzervanty a jejich účinnost je srovnatelná. Tato antimikrobní vlastnost byla využita u multifunkční přísady Dermosoft LP, která obsahuje caprylyl glykol, glycerin, glyceryl caprylate a phenylpropanol (phenylpropanol v kapitole 3.2.2 uveden v kombinaci s pentylen glykolem). Dermosoft se používá v emulzích jako smáčedlo, parfemace a konzervant. [30]



## 5 METODY HODNOCENÍ ÚČINKU KONZERVAČNÍCH PŘÍRAD

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, kosmetické přípravky se ve většině případů neobejdou bez konzervačních přísad a výběr těchto konzervantů je potom ovlivněn více faktory, o kterých již také bylo psáno. Kromě zohlednění faktorů, které potom vedou k výběru konzervantů a k jejich kombinacím, je nutné také posoudit účinnost těchto přísad vůči jednotlivým mikroorganismům, u kterých je předpoklad výskytu v kosmetickém produktu. Kromě toho, že máme legislativou schválené maximální povolené koncentrace těchto složek, tak aby neohrožovaly zdraví spotřebitele, pomocí různých metod je potřeba také vyhodnotit jejich efektivitu. [31]

Efektivita konzervační přísady se odvíjí od její schopnosti inhibovat buněčné pochody mikroorganismů, které spočívají nejčastěji v narušení integrity buněčné membrány nebo v denuraci buněčných proteinů. Určité koncentrace konzervantu vůči mikroorganismům nemusí být pokaždé stejně efektivní, protože jednak může docházet ke změnám v kosmetickém produktu, např. změna pH, která umožní růst mikroorganismů, nebo může dojít k adaptaci mikroorganismu na kosmetický produkt a jeho systém konzervace. Například bylo zjištěno, že některé druhy rodu *Pseudomonas* vyvíjejí rezistenci vůči parabenům a benzalkoniumchloridu. [31] U výrobků, které byly staženy z prodeje kvůli mikrobiální kontaminaci se nejčastěji objevují rody *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* a druh *E. Coli*. [32]

Proto je nutné tyto systémy opakovaně kontrolovat a hodnotit, aby se předešlo pozdější kontaminaci a následnému stahování přípravku z prodeje nebo k ohrožení zdraví spotřebitele. [31]

Antimikrobiální ochrana KP a účinnost použitých konzervačních přísad se testuje podle normy ČSN EN ISO 11930, která byla novelizována v roce 2019. Norma obsahuje metodiku testování. Princip spočívá v pomnožení mikroorganismů v neselektivním médiu, dále se provádí identifikace a izolace mikroorganismů. Hodnocení účinnosti se potom provádí inokulací KP kalibrovaným inokulem a množství přežívajících organismů se hodnotí v intervalech v průběhu 28 dnů. [33]

Účinnost jednotlivých konzervantů, případně směsí na jednotlivé mikroorganismy je možné testovat difúzními metodami nebo metodou diluční, kde se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (MIC), případně minimální baktericidní nebo fungicidní koncentrace (MBC), (MFC). [32,34,35]

## 5.1 Disková difúzní metoda a modifikovaná difúzní metoda

Difúzní metody se používají se pro zjištění citlivosti rychle rostoucích nenáročných a některých náročných bakterií. Disková difúzní metoda a její modifikovaná varianta jsou založeny na difúzi roztoku o určité koncentraci konzervantu na agarové plotně s cílovým mikroorganismem. Difúzní koeficient antimikrobní látky je ovlivněn její molekulovou hmotností, iontovým nábojem, rozpustností ve vodě, viskozitou a výškou agaru a kultivačními podmínkami. Difúzní disková metoda je jedna z nejstarších metod, která se používá ke zjištění citlivosti mikroorganismů na antibiotika a konzervační látky. Metoda je jednoduchá a proveditelná s minimálním laboratorním vybavením a je standardizovaná u EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti). Výhodou metody je flexibilní změna spektra testovaných látek, nevýhodou je časová náročnost a že se nejedná o kvantitativní metodu. [34,35,37,38,39]

## 5.2 Diluční metoda

Diluční metoda spočívá v přimíchání různých koncentrací konzervantu do živného média inokulovaného cílovým mikroorganismem a ve stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy stanovení koncentrace konzervantu, případně antibiotika, při které po inkubaci nedojde k viditelnému nárůstu mikroorganismů. U diluční metody se jako médium využívá agar nebo bujón. Obvykle se používá 12–15 koncentrací konzervantu řaděných geometrickou řadou. Při použití agaru se jako MIC stanoví agarová plotna s koncentrací, u které nedošlo k viditelnému nárůstu mikroorganismů. Výhodou použití agaru je vysoká standardizovanost, lze s ní testovat velký soubor bakteriálních kmenů a ve srovnání s mikrodiluční metodou lze lépe odhalit bakteriální kontaminaci. Nevýhoda metody je, že je časově a ekonomicky náročná a pracná. [34,36,38,40]

Bujón lze použít buď ve zkumavkách nebo na mikrotitrační destičce, což se nazývá mikrodiluční metoda. Jako MIC konzervantu se stanoví první zkumavka nebo jamka s čirým médiem. Zákal je možné vyhodnotit i spektrofotometricky, změřením hodnot absorbance. Výhodou mikrodiluční metody je vysoká shoda s výsledky při použití agaru, dále snadná příprava, jednoduché provedení a automatizace odečítání výsledků. Proto je tato metoda v současnosti upřednostňována. Mezi nevýhody patří neschopnost detekce kontaminace. [38,40,41,42,43]

### 5.3 Zhodnocení metod

Výše uvedené metody jsou hojně používané ve farmacii, v kosmetice, potravinářství a v dalších odvětvích, kde je potřeba inhibovat růst mikroorganismů a dají se aplikovat i na testování antimikrobní účinnosti dalších látek, tedy nejen antibiotik a konzervantů, které mají prokázané antimikrobní vlastnosti, ale do přípravků se přidávají kvůli jiným vlastnostem. Obě metody se vzájemně doplňují, difúzní metoda je metoda kvalitativní, jejím cílem je prokázat, zda je mikroorganismus vůči antimikrobní látce citlivý, či nikoliv.

Diluční metoda je metoda kvantitativní, stanoví tedy přesnou hodnotu koncentrace, která inhibuje mikroorganismus. K získání kvalitních dat je vhodné tyto metody i s různými obměnami kombinovat a docílit tak používání účinných koncentrací konzervačních látek, popřípadě jejich kombinací. [35,36,38]

## 6 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce v teoretické části bylo popsat roli konzervantů v kosmetice a uvést jejich základní typy a mechanismus jejich účinku. V praktické části potom zhodnotit účinnost pěti typologicky odlišných konzervačních činidel, která jsou legislativou povolena, proti čtyřem různým typům patogenů, které se v kosmetických přípravcích často vyskytují. Dílčím cílem bylo stanovení účinnosti ve vztahu k nejvyšší povolené koncentraci.

Pro naplnění cílů bylo zvoleno pět konzervantů, tak aby byly zastoupeny různé kategorie, organická kyselina (kyselina citronová), donor formaldehydu (bronopol), fenolová sloučenina (phenoxyethanol), kvarterní amoniová sloučenina (benzalkonium chlorid) a esenciální olej tymián. Vzhledem k použité metodice byly konzervanty voleny i s ohledem na jejich rozpustnost ve vodě.

Aby bylo možné vyhodnotit účinnost konzervantů vůči vybraným mikroorganismům, běžně se v KP vyskytujících, byla použita disková difúzní metoda, modifikovaná difúzní metoda a diluční metoda stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). [35,36,37]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 MATERIÁL A METODIKA

### 7.1 Vzorčky konzervantů

- **Vzorek č. 1**

**Obchodní název:** Benzalkonium chlorid

**Výrobce:** Sigma Aldrich s.r.o.

**Popis:** Žlutá až bílá pevná nebo polotuhá látka. Rozpouští se 1 g v 10 ml horké vody.

**Použití:** Používá se jako konzervační činidlo ve spotřební chemii a kosmetice.

- **Vzorek č. 2**

**Obchodní název:** 2-Brom-2-nitro-1,3-propandiol 98 % (Bronopol)

**Výrobce:** Sigma Aldrich s.r.o.

**Popis:** Bílý bezvodý prášek. Rozpouští se 100 mg na 1 ml vody.

**Použití:** Používá se jako konzervant ve spotřební chemii a kosmetice.

- **Vzorek č. 3**

**Obchodní název:** Phenoxyethanol

**Výrobce:** M+H, Míča a Harašta s.r.o.

**Popis:** Olejovitá, lehce lepivá kapalina s květinovým aroma.

**Použití:** Používá se jako konzervant kosmetiky, ve spotřební chemii a v průmyslu jako odstraňovač nátěrů.

- **Vzorek č. 4**

**Obchodní název:** Citrid acid

**Výrobce:** VWR International s.r.o.

**Popis:** Bezvodý bílý prášek, rozpustný ve vodě.

**Použití:** V používá se v potravinářství a kosmetice jako konzervant, ochucovadlo, antioxidant, ke snížení pH a má využití i ve farmacii.

- **Vzorek č. 5**

**Obchodní název:** Tymiánová silice

**Výrobce:** Biomedica s.r.o.

**Popis:** Esenciální olej získaný parní destilací, silně koncentrovaná, tmavě žlutá až oranžová kapalina s obsahem thymolu 50–60 %, má silně kořeněnou vůni a je ve vodě nerozpustná.

**Použití:** V kosmetice, ve spotřební chemii a farmacii jako aroma, antimikrobní složka a účinná látka.

## 7.2 Mikroorganismy

Mikroorganismy byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů. Byly zvoleny s ohledem na použité metody a jsou to mikroorganismy, které se v KP často vyskytují.

- ***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

Grampozitivní kok kmene Firmicutes, který se často vyskytuje na kůži a sliznicích. Je to fakultativní anaerob, který způsobuje mírné až těžké záněty a je nebezpečný produkcí enterotoxinů, které napadají a ničí tkáň.

- ***Escherichia coli* CCM 4517**

Gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinka kmene Proteobacteria, která běžně žije na sliznici střeva. Jedná se koliformní bakterii, která je ukazatelem fekálního znečištění. Při výskytu jinde než ve střevě, způsobuje onemocnění.

- ***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

Plíseň patřící do oddělení Ascomycota, běžně se vyskytuje v půdě, na potravinách, na ovoci a zelenině. Při vdechnutí většího množství spor může způsobit aspergilózu.

- ***Candida albicans* CCM 8215**

Kvasinka z oddělení Ascomycota, běžně se vyskytuje na sliznicích a je to podmíněný patogen. Při oslabené imunitě může způsobit kandidózu.

## 7.3 Půdy a chemikálie

- **Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar)** – výrobce Himedia s.r.o.

Kultivační médium o pH 7,3, obsahuje agar 15 g/l, peptidovou směs trypton 15 g/l, sójový pepton 5 g/l a chlorid sodný 5 g/l. Je vhodný pro kultivaci nutričně nenáročných bakterií.

- **Mueller-Hinton Agar** – výrobce Himedia s.r.o.

Mikrobiologické růstové médium, které obsahuje agar 17 g/l, hydrolyzát kaseinu 17,5 g/l, hovězí extrakt 2 g a škrob 1,5 g/l a má neutrální pH. Je vhodné pro testování citlivosti na antibiotika, konkrétně pro diskovou metodu, protože škrob absorbuje toxiny uvolněné z bakterií, které by mohly ovlivnit účinek antimikrobních látek.

- **Mueller-Hinton bujón** – výrobce Himedia s.r.o.

Tekuté médium s obsahem hydrolyzátu kaseinu 17,5 g/l, hovězího extraktu 2 g/l a škrobu 1,5 g/l vhodné pro kultivaci bakterií, stejně jako u agaru, škrob zde pohlcuje toxiny bakterií. Vhodný pro stanovení MIC bakterií.

- **Agar powder** – výrobce Himedia s.r.o.

Základní médium s obsahem agarového prášku k vytvoření kašovitého agaru – slurry agar.

- **Tween-20 (Polysorbát 20)** – výrobce Himedia s.r.o.

Chemickým názvem polyoxyethylenesorbitan monolaurate, používá se jako detergent a emulgátor v laboratorní a farmaceutické praxi.

- **Chlorid sodný** – výrobce Himedia s.r.o

K přípravě fyziologického roztoku (0,9 % NaCl)

#### 7.4 Použité metody

- Disková difúzní metoda
- Modifikovaná difúzní metoda s jamkami v agaru
- Diluční metoda za použití agaru

#### 7.5 Přístroje a zařízení

- Inkubátor Memmert INB 400 53 I
- Laminární box 1200 Alpina
- Přístroj na měření inhibičních zón Scan 500
- Laboratorní váhy Denver Instrument SI-4002
- Analytické váhy Denver Instrument SI-64 A
- Fotometr na měření zákalu suspenze DEN-1 B McFarland Densitometer
- Vortex V-1 plus, BIOSAN

#### 7.6 Pomůcky

- Petriho misky, zkumavky, mikrozksamavky Eppendorf, kličky, kahan, automatické pipety, pipetovací špičky, pinzety, disky z filtračního papíru, vata, kádinky, děrovačka, hokejky, korkovrt.



## 7.7 Disková difúzní metoda

### 7.7.1 Princip metody

Princip metody spočíval v difúzi roztoku konzervační látky o různých koncentracích na agarové plotně a k potlačení růstu mikroorganismů, tedy k vytvoření inhibiční zóny. Na předem připravené agarové plotny se vhodnou živnou půdou byla nanášena suspenze mikroorganismů o požadované stupni zákalu a po zaschnutí suspenze byly aplikovány na povrch ploten papírové disky napuštěné roztokem konzervantu o různých koncentracích. Ihned po aplikaci disků napuštěných konzervantem začala probíhat difúze molekul konzervantu do agaru a došlo k vytvoření dynamicky se měnícího gradientu koncentrace. Každá koncentrace na každý mikroorganismus byla provedena třikrát a výsledky byly průměrovány. Agarové plotny byly inkubovány při různé teplotě a různou dobu podle druhu mikroorganismu. Po stanovené době se na základě účinnosti příslušné koncentrace konzervantů vytvořila nebo naopak nevytvořila kolem papírových disků tzv. inhibiční zóna, tedy oblast, ve které konzervant potlačil mikrobiální růst. Tato zóna byla potom měřena a podle velikosti této zóny byla vyhodnocena účinnost konzervantu. [35,37,38,39,40]

### 7.7.2 Pracovní postup

Difúzní disková metoda byla provedena podle standardu EUCAST. [35]

#### Příprava agarových ploten

Dle návodu bylo připraveno 180 agarových ploten z Mueller-Hintonova agaru. Pro každý mikroorganismus 45 ploten (3 koncentrace pro 5 konzervantů, každý test ve 3 provedeních). Výška agaru na plotnách byla přibližně 4 mm, povrch byl osušený, bez kapek vody.

#### Příprava inokula

Pro difúzní diskovou metodu byly použity mikroorganismy *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis*. Pro přípravu inokula byly bakterie a kvasinky kultivovány před testem 24 hodin a plíseň 96 hodin. Mikrobiální kultury byly odebrány kličkou z plotny, vloženy do fyziologického roztoku, na vortexu promíchány a potom došlo k úpravě suspenze tak, aby byla na fotometru naměřena hodnota 0,5 McFarlandova zákalu.

#### Příprava roztoků konzervantů a disků

Postupným ředěním a výpočtem pomocí směšovací rovnice byly připraveny roztoky všech vybraných vzorků konzervantů o potřebné koncentraci, viz Tabulka 1. U tymiánové silice

byla použita nejnižší výrobcem doporučená koncentrace, protože nepodléhá legislativě o konzervantech a nemá nejvyšší povolenou koncentraci. U silice byl použit jako emulgátor Tween 20 v koncentraci 0,5 %.

Papírové disky byly vyraženy děrovačkou z filtračního papíru a pinzetou jeden po druhém vloženy do připravených roztoků, kde byly minimálně 10 min, aby se dostatečně nasákly roztokem.

Tabulka 1 Příprava roztoků různých koncentrací u diskové difúzní metody

Konzervant	Koncentrace		
	Desetinásobek	Dvojnásobek	Nejvyšší povolená
Benzalkonium chlorid	1,0 %	0,2 %	0,1 %
Bronopol	1,0 %	0,2 %	0,1 %
Phenoxyethanol	10,0 %	2,0 %	1,0 %
Kyselina citronová	2,0 %	0,4 %	0,2 %
Tymiánová silice	5,0 %	1,0 %	0,5 %

### Inokulace agarových ploten

Na plotny, které byly temperovány na laboratorní teplotu, byla vatovým tamponem nanесena připravená suspenze mikroorganismů, a to několika směry, tak aby byla rovnoměrně pokryta celá plocha plotny. Suspenze každého mikroorganismu byla nanесena na 45 agarových ploten a plotny byly řádně označeny podle druhu mikroorganismu.

### Aplikace disků s konzervantem

Po zaschnutí mikrobiální suspenze byly na každou plotnu nanесeny pinzetou 3 papírové disky o průměru 6 mm s 3 různými koncentracemi jednotlivých konzervantů dle Tabulky 1. Tato aplikace disků by měla v ideálním případě nastat do 15 min po zaschnutí suspenze, z důvodu většího množství agarových ploten tato činnost trvala do 60 minut. Misky byly označeny symbolem podle druhu a koncentrace konzervantu.

### Inkubace

Ihned po aplikaci disků byly misky vloženy do inkubátoru dnem dolů, vždy tak, aby na ně mohla rovnoměrně působit teplota. Doba inkubace a teplota byly zvoleny různě podle druhu

mikroorganismu.

Bakterie – 24 hod při 35 °C

Kvasinky – 24 hod při 30 °C

Plísně – 48 hod při 25 °C

### **Měření inhibičních zón**

Po inkubaci byly agarové plotny vloženy do přístroje Scan 500 a byly měřeny inhibiční zóny kolem papírových disků a hodnoty byly zaznamenány. Ze tří měření byla spočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka a průměry tří koncentrací u každého mikroorganismu byly zpracovány do tabulek a grafů.

## **7.8 Modifikovaná difúzní metoda**

### **7.8.1 Princip metody**

U modifikované difúzní metody byl princip stejný, jako u diskové difúzní metody, tedy difúze roztoku o určité koncentraci konzervantu na agarové plotně s mikroorganismem. Provedení se lišilo v tom, že mikrobiální suspenze nebyla roztírána na agarovou plotnu, ale byla přimíchána do agaru a ponechána ztuhnout. Poté byly na plotnách vytvořeny korkovrtem jamky do agaru a ty byly vyplněny směsí roztoku konzervantu a slurry agaru. Plotny byly stejně jako u diskové metody dány ke kultivaci, doba a teplota byla určena typem mikroorganismu. Inhibiční zóny byly vyhodnoceny stejným způsobem jako u diskové metody. [38]

### **7.8.2 Pracovní postup**

Metoda byla inspirována diplomovou prací [37] a byla upravena pro potřeby laboratoře.

#### **Příprava inokula**

Bylo připraveno inokulum ze stejných mikroorganismů a stejným způsobem jako u diskové metody.

#### **Příprava agarových ploten**

Podle návodu byl připraven Mueller-Hinton agar v množství na 120 ploten, pro každý mikroorganismus 30 ploten (na 5 konzervantů o 2 koncentracích a každý test ve 3 provedeních). Do každé čtvrtiny agaru byla přimíchána bakteriální suspenze od každého mikroorganismu v množství 1 ml na 1 agarovou plotnu a agar byl nalit na Petriho misky

a ponechán ztuhnout. Misky byly řádně označeny a po ztuhnutí byly vytvořeny do každé plotny korkovrtem dvě jamky o průměru 9 mm.

### Příprava roztoku se slurry agarem

Z roztoku konzervantů o nejvyšší povolené koncentraci byly připraveny pracovní roztoky, které obsahovaly 20 % slurry agaru a vznikly koncentrace konzervantů uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2 Příprava roztoků o potřebných koncentracích pro modifikovanou difúzní metodu

Konzervant	Koncentrace	
	Nejvyšší povolená konc.	Běžně používaná konc.
Benzalkonium chlorid	0,10 %	0,02 %
Bronopol	0,10 %	0,02 %
Phenoxyethanol	1,00 %	0,40 %
Kyselina citronová	0,20 %	0,10 %
Thymianová silice	0,50 %	0,10 %

### Nanesení roztoku konzervantu na agarové plotny a inkubace

Plotny byly temperovány při laboratorní teplotě a směs roztoku konzervantu a slurry agaru byla napipetována do vytvořených jamek v agaru, misky byly vloženy dnem dolů do inkubátoru. Inkubace proběhla za stejných podmínek jako u diskové metody.

### Měření a hodnocení inhibičních zón

Stejně jako u diskové metody byly po inkubaci agarové plotny vloženy do přístroje Scan 500 a byly měřeny inhibiční zóny kolem vyplněných jamek v agaru a hodnoty byly zaznamenány. Ze tří měření byla spočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka a průměry dvou koncentrací u každého mikroorganismu byly zpracovány do tabulek a grafů.

## 7.9 Diluční metoda

### 7.9.1 Princip metody

Principem této metody bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tj. nejnižší koncentrace konzervantu, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. MIC se obvykle uvádí v mg/ml, případně v µg/ml [38]

Metody byla aplikována za použití agaru, kdy byly přimíchány roztoky s konzervantem o určité koncentraci do bakteriální suspenze o hodnotě zákalu  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml a po inkubaci byly směsi rozetřeny na agarové plotny. Agarové plotny byly poté ponechány v inkubátoru po určitou dobu při vhodné teplotě. Poté byla vyhodnocena koncentrace, při které nedošlo k viditelnému nárůstu mikroorganismů. [38,41,42, 43,44]

### 7.9.2 Pracovní postup

U diluční metody byly použity bakterie *E. coli* a *Staphylococcus aureus* a diluční metoda byla provedena dle článku [43].

#### Příprava agarových ploten

Podle návodu byly připraveny agarové plotny z TSA agaru v počtu 240 ploten, pro každý mikroorganismus 120 ploten.

#### Příprava zásobních roztoků a bakteriální suspenze

Zásobní roztok byl připraven v koncentraci 128 g konzervantu na 1 ml MHB (Mueller-Hinton bujón). Ze základního zásobního roztoku byly připraveny zásobní roztoky viz Tabulka 3.

Tabulka 3 Příprava zásobních roztoků pro diluční metodu

Koncentrace mg/ml	Základní zásobní roztok [ml]	MHB [ml]	Celkový objem zásobního roztoku [ml]
16	1,5	10,5	12
2	1,5	10,5	12
0,25	1,5	10,5	12

Mikrobiální kultury byly odebrány kličkou z plotny, vloženy do fyziologického roztoku, na vortexu promíchány a potom došlo úpravě suspenze tak, aby byla na fotometru naměřena hodnota 0,5 McFarlandova zákalu, což odpovídá koncentraci  $2-3 \cdot 10^8$ . Následně byly suspenze naředěny na požadovanou koncentraci  $5 \cdot 10^5$ .

Ze zásobních roztoků byla připravena koncentrační řada 12 ředění. Podle Tabulky 4 byly připraveny směsi roztoků o různé koncentraci konzervantů a bakteriálních suspenzí. Jednotlivé zkumavky se směsí byly řádně označeny podle druhu mikroorganismu a koncentrace konzervantu a byly inkubovány 24 hodin při teplotě 35 °C.

### **Inokulace agarových ploten roztokem s bakteriální suspenzí**

Po inkubaci bylo na temperované agarové plotny napipetováno 100 $\mu$ l od každé koncentrace roztoku s bakteriální suspenzí a směs byla hokejkami důkladně rozetřena po celé ploše agaru, viz Obrázek 32. Každý vzorek byl proveden dvakrát, agarové plotny byly označeny ředěním konzervantu a druhem mikroorganismu a opět byly dány do inkubátoru na 24 hod při teplotě 35 °C.



Obrázek 32 Laminární box připravený k pipetování a roztěru roztoku konzervantu a bakteriální suspenze

Tabulka 4 Příprava koncentrační řady roztoků konzervantu a bakteriální suspenze pro diluční metodu

Koncentrace mg/ml	Zásobní roztok [ml]	MHB [ml]	Bakteriální suspenze [ml]	Roztok konzervantu koncentrační řady a bakter. suspenze [ml]
64	2	-	2	4
32	1	1	2	4
16	0,5	1,5	2	4
8	2	-	2	4
4	1	1	2	4
2	0,5	1,5	2	4
1	2	-	2	4
0,5	1	1	2	4
0,25	0,5	1,5	2	4
0,125	2	-	2	4
0,06	1	1	2	4
0,03	0,5	1,5	2	4

#### Vyhodnocení mikrobiálního růstu na agarových plotnách a stanovení MIC

Po inkubaci byl vyhodnocen růst bakterií podle počtu kolonií nebo podle typu růstu a nulou byly označeny plotny s nejnižší koncentrací, kde nedošlo k viditelnému nárůstu bakterií. Nejnižší koncentrace konzervantu bez viditelného růstu byly zaznamenány jako minimální inhibiční koncentrace. Hodnoty byly zpracovány do tabulek a grafu.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1 Disková difúzní metoda

V této metodě byly měřeny šířky inhibičních zón s cílem zjistit účinek konzervačních přísad na testované mikroorganismy. Vytvořená zóna prokazovala inhibiční efekt konzervantu na mikroorganismus. Naopak, nevytvoření zóny prokázalo necitlivost mikroorganismu vůči dané koncentraci konzervantu.

#### 8.1.1 Výpočet inhibičních zón

Měřením inhibičních zón v přístroji SCAN 500 byly zjištěny hodnoty inhibiční zóny průměru kruhu včetně papírového disku. Šířka zón byla vypočítána podle následujícího vztahu (1).

**Ukázka výpočtu: (1)**

$$\text{Inhibiční zóna v [mm]} = \frac{\text{Naměřená zóna v přístroji} - \text{šířka disku}}{2}$$

Pro každý konzervant a mikroorganismus byla provedena 3 měření, ze kterých byla spočítána průměrná šířka inhibiční zóny se směrodatnou odchylkou. Všechny hodnoty byly zpracovány do tabulek a grafů viz níže.

#### 8.1.2 Vyhodnocení inhibičních zón

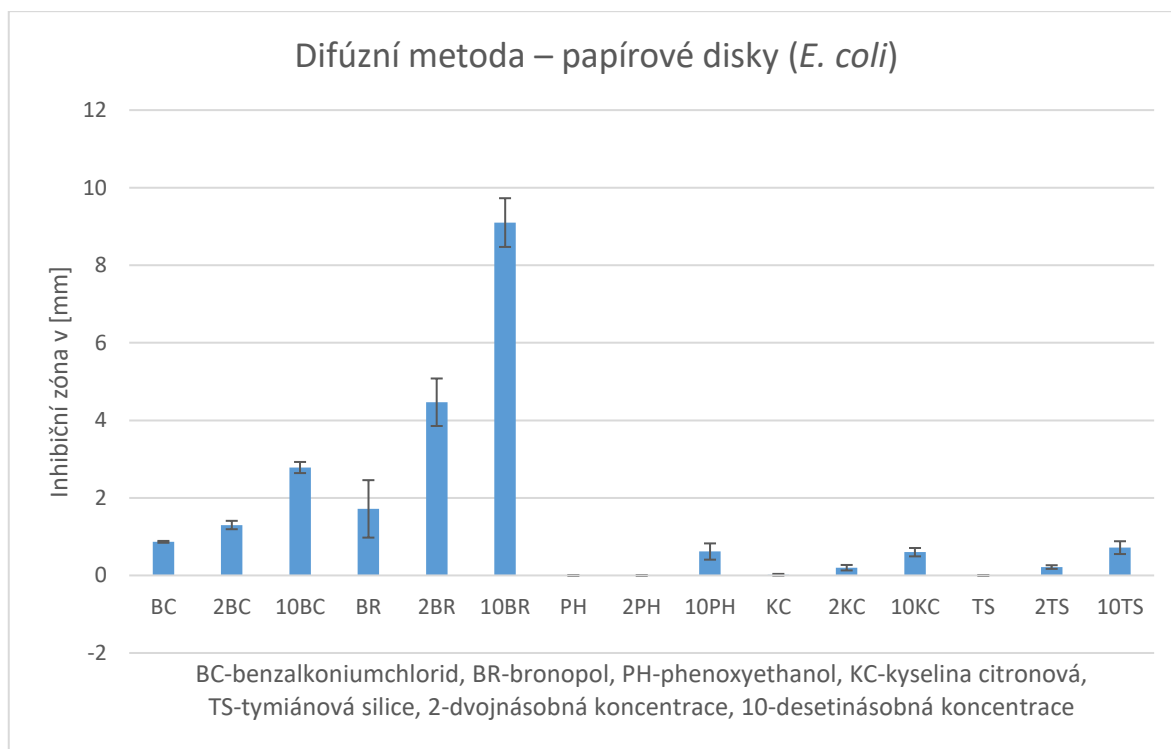
##### *E. coli*

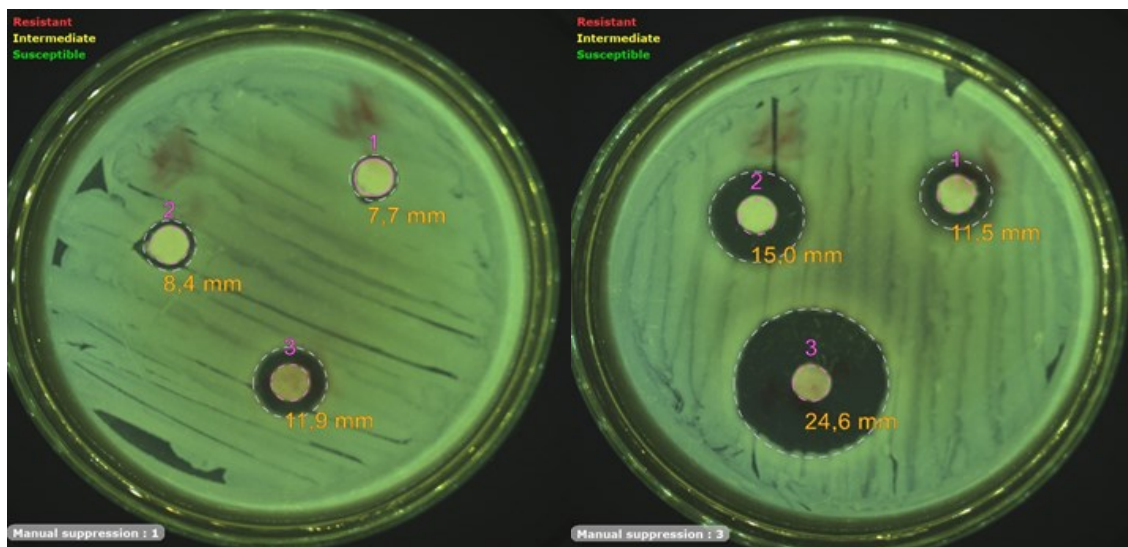
U *E. coli* způsobily nejširší inhibiční zóny benzalkonium chlorid a bronopol, a to i v té nejnižší koncentraci. Velmi mírný účinek ve všech koncentracích prokázala kyselina citronová, phenoxyethanol účinkoval pouze v nejvyšší koncentraci a tymiánová silice ve dvou vyšších koncentracích, viz Tabulka 5, Obrázky 32, 33, 36.



Tabulka 5 Inhibiční zóny u *E. coli* – disková difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibiční zóny v mm ± směrodatná odchylka		
	Nejvyšší povolená koncentrace	Dvojnásobek nejvyšší povolené koncentrace	Desetinásobek nejvyšší povolené koncentrace
Benzalkonium chlorid	0,87 ± 0,02	1,30 ± 0,11	2,80 ± 0,14
Bronopol	1,70 ± 0,74	4,50 ± 0,61	9,10 ± 0,63
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,21
Kyselina citronová	0,02 ± 0,02	0,20 ± 0,07	0,60 ± 0,11
Tymiánová silice	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,05	0,72 ± 0,16

Obrázek 33 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *E. coli* na koncentraci jednotlivých konzervantů u diskové difúzní metody



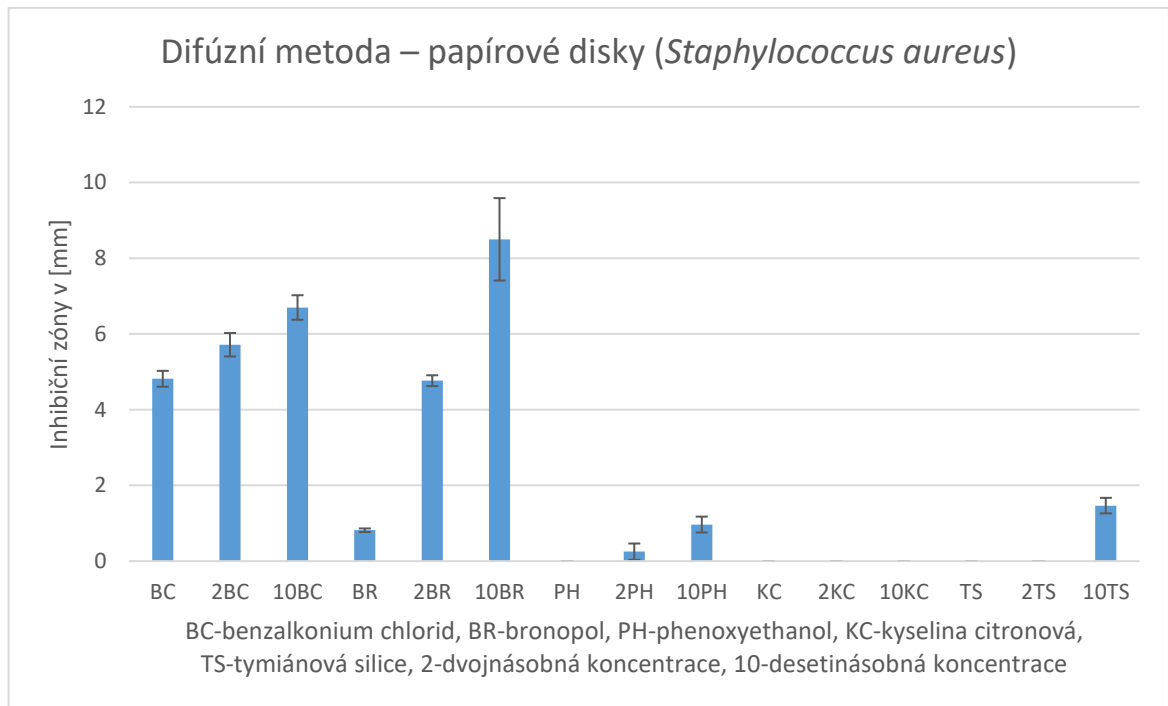
Obrázek 34 Inhibiční zóny u *E. coli*, benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo), nejvyšší povolená, dvojnásobná a desetinásobná koncentrace – disková difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)

### *Staphylococcus aureus*

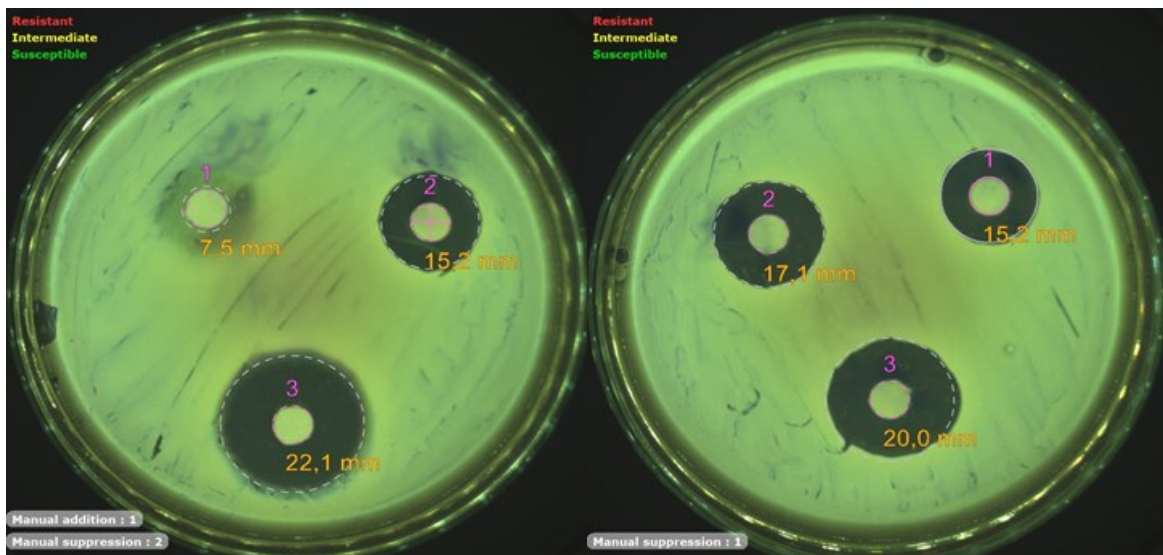
U *Staphylococcus aureus* vznikly nejširší inhibiční zóny opět u benzalkonium chloridu a bronopolu, a to ve všech koncentracích, i když bronopol vytvořil v nejnižší koncentraci pouze projasněnou zónu, která byla počítána. Phenoxyethanol inhiboval jen mírně ve dvou vyšších koncentracích, tymiánová silice pouze v nejvyšší koncentraci a kyselina citronová vůbec, viz Tabulka 6, Obrázky 34, 35, 36.

Tabulka 6 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus* – disková difúzní metoda

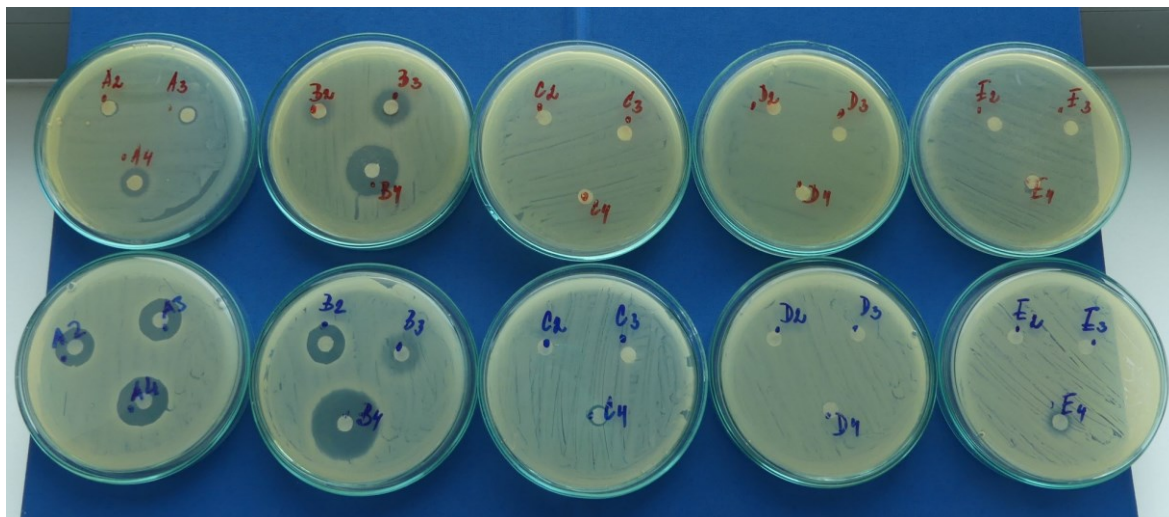
Druh konzervantu	Šířka inhibiční zóny v mm ± směrodatná odchylka		
	Nejvyšší povolená koncentrace	Dvojnásobek nejvyšší povolené koncentrace	Desetinásobek nejvyšší povolené koncentrace
Benzalkonium chlorid	4,82 ± 0,21	5,72 ± 0,31	6,70 ± 0,32
Bronopol	0,82 ± 0,05	4,77 ± 0,14	8,50 ± 1,09
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,22	0,97 ± 0,21
Kyselina citronová	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,47 ± 0,21



Obrázek 35 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Staphylococcus aureus* na koncentraci jednotlivých konzervantů u diskové difúzní metody



Obrázek 36 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus*, benzalkonium chlorid (vlevo), bronopol (vpravo), nejvyšší povolená (s projasněnou zónou u benzalkonium chloridu), dvojnásobná a desetinásobná koncentrace – disková difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)



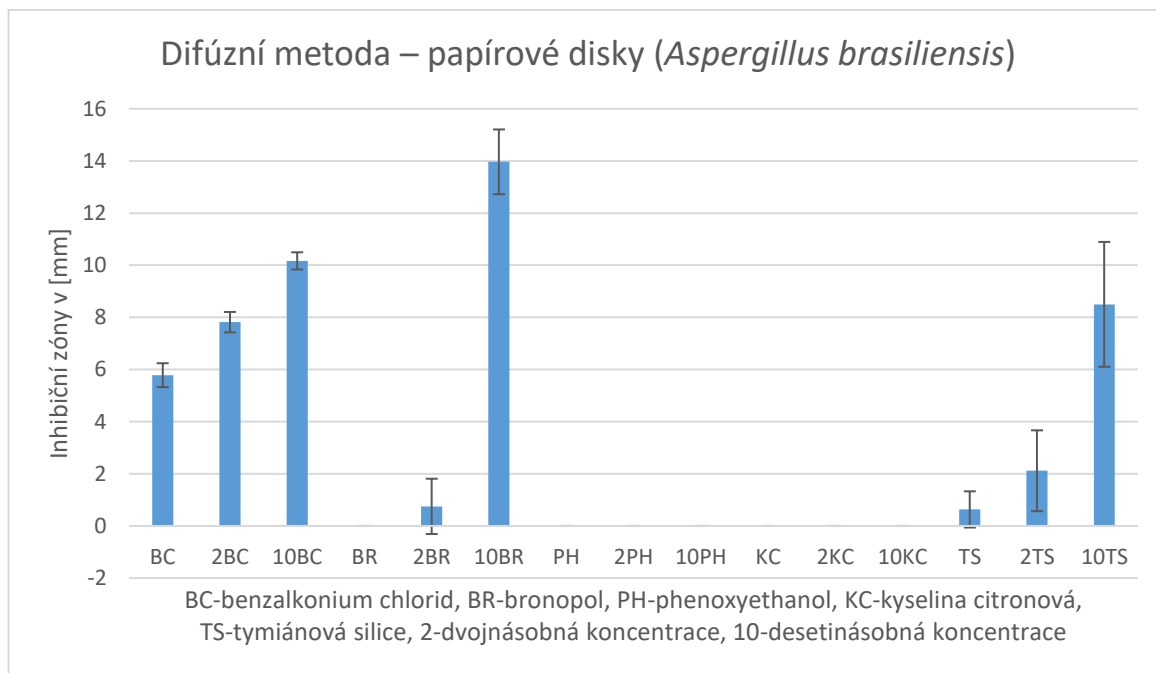
Obrázek 37 Inhibiční zóny u *E. coli* (nahore) a *Staphylococcus aureus* (dole) – disková difúzní metoda (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

### *Aspergillus brasiliensis*

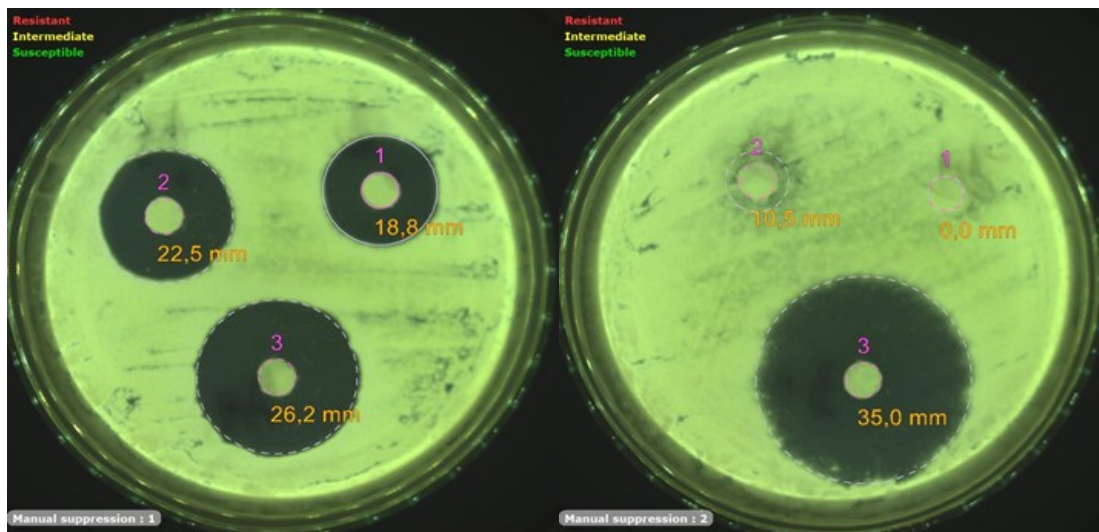
U *Aspergillus brasiliensis* vytvořil benzalkonium chlorid inhibiční zóny ve všech koncentracích, nejširší inhibiční zóna vznikla u nejvyšší koncentrace bronopolu, u dvojnásobné koncentrace byla nepatrná zóna a u nejvyšší povolené žádná. Phenoxyethanol a kyselina citronová neprokázaly žádný účinek a tymiánová silice působila významně ve všech koncentracích, viz Tabulka 7, Obrázky 37, 38, 41.

Tabulka 7 Inhibiční zóny u *Asperillus brasiliensis* – disková difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibiční zóny v mm ± směrodatná odchylka		
	Nejvyšší povolená koncentrace	Dvojnásobek nejvyšší povolené koncentrace	Desetinásobek nejvyšší povolené koncentrace
Benzalkonium chlorid	5,78 ± 0,46	7,82 ± 0,40	10,17 ± 0,33
Bronopol	0,00 ± 0,00	0,75 ± 1,10	13,97 ± 1,24
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina citronová	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	0,63 ± 0,70	2,12 ± 1,60	8,50 ± 2,40



Obrázek 38 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Aspergillus brasiliensis* na koncentraci jednotlivých konzervantů u diskové difúzní metody



Obrázek 39 Inhibiční zóny u *Aspergillus brasiliensis*, benzalkonium chlorid (vlevo), bronopol (vpravo), nejvyšší povolená, dvojnásobná a desetinásobná koncentrace – disková difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)

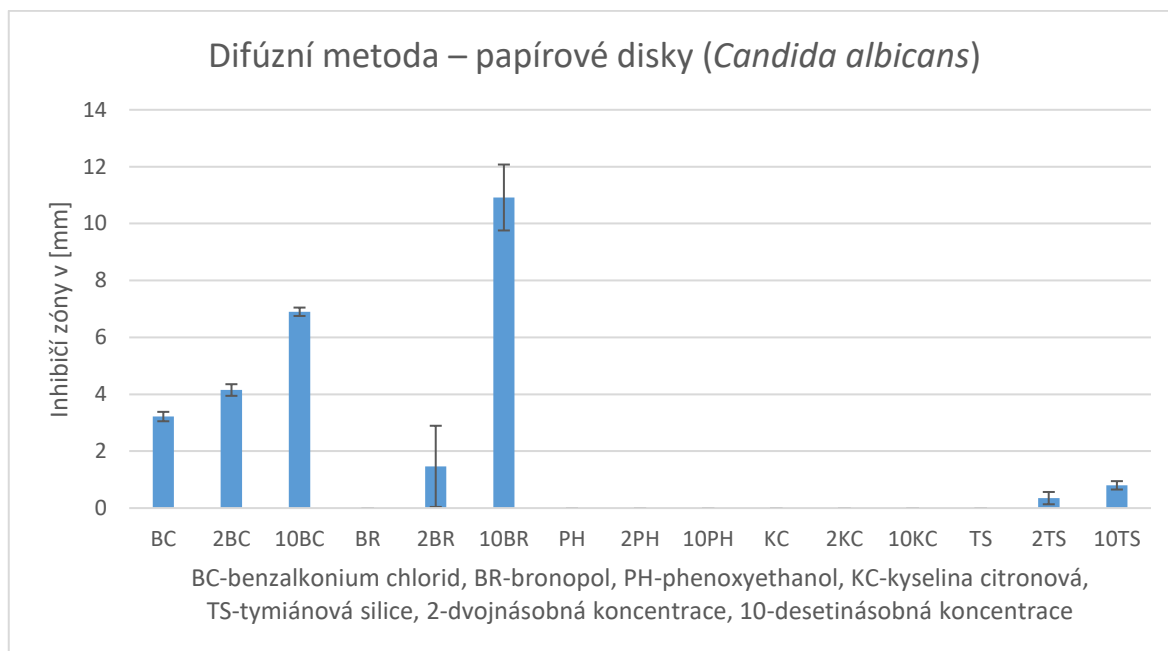
### *Candida albicans*

Na *Candida albicans* působil benzalkonium chlorid a bronopol vytvořením podobných zón jako na *Aspergillus brasiliensis*, i tady byla nejvyšší povolená koncentrace bronopolu bez

zóny, ale v tomto případě bylo výrazně nižší působení tymiánové silice, slabší zóny se vytvořily pouze ve dvou vyšších koncentracích. Kyselina citronová a phenoxyethanol nepůsobily vůbec, viz Tabulka 8, Obrázky 39, 40, 41.

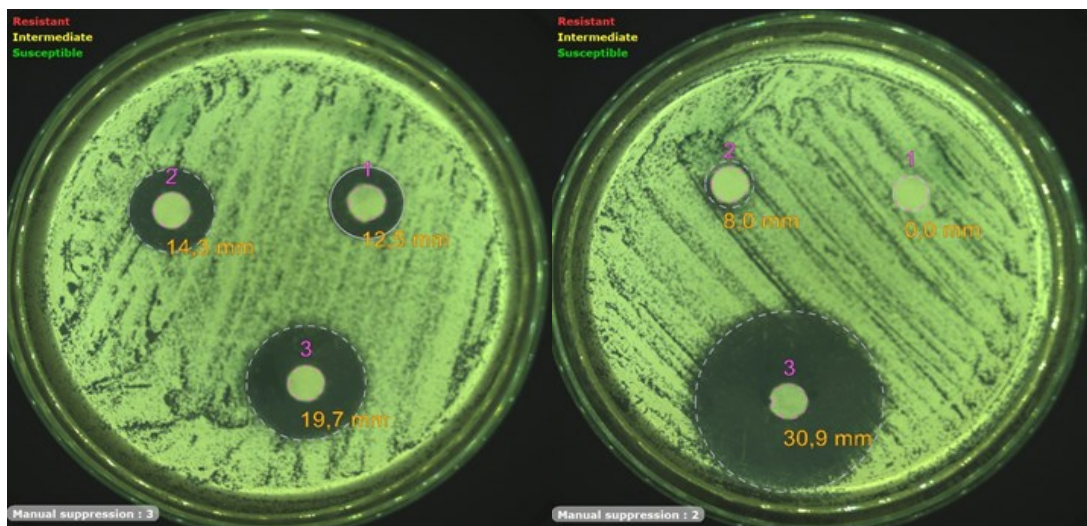
Tabulka 8 Inhibiční zóny u *Candida albicans* – disková difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibiční zóny v mm $\pm$ směrodatná odchylka		
	Nejvyšší povolená koncentrace	Dvojnásobek nejvyšší povolené koncentrace	Desetinásobek nejvyšší povolené koncentrace
Benzalkonium chlorid	3,22 $\pm$ 1,60	4,15 $\pm$ 0,20	6,90 $\pm$ 0,15
Bronopol	0,00 $\pm$ 0,00	1,47 $\pm$ 1,43	10,92 $\pm$ 1,16
Phenoxyethanol	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Kyselina citronová	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Tymiánová silice	0,00 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,22	0,80 $\pm$ 0,15

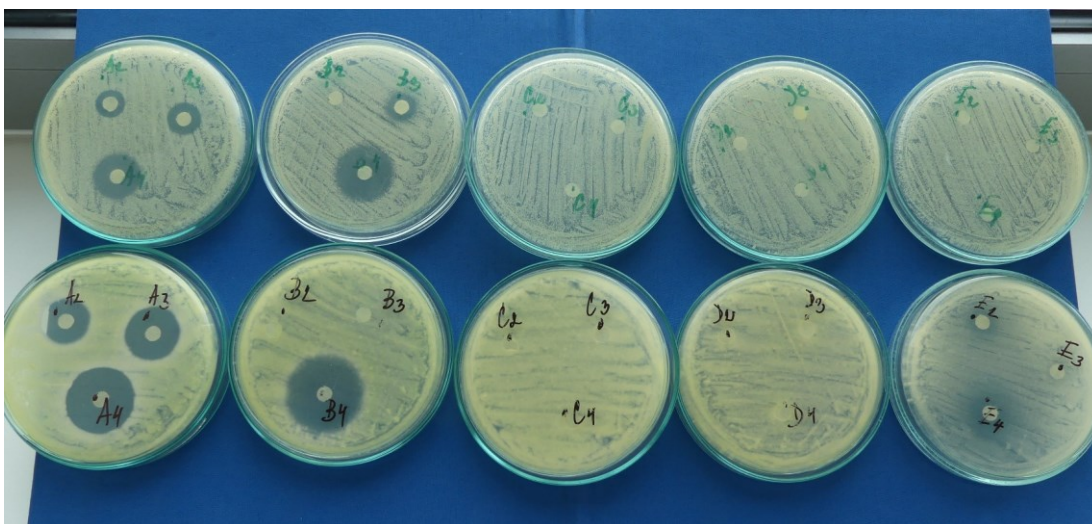


Obrázek 40 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Candida albicans* na koncentraci jednotlivých konzervantů u diskové difúzní metody





Obrázek 41 Inhibiční zóny u *Candida albicans*, benzalkonium chlorid (vlevo), bronopol (vpravo), nejvyšší povolená, dvojnásobná, desetinásobná koncentrace – disková difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)



Obrázek 42 Inhibiční zóny u *Candida albicans* (nahore) a *Aspergillus brasiliensis* (dole) – disková difúzní metoda (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

## 8.2 Modifikovaná difúzní metoda

Stejně jako u diskové metody bylo cílem měření vytvořených inhibičních zón a vyhodnocení účinku konzervantu na vybraný mikroorganismus.

### 8.2.1 Výpočet a vyhodnocení měření inhibičních zón

Stejně jako u předchozí metody byly po inkubaci agarové plotny vloženy do přístroje Scan 500 a byly měřeny celkové průměry inhibičních zón včetně vyplněných jamek v agaru a stejně jako u difúzní metody byla spočítána šíře inhibiční zóny, s tím rozdílem že jamky v agaru měly na rozdíl od 6 mm papírových disků průměr 9 mm. U modifikované difúzní metody byly použity nižší koncentrace konzervantů, nejvyšší povolená a běžně používaná, která je výrazně nižší a od toho se odvíjely i rozměry inhibičních zón.

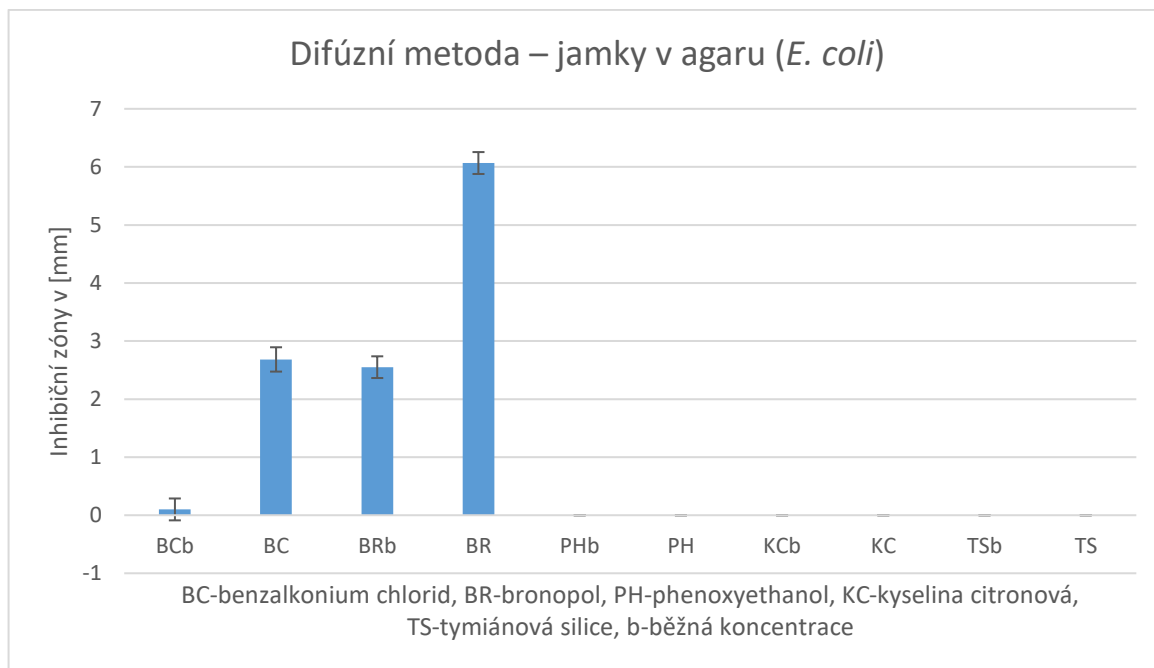
#### *E. coli*

U *E. coli* vytvořila běžně používaná koncentrace u benzalkonium chloridu nepatrnou zónu a výraznou zónu nejvyšší povolená koncentrace. U bronopolu vznikly u obou koncentrací výrazné inhibiční zóny. Ostatní konzervanty nevytvořily ani v jedné koncentraci žádnou zónu, viz Tabulka 9, Obrázky 42, 43, 46.

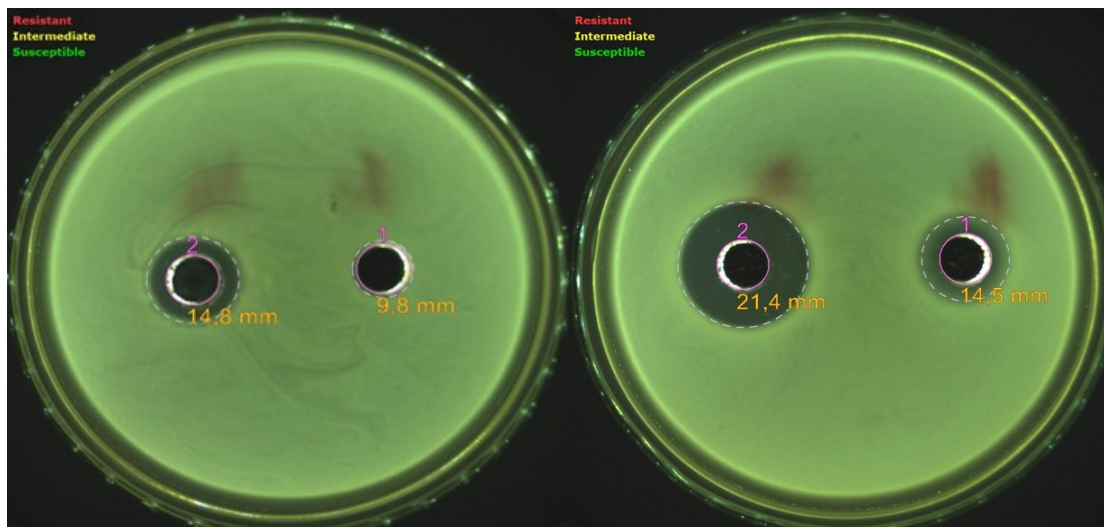
Tabulka 9 Inhibiční zóny u *E. coli* – modifikovaná difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka	
	Nejvyšší povolená koncentrace	Běžně používaná koncentrace
Benzalkonium chlorid	2,70 ± 0,21	0,10 ± 0,19
Bronopol	6,07 ± 0,19	2,55 ± 0,19
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina citronová	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00





Obrázek 43 Graf závislosti inhibičních zón u *E. coli* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody



Obrázek 44 Inhibiční zóny u *E. coli*, benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo), nejvyšší povolená a běžná koncentrace – modifikovaná difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)

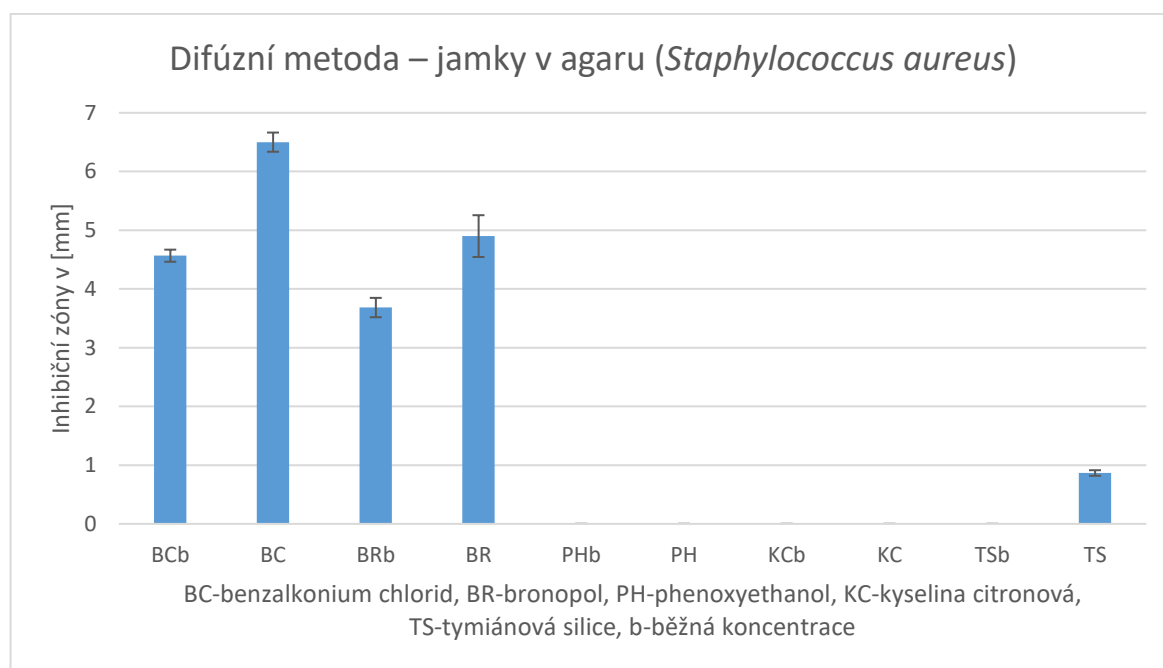
### *Staphylococcus aureus*

Benzalkonium chlorid a bronopol působily významně na *Staphylococcus aureus* v obou koncentracích, u bronopolu vytvořila nižší koncentrace pouze světlou zónu, která byla uvedena v tabulce a ve vyšší koncentraci je v tabulce uvedena ohraničená zóna bez

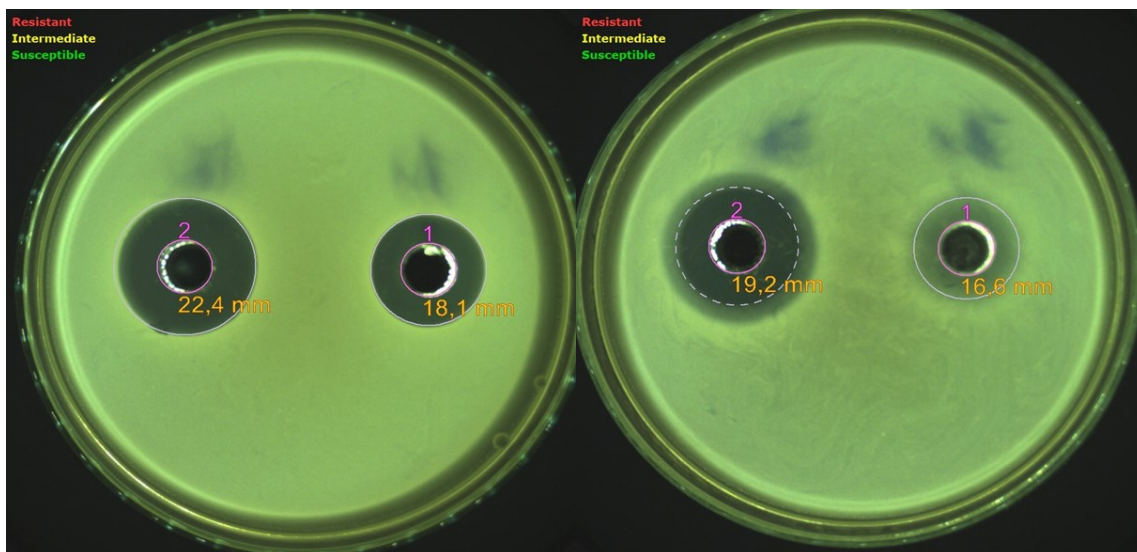
projasnění, včetně projasnění byla zóna široká 7,72 mm. Z ostatních konzervantů působila inhibičně pouze tymiánová silice v doporučené koncentraci, viz Tabulka 10, Obrázky 44, 45, 46.

Tabulka č 10 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus* – modifikovaná difúzní metoda

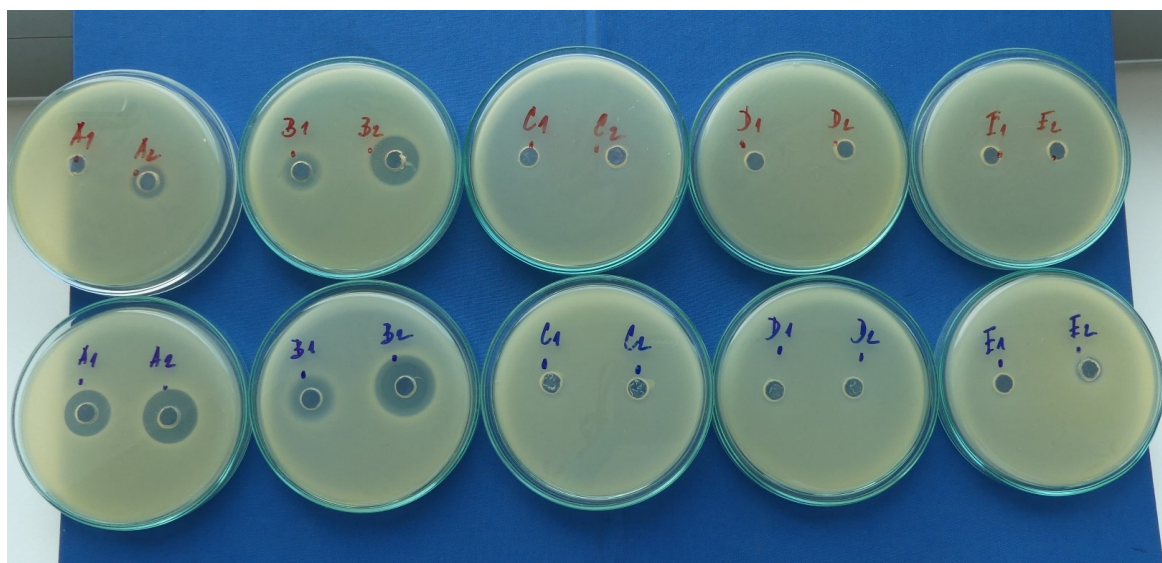
Druh konzervantu	Šířka inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka	
	Nejvyšší povolená koncentrace	Běžně používaná koncentrace
Benzalkonium chlorid	6,50 ± 0,16	4,57 ± 0,16
Bronopol	4,90 ± 0,36	3,68 ± 0,08
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina citronová	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	0,87 ± 0,05	0,00 ± 0,00



Obrázek 45 Graf závislosti inhibičních zón u *Staphylococcus aureus* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody



Obrázek 46 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus*, benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo) s projasněnými zónami, nejvyšší povolená a běžná koncentrace – modifikovaná difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)



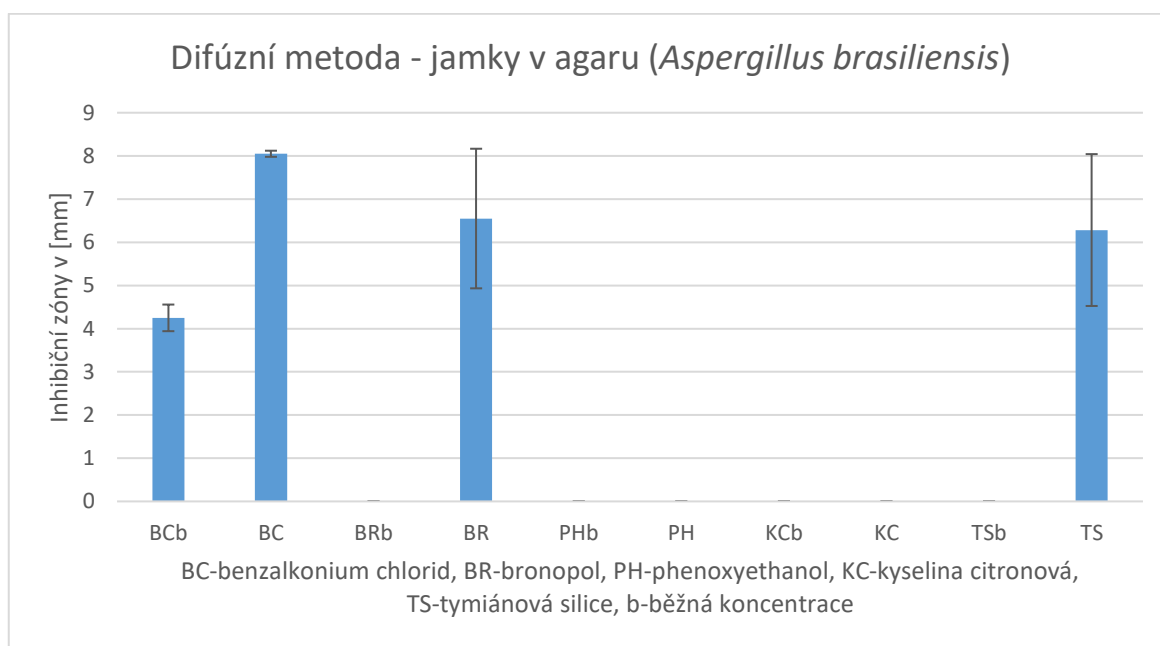
Obrázek 47 Inhibiční zóny u *E. coli* (nahore) a *Staphylococcus aureus* (dole) – modifikovaná difúzní metoda (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

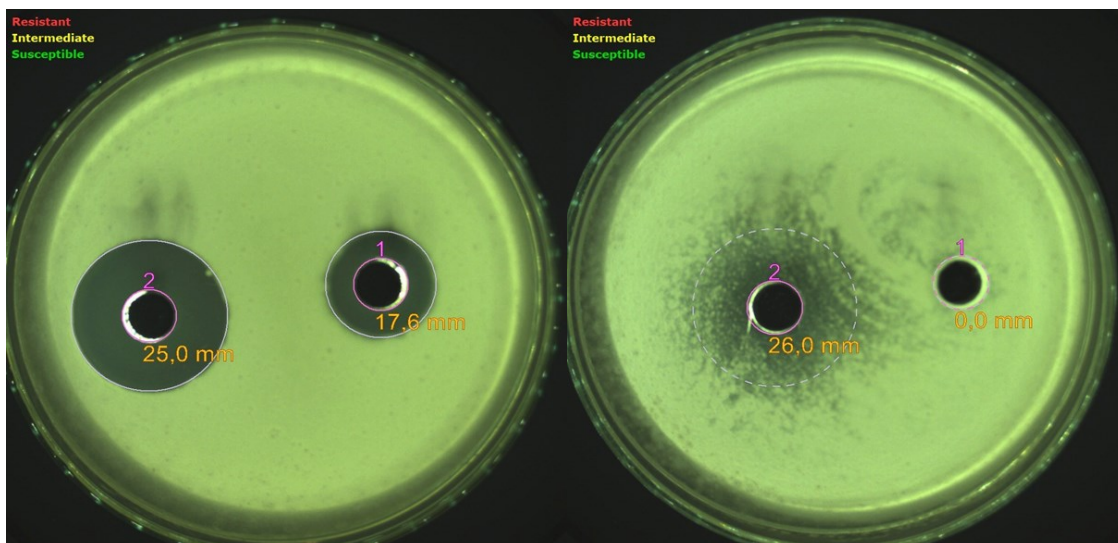
### *Aspergillus brasiliensis*

Na *Asperillus brasiliensis* nejúčinněji působil benzalkonium chlorid v obou koncentracích, dále bronopol v nejvyšší povolené koncentraci a tymiánová silice v doporučené koncentraci vytvořila neohrazenou projasněnou zónu, která byla zahrnuta do hodnocení. Ostatní konzervanty v této metodě neprokázaly účinek, viz Tabulka 11, Obrázky 47, 48, 51.

Tabulka 11 Inhibiční zóny u *Aspergillus brasiliensis* – modifikovaná difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka	
	Nejvyšší povolená koncentrace	Běžně používaná koncentrace
Benzalkonium chlorid	8,05 ± 0,07	4,25 ± 0,31
Bronopol	6,55 ± 0,62	0,00 ± 0,00
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina citronová	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	6,28 ± 1,76	0,00 ± 0,00

Obrázek 48 Graf závislosti inhibičních zón u *Aspergillus brasiliensis* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody



Obrázek 49 Inhibiční zóny u *Aspergillus brasiliensis*, benzalkonium chlorid (vlevo) a tymiánová silice (vpravo) s projasněnou zónou, nejvyšší povolená a běžná koncentrace – modifikovaná difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)

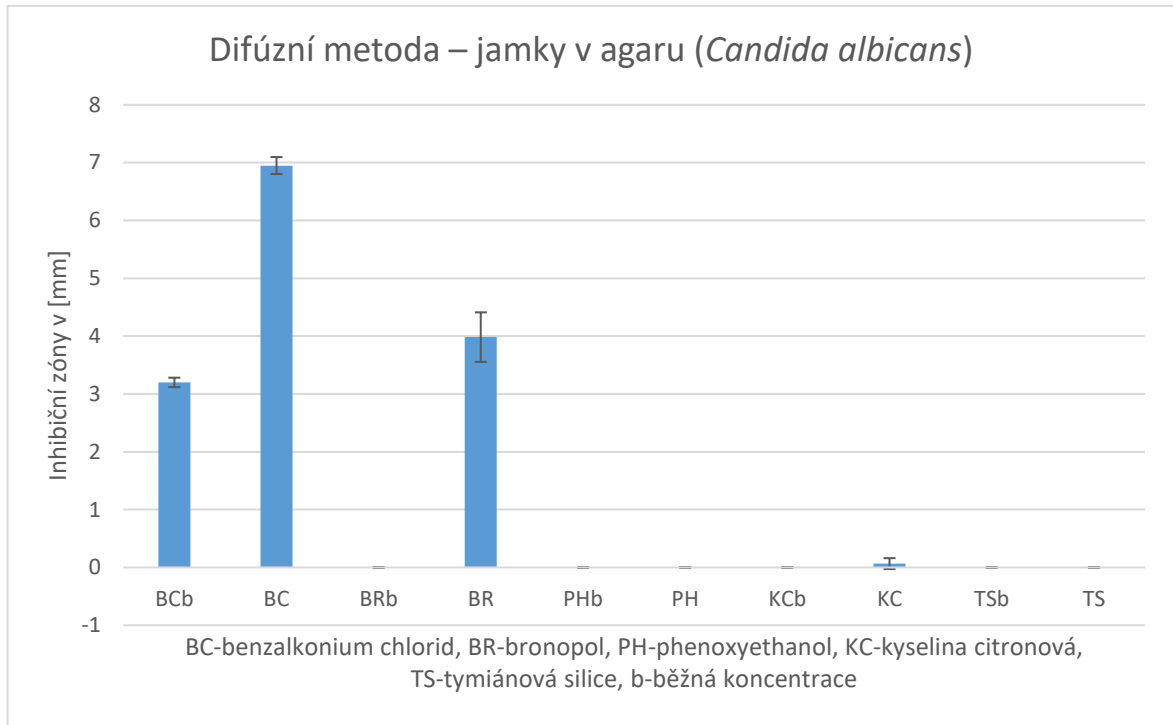
### *Candida albicans*

Benzalkonium chlorid a bronopol působily na *Candidu albicans* podobně jako na plíseň, viz Obr. 50, tymiánová silice zde neměla vůbec žádný účinek, stejně jako phenoxyethanol. Velmi nepatrnou zónu vytvořila kyselina citronová v nejvyšší povolené koncentraci, viz Tabulka 12, Obrázky 49, 50, 51.

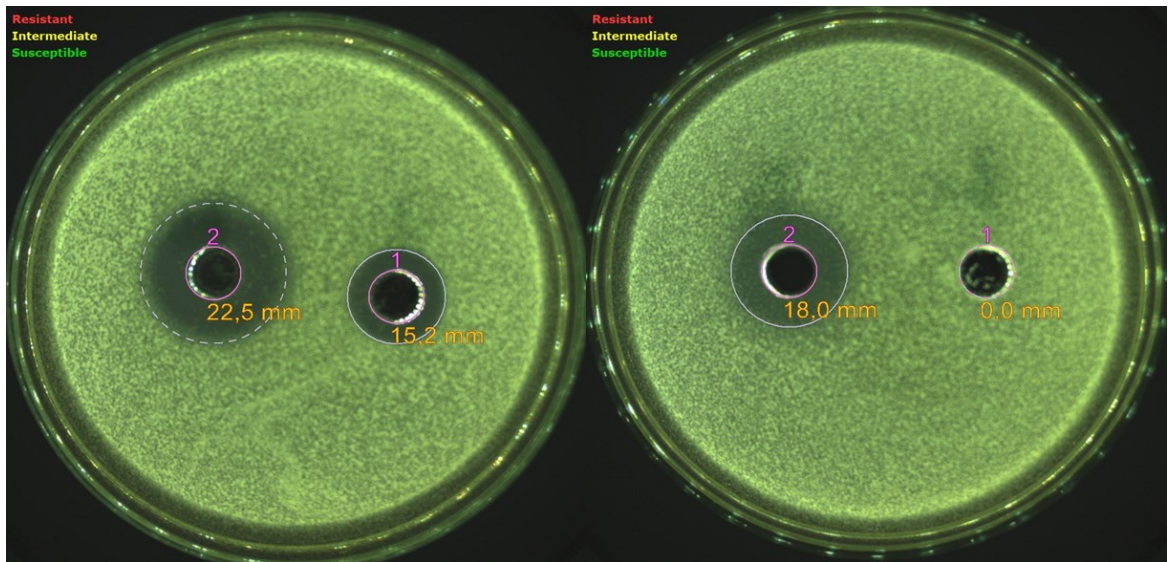
Tabulka 12 Inhibiční zóny u *Candida albicans* – modifikovaná difúzní metoda

Druh konzervantu	Šířka inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka	
	Nejvyšší povolená koncentrace	Běžně používaná koncentrace
Benzalkonium chlorid	6,95 ± 0,15	3,20 ± 0,08
Bronopol	3,98 ± 0,43	0,00 ± 0,00
Phenoxyethanol	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina citronová	0,07 ± 0,09	0,00 ± 0,00
Tymiánová silice	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

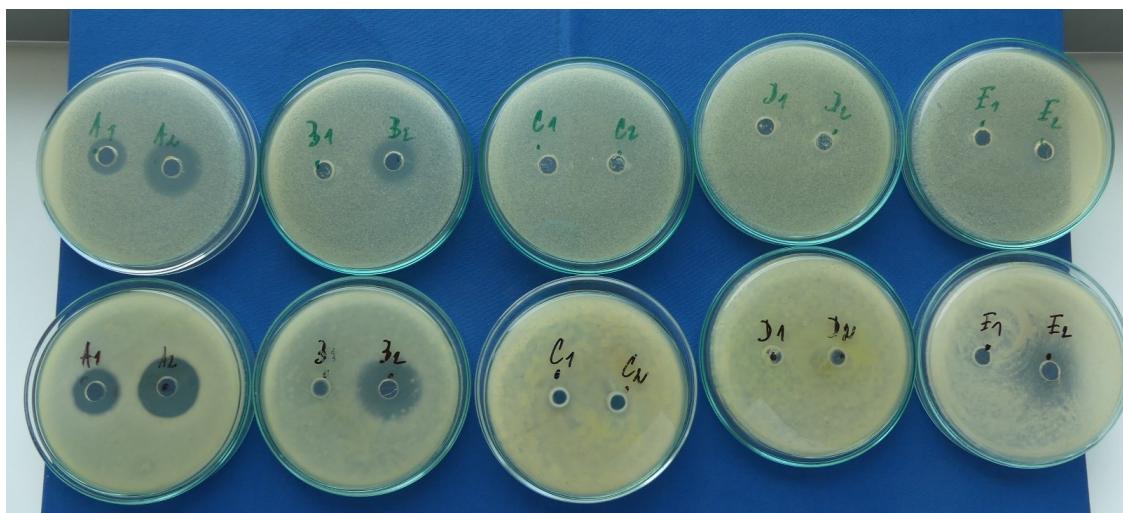




Obrázek 50 Graf závislosti závislost inhibičních zón u *Candida albicans* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody



Obrázek 51 Inhibiční zóny u *Candida albicans*, benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo), nejvyšší povolená a běžná koncentrace – modifikovaná difúzní metoda (analýza přístrojem SCAN 500)



Obrázek 52 Inhibiční zóny u *Candida albicans* (nahore) a *Aspergillus brasiliensis* (dole) – modifikovaná difúzní metoda (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

### 8.3 Diluční metoda stanovení MIC

U diluční metody byly použity bakterie *E. coli* a *Staphylococcus aureus*. Záměrem metody bylo stanovení MIC pěti testovaných konzervantů u výše uvedených bakterií.

#### 8.3.1 Vyhodnocení mikrobiálního růstu na agarových plotnách a stanovení MIC

Po inkubaci byl vyhodnocen růst bakterií podle počtu kolonií nebo podle typu růstu a nulou byly označeny plotny s nejnižší koncentrací, kde nedošlo k viditelnému nárůstu bakterií, viz Tabulka 13. Koncentrace konzervantu na těchto plotnách bez viditelného růstu byly zaznamenány jako MIC. Při diluční metodě stanovení MIC vykazoval nejvyšší účinek (nejnižší hodnota MIC) benzalkonium chlorid a bronopol, nejnižší účinek (nejvyšší hodnota MIC) phenoxyethanol, viz Tabulka 14.

Tabulka 13 Vyhodnocení růstu bakterií v diluční metodě

Konc. mg/ml	BC		BR		PH		KC		TS	
	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>
64										
32										
16					0	0	0			
8					***	*	*	0		
4					****	*****	***	*****		
2					*****		***	*****		
1							***		0	
0,5							*****		*	0
0,25			0				*****		**	*****
0,125			**	0					*****	
0,06			***	***					*****	
0,03	0	0	***	***						

BC – benzalkoniumchlorid, BR – bronopol, PH – phenoxyethanol, KC – kyselina citronová, TS – tymiánová silice, *S.a.* – *Staphylococcus aureus*, *E.c.* – *Escherichia coli*

\* jednotky kolonií, \*\* desítky kolonií, \*\*\* stovky kolonií, \*\*\*\* částečně souvislý nárůst, \*\*\*\*\* souvislý nárůst

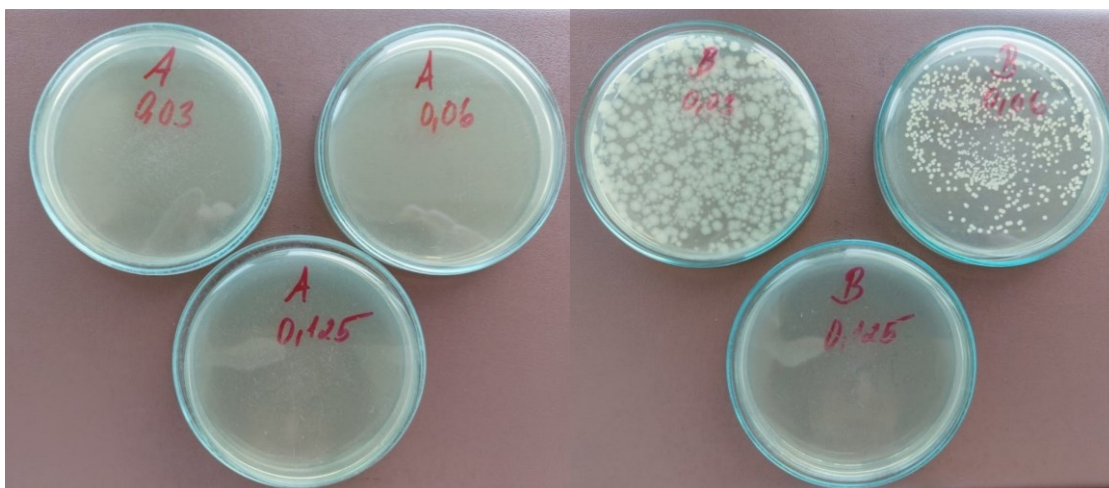
Tabulka 14 Hodnota MIC u jednotlivých koncentrací a mikroorganismů

Konzervant Mikroorganismus	BC		BR		PH		KC		TS	
	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>
MIC [mg/ml]	≤0,03	≤0,03	0,25	0,125	16	16	16	8	1	0,5

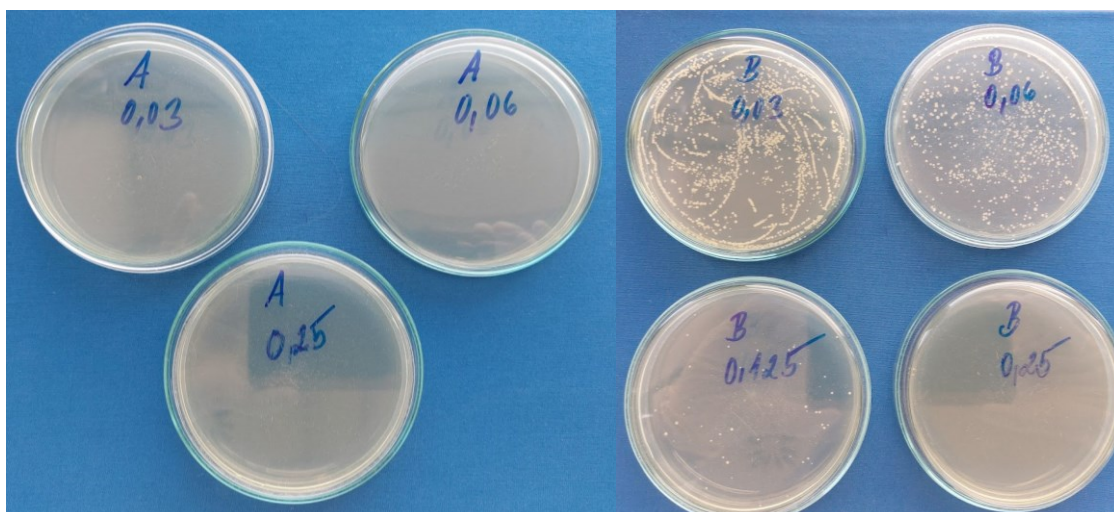


**Benzalkonium chlorid** měl MIC pod hranici detekce použité metody. Ani na nejnižší koncentraci 0,03 mg/ml nebyl zaznamenán žádný růst *E. coli* ani *Staphylococcus aureus*, viz Obrázky 52, 53. El Sayed Zaki a kol. ve své studii (2019) uvádí MIC benzalkonium chloridu u izolátů *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí vůči kvartérním amoniovým sloučeninám vyšší než 0,008 mg/ml při použití mikrodiluční metody, což je v souladu s výsledky provedeného testování. [46]

**Bronopol** měl MIC u *Staphylococcus aureus* 0,25 mg/ml a u *E. coli* 0,125 mg/ml, a u obou bakterií ani v nejnižší koncentraci nevzniknul souvislý nárůst, ale stále byly patrné jednotlivé kolonie, viz. Obrázky 52, 53. Shepherd a kol. uvedli v článku (1988) MIC bronopolu u *E. coli* 0,013 mg/ml, testování proběhlo odlišnou metodikou v tekutém médiu s finálním měřením optické hustoty. [47]



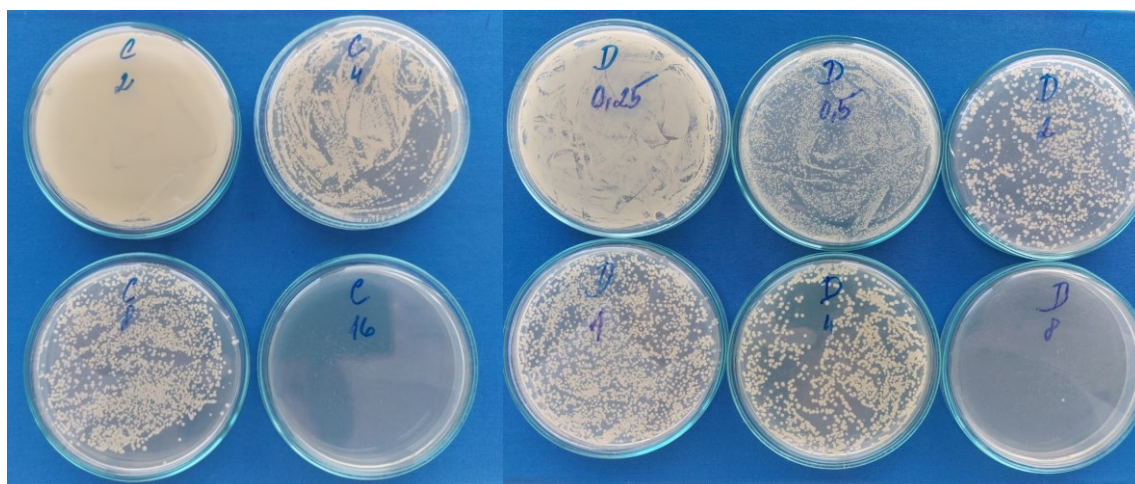
Obrázek 53 Stanovení MIC benzalkonium chloridu (vlevo) a bronopolu (vpravo) u *E. coli*



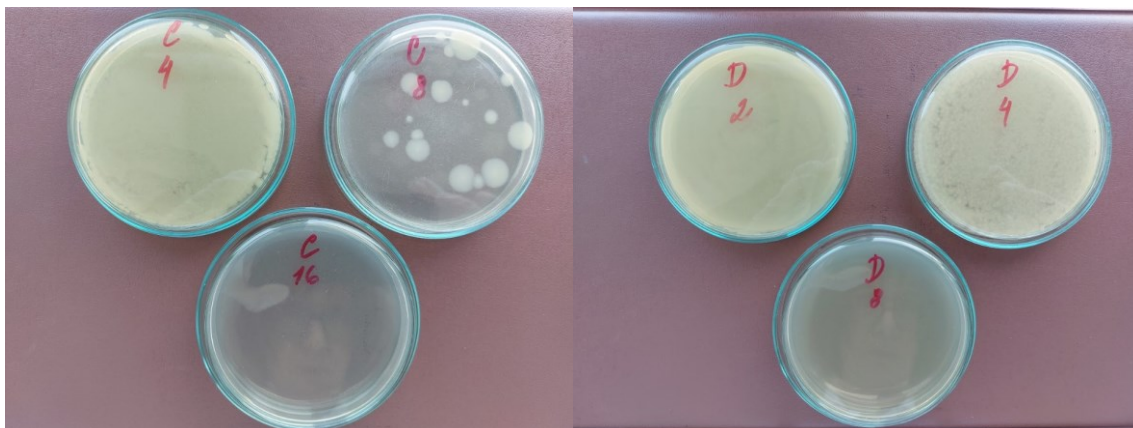
Obrázek 54 Stanovení MIC benzalkonium chloridu (vlevo) a bronopolu (vpravo)  
u *Staphylococcus aureus*

**Phenoxyethanol** viditelně inhiboval růst obou bakterií při hodnotě MIC 16 mg/ml, což byla nejvyšší hodnota MIC u této metody. Snižováním koncentrace postupně přibýval růst bakterií. U *Staphylococcus aureus* došlo při koncentraci 8 mg/ml k prudkému nárůstu kolonií, zatímco u *E. coli* došlo ke vzniku menšího počtu kolonií viz Obrázky 54, 55. Vzhledem k tomu, že u phenoxyethanolu bylo prokázáno jeho synergické působení s jinými konzervanty a snižování jejich účinné koncentrace, dalo se očekávat, že samostatně bude vykazovat nižší účinek. O něco nižší MIC phenoxyethanolu u různých bakterií byla prokázána ve studii, která se zabývala opětovným růstem bakterií po působení antimikrobního činidla. Mezi testovanými mikroorganismy byly *Staphylococcus aureus* a *E. coli* a byla použita diluční metoda a tekuté médium. MIC phenoxyethanolu se při použití zkumavek pohybovala mezi 6–12 mg/ml a při použití mikrotitrační destičky mezi 3–12 mg/ml. [48]

**Kyselina citronová** inhibovala *Staphylococcus aureus* při MIC 16 mg/ml a při koncentraci 0,4 mg/ml už byl patrný nárůst stovek kolonií. MIC u *E. coli* byla stanovena na koncentraci 8 mg/ml a při koncentraci 4 mg/ml již došlo u *E. coli* k velmi hustému růstu kolonií viz Obrázky 54, 55. Eliuz v článku v Science (2020) uvedl při použití mikrodiluční metody MIC kyseliny citronové u *E. coli* a *Staphylococcus aureus* 60 mg/ml. Rozdíl v hodnotách vychází z rozdílné metodologie a způsobu hodnocení. Mikrodiluční metoda byla v tomto případě hodnocena spektrofotometricky. [49]

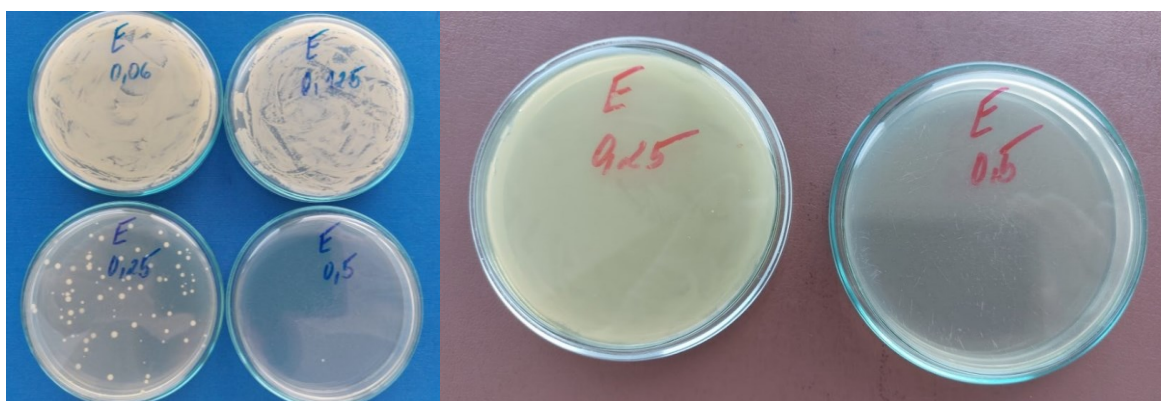


Obrázek 55 Stanovení MIC phenoxyethanolu (vlevo) a kyseliny citronové (vpravo) u *Staphylococcus aureus*



Obrázek 56 Stanovení MIC phenoxyethanolu (vlevo) a kys. citronové (vpravo) u *E. coli*

**Tymiánová silice** měla MIC u *Staphylococcus aureus* 1 mg/ml, při koncentraci 0,5 mg/ml byl zaznamenán nárůst jedné kolonie a při koncentraci 0,25 pouze 60 kolonií. U *E. coli* byla MIC 0,5 mg/ml a při koncentraci 0,25 mg/ml již došlo k souvislému růstu, viz Obrázek 56. U tymiánové silice však byla publikována v diluční metodě i nižší MIC, a to 0,02 mg/ml. [50]



Obrázek 57 Stanovení MIC tymiánové silice u *Staphylococcus aureus* (vlevo) a tymiánové silice u *E. coli* (vpravo)

Z výše uvedených hodnot MIC vyplývá, že *Staphylococcus aureus* měl u tří konzervantů vyšší hodnotu MIC než *E. coli* a u dvou stejnou. Vyšší odolnost *Staphylococcus aureus* mohla být zapříčiněna složením buněčné stěny G+ bakterií a *Staphylococcus aureus* obecně vykazuje často rezistenci vůči antibiotikům. [51]



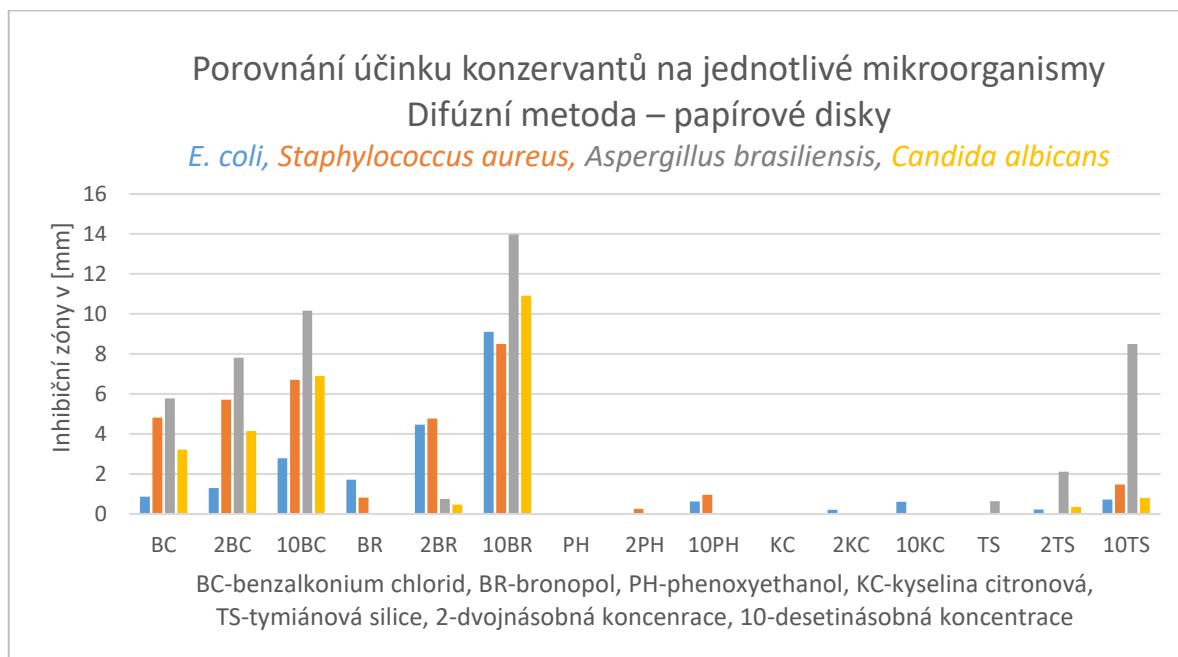
## 8.4 Porovnání a zhodnocení všech metod

### 8.4.1 Difúzní metody

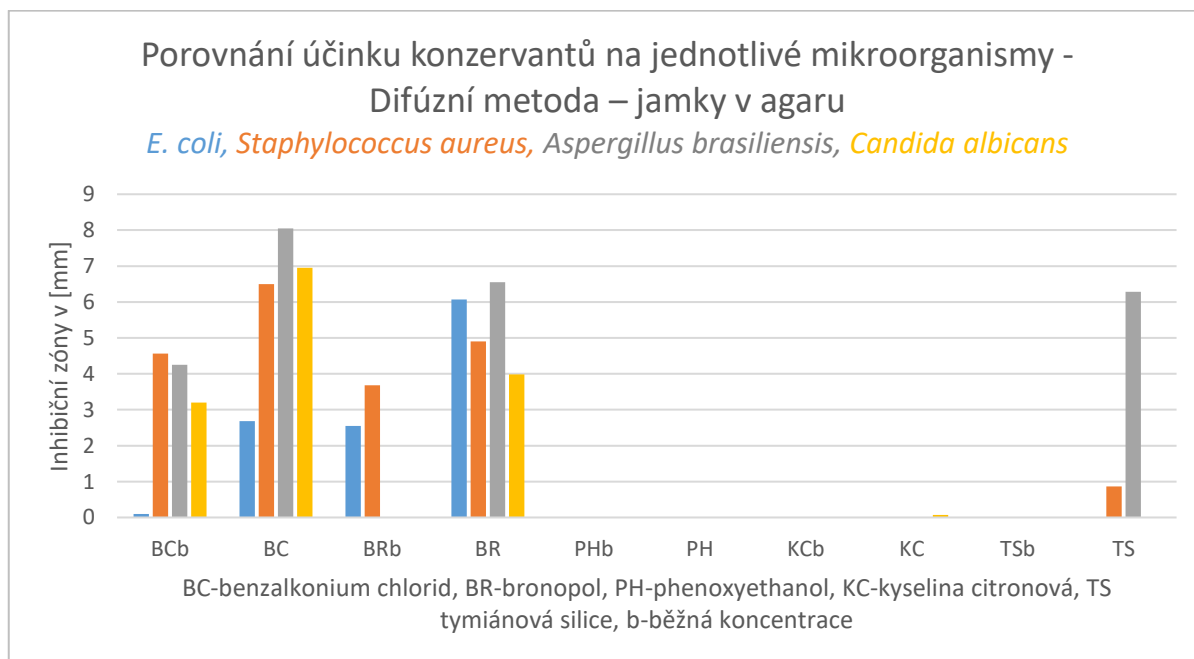
Porovnáním difúzních metod lze srovnat intenzitu tvorby inhibičních zón při použití disku napuštěného konzervantem a při zalití směsi roztoku konzervantu a slurry agaru do otvorů v agaru. Přímou lze porovnávat hodnoty nejvyšší povolené koncentrace, což jsou jediné hodnoty, které jsou zahrnuty v obou metodách. Hodnocením účinku konzervantů v nejvyšší povolené koncentraci můžeme na základě předchozího testování tvrdit, které konzervanty v této koncentraci měly inhibiční účinek vůči testovaným mikroorganismům. V nejvyšší povolené koncentraci byl v obou difúzních metodách nejvíce účinný benzalkonium chlorid, a to na všechny mikroorganismy. Nejvyšší inhibiční účinek vykazoval u *Aspergillus brasiliensis*. Druhý nejvíce účinný konzervant v této koncentraci byl bronopol, i když u diskové metody byl účinný jen na bakterie, u otvorů v agaru vytvořil inhibiční zóny u všech mikroorganismů. V této koncentraci je třetí nejúčinnější tymiánová silice, která účinkovala hlavně na *Aspergillus brasiliensis* a u modifikované difúzní metody i na *Staphylococcus aureus*. Kyselina citronová měla v nejvyšší povolené koncentraci nepatrnou inhibiční zónu pouze v modifikované difúzní metodě u *Candida albicans*. Phenoxyethanol v této koncentraci nevytvořil žádnou inhibiční zónu, viz Obrázky 57, 58.

Existuje řada faktorů, které mají vliv na rozdílné působení konzervantu o obou difúzních metod. U konzervantu, který je přímo aplikován do otvoru v agaru, mohla být celkově inhibice mikroorganismů efektivnější, než z papírového disku. U bronopolu se dokonce při nejvyšší povolené koncentraci při první metodě vůbec nevytvořily zóny u plísně a kvasinky, zatímco u druhé metody byla inhibiční zóna u plísně dokonce nejvyšší a u kvasinky měla také poměrně vysokou hodnotu. Jistou roli zde mohlo hrát umístění inokula, v prvním případě bylo rozetřeno na agarovou plotu, ve druhém přimícháno do média. V prvním případě působil konzervant na povrch agaru, ve druhém působil v celém průřezu otvoru. Koncentrace mikroorganismů na povrchu agaru mohla být ve druhém případě nižší, a tedy i působení konzervantu na povrch agaru mohlo být efektivnější. Největší roli zde ale pravděpodobně hraje množství konzervační látky, které se skutečně dostalo k mikroorganismům. V první metodě to byl objem roztoku nasáklý do papírového disku, který byl ponechán ve 100 µl roztoku. Z jednoho disku se tedy uvolnilo pravděpodobně méně než 10 µl roztoku. V druhém případě byl aplikován do otvoru 1 ml směsi. Ve druhém případě tedy na mikroorganismy působil větší množství konzervantu. Obě difúzní metody

v různých koncentracích tedy prokázaly inhibiční schopnost každého konzervantu s ohledem na metodiku.



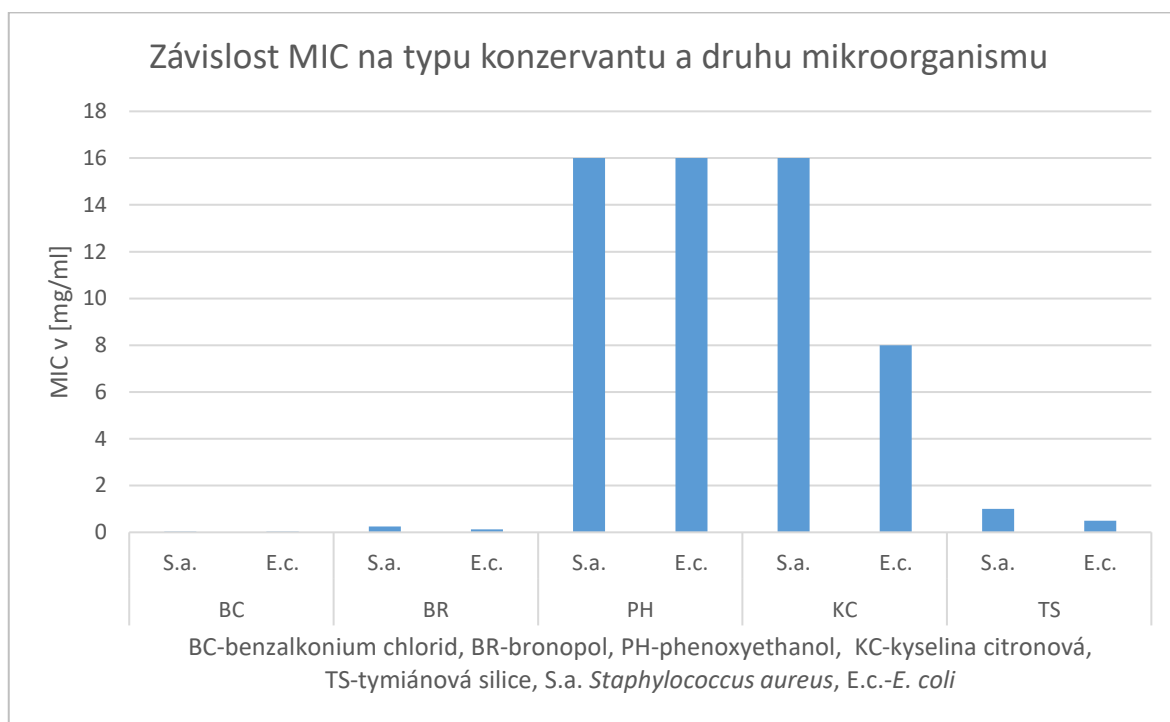
Obrázek 58 Porovnání účinku konzervantů na jednotlivé mikroorganismy v difúzní diskové metodě



Obrázek 59 Porovnání účinku konzervantů na jednotlivé mikroorganismy v modifikované difúzní metodě

### 8.4.2 Diluční metoda

U diluční metody byla měřena výše hodnoty MIC, což byla minimální hodnota inhibující viditelný růst mikroorganismů. Konzervanty s nejnižší MIC byly nejúčinnější, jednalo se o benzalkonium chlorid následovaný bronopolem. Nízké hodnoty MIC měla i tymiánová silice. Mezi konzervanty s nejvyšší hodnotou MIC, tedy nejméně účinné, se zařadil phenoxyethanol, následovaný kyselinou citronovou, viz Obrázek 60.



Obrázek 60 Graf závislosti MIC na typu konzervantu a druhu mikroorganismu

### 8.4.3 Porovnání výsledků difúzních metod a diluční metody

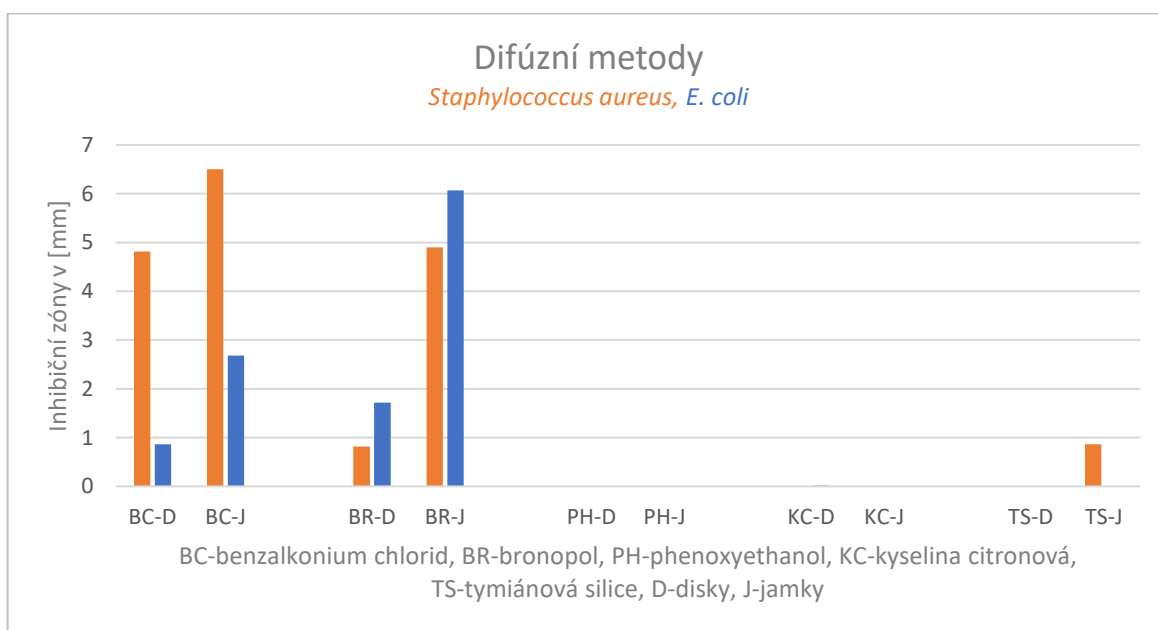
Pokud porovnáme difúzní metody s metodou diluční, můžeme porovnávat pouze účinek konzervace na bakterie, protože u diluční metody byla kvasinka a plíseň vynechána. Vzhledem k odlišnosti obou metod diluční metoda prokázala účinek i u phenoxyethanolu a kyseliny citronové, ale MIC byly o několik řádů vyšší než u ostatních konzervantů.

Podle výsledků všech použitých metod lze označit jako nejúčinnější konzervant benzalkonium chlorid, následovaný bronopolem, menší účinek pak prokázala tymiánová silice. Zároveň všechny použité metody stanovily účinek phenoxyethanolu a kyseliny citronové jako nižší nebo žádný.

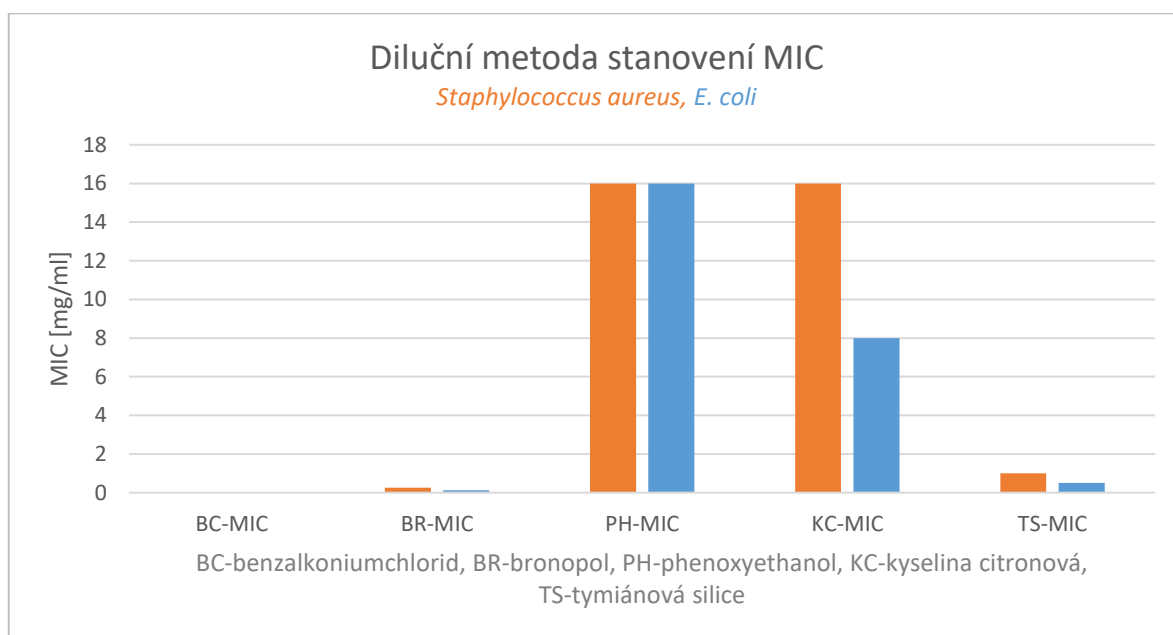
Nutno zmínit, že u všech metod byla snaha o neovlivnění inhibice jinou složkou testování, proto byl při použití tymiánové silice použit jako emulgátor Tween 20 z důvodu, že nemá

vliv na inhibici mikroorganismů. V jiných pracích bylo popsáno ještě použití DMSO (dimethylsulfoxid) a methanolu. Methanol bohužel ovlivňuje životnost mikroorganismů, proto je jeho použití komplikované. [38,39]

Na níže uvedených grafech, viz Obrázky 61, 62, je patrné že konzervanty, u kterých byly u difúzních metod vytvořeny nejširší inhibiční zóny, měly u diluční metody nejnižší hodnotu MIC a naopak. Všechny metody tedy potvrdily účinnost testovaných konzervantů.



Obrázek 61 Porovnání difúzních metod



Obrázek 62 Porovnání hodnot MIC

## ZÁVĚR

Bylo provedeno hodnocení účinnosti pěti konzervantů v různých koncentracích na vybrané mikroorganismy dvěma typy metod. Difúzními metodami byla prokazována účinnost konzervantů pomocí měření inhibičních zón. V diskové difúzní metodě byla hodnocena účinnost nejvyšší povolené koncentrace, jejího dvojnásobku a desetinásobku. V modifikované difúzní metodě byla hodnocena nejvyšší povolená koncentrace a běžně používané koncentrace, které jsou nižší. U diluční metody byly stanoveny pro jednotlivé konzervanty a mikroorganismy hodnoty minimální inhibiční koncentrace, tedy koncentrace, které viditelně inhibují růst mikroorganismů. Porovnáním metod byla potvrzena účinnost konzervantů a vzhledem k odlišnosti provedení metod bylo možné posoudit kvalitu i kvantitu, tedy zda je konzervant účinný a v jaké koncentraci.

Jak diluční, tak difúzní metody potvrdily účinnost konzervantů, tak jak ji prezentuje odborná literatura a jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách. Benzalkonium chlorid a bronopol byly potvrzeny jako velmi účinné konzervanty na různé typy mikroorganismů, gramnegativní i grampozitivní bakterie, plísně a kvasinky. U bronopolu byl prokázán mírně nižší inhibiční účinek na plísně. Účinné konzervanty zpravidla vykazují větší dráždivost a toxicitu, což pro kvartérní amoniové sloučeniny a formaldehydové donory bezesporu platí.

Phenoxyethanol byl vyhodnocen jako konzervant se slabším účinkem oproti jiným, který ale jak bylo výše uvedeno, zvyšuje účinnost jiných konzervantů, působí s nimi synergicky a může tím snížit koncentraci některých senzibilizujících a dráždivých konzervačních složek. To stejné bylo prokázáno u kyseliny citronové, která má sama o sobě nízké inhibiční účinky, přidává se však k ostatním konzervantům a synergicky zvyšuje jejich účinnost.

U tymiánové silice byla prokázána mírná účinnost a její největší účinek byl zaznamenán proti plísni. Vzhledem k tomu, že esenciální oleje se primárně nepoužívají jako konzervanty, ale tvoří součást KP jako účinné látky a složky aroma, jistě je jejich antimikrobní aktivita přínosem jednak pro konzervaci kosmetiky i pro jejich antimikrobní efekt u některých dermatologických problémů.

Z výše uvedených vyhodnocení plyne, že při posuzování účinnosti konzervantů je vždy potřeba kombinovat různé metody, kvalitativní i kvantitativní. Teprve pomocí více metod a většího množství dat je možné dostat ucelené informace o možnosti použití konzervačních složek v kosmetice a dalších odvětvích. Jak již bylo výše popsáno, pro mikroorganismy je typické, že jsou schopné vytvářet si rezistenci vůči konzervantům a antibiotikům. Proto je



nutné metody konzervace a konzervanty opakovaně testovat a případně měnit v závislosti na měnící se odolnosti mikroorganismů a při použití nových kosmetických formulací.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BUŇKOVÁ, Leona. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky*. UTB. Registrační číslo CZ.1.07/2.2.00/28.0132
- [2] Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [3] SALVADOR, Amparo, CHISVERT, Alberto. *Analysis of Cosmetic Products*, 2007, 5.1.1 Preservative Use in Cosmetics. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0099PZO1/analysis-cosmetic-products/preservative-use-in-cosmetics>
- [4] HALLA, Nouredine, ISABEL, P. Fernandes, SANDRINA, A. Heleno, PATRÍCIA, Costa, ZAHIA, Boucherit-Otmani, KEBIR, Boucherit, RODRIGUES, E. Alírio, FERREIRA, C.F.R. Isabel a BARREIRO, F. Maria. 2018. *Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies*. Molecules, 2018, Volume 23, Number 7. 1571. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- [5] RICKE, S.C. *Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials*. Poultry Science, 2003, Volume 82, Issue 4, 2003, Pages 632-639. ISSN 0032-5791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.632>
- [6] RUSSELL, Hugo. *Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection*. Preservation & Sterilization, 2004, MOORE, S. L. a PAYNE, D. N., Chapter 2, Types of Antimicrobial Agents. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470755884.ch2>
- [7] STEINBERG, D. C. *Preservatives for cosmetics*. 3rd ed. Carol Stream, IL: Allured Books, c2012, 291 s. ISBN 9781932633948
- [8] NEMES, Dániel, KOVÁCS, Renátó, NAGY, Fruzsina, TÓTH, Zoltán, HERCZEGH, Pál, BORBÁS, Anikó, KELEMEN, Viktor, PFLIEGLER, Walter P., REBENKU, István, HAJDU, Péter B., FEHÉR, Pálma, UJHELYI, Zoltán, FENYVESI, Ferenc, VÁRADI, Judit, MIKLÓS, Vecsernyés, BÁCSKAY, Ildikó. *Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, Volume 143, 105162, ISSN 0928-09. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>
- [9] KÜCK, Ulrich, FRANKENBERG-DINKEL, Nicole. *Generation rekombinant fungal strains*. Biotechnologie 2015. 4.5.1 De Gruyter. Dostupné z:

<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010ZJES2/biotechnology/generation-recombinant>

[10] LEE, J. Y., KIM, Y. S., a SHIN, D. H. *Antimicrobial Synergistic Effects of Linolenic Acid in Combination with Preservatives against Food-borne Bacteria*. Food Science and Biotechnology, 2004, Volume 13, Issue 3, Page 323-327, 2004.

[11] ASATUROVA, Anzhela, GYRNETS, Evgeny, ALLAKHVERDIAN, Valeria, ASTAKHOV, Mikhail and SAENKO, Ksenia. *The study of the antifungal activity of the Bacillus subtilis BZR 336 g strain under the conditions of periodic cultivation with the addition of citric acid, corn extract and some microelements*. BIO Web Conf. 2020, Volume 21. XI International Scientific and Practical Conference “Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization”. Article Number 00015. Number of page 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100015>

[12] FRANSWAY, Anthony, F., FRANSWAY, Paulina, J., BELSITO, Donald, V., WARSHAW, Erin, M., SASSEVILLE, Denis, FOWLE, Joseph, F. Jr., DEKOVEN, Joel, G., PRATT, Melanie, D., MAIBACH, Howard, I., TAYLOR, James, S., MARKS, James, G., MATHIAS, C., G., Toby, DELEO, Vincent, A., ZIRWAS, J. Matthew, ZUG, Kathryn, A., ATWATER, Amber, R., SILVERBERG, Jonathan, REEDER, Margo, J. *Parabens*. Dermatitis: 1/2 2019, Volume 30, Issue 1–p, 3-31. Dostupné z: <https://journals.lww.com/dermatitis/Fulltext/2019/01000/Parabens.2.aspx>

[13] HON, Zdeněk. *Skrytá nebezpečí parabenů*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/administrace/clankyfile/20120501135918580620.pdf>

[14] PUSCHMANN, Julia, HERBIG, Michael E., MÜLLER-GOYMANN, Christel C. *Correlation of antimicrobial effects of phenoxyethanol with its free concentration in the water phase of o/w-emulsion gels*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2018, Volume 131, Pages 152-161, ISSN 0939-6411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.08.007>.

[15] NOWAK, Karolina, JABŁOŃSKA, Ewa, RATAJCZAK-WRONA, Wioletta. *Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products*. Environmental Research, 2021, Volume 198, 110488, ISSN 0013-9351. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110488>.

[16] BECKER, L.C., BERGFELD, W.F., BELSITO, D.V., et al. *Final Report of the Amended Safety Assessment of Quaternium-15 as Used in Cosmetics*. International Journal of Toxicology, 201, Volume 29, Pages 98-114.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1091581810363915>

[17] GRUMEZESCU, Alexandru, Mihai. *Food Preservation-Nanotechnology in the Agri-Food Industry*. Elsevier, 2017, Volume 6-5.2.3.7 Ionizing Irradiation. Dostupné z:

<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0114HLV5/food-preservation-nanotechnology/ionizing-irradiation>

[18] Cosmos standardy. Dostupné z: <https://www.cosmos-standard.org/>

[19] Kontrola ekologického zemědělství. Dostupné z: <https://www.kez.cz/>

[20] SAIKA, Tariqa, SAIRA, Wania, WASEEM, Rasoola, KHUSHBOO, Shafia, MUZZAFFAR, Ahmad, Bhata, ANIL, Prabhakar, AABID, Hussain, Shallaa, MANZOOR, A. RATHERA. *A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens*. Pathogenesis. Elsevier, September 2019. Volume 134.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>

[21] TEIXEIRA, Bárbara, MARQUES, RAMOS, António, NUNO, Cristina, R., NENG, José, NOGUEIRA, M.F., SARAIVA, Jorge, Alexandre, NUNES, Maria, Leono. *Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils*. Industrial Crops and Products, 2013, Volume 43, Pages 587-595, ISSN 0926-6690.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.069>.

[22] *Éterické oleje a směsi éterických olejů*. Katalog. Cosmetic Karl Hadek Internacional 2007

[23] Nature store – aktivní látky. Dostupné z: <https://www.nature-store.cz/aktivni-latky/>

[24] Minasolve bio-ingredients for your applications. Dostupné z: <https://minasolve.com/>

[25] DOLEŽÁLKOVÁ, I., MÁČALÍK, Z., BUTKOVIČOVÁ, A., JANIŠ, R., BUŇKOVÁ, L. *Monoacylglycerols as fruit juices preservatives*. 2012, Czech J. Food Sci., 30: 567–572.

Limiting or preventing the growth of undesirable microbial flora in food

[26] <http://hdl.handle.net/10563/29449>

[27] ISO 29621:2017, <https://www.iso.org/standard/68310.html>

[28] KERDUDO, A., FONTAINE-VIVE, F., DINGAS, A., FAURE, C., FERNANDEZ, X., *Optimization of cosmetic preservation: water activity reduction*. INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE, Volume 37, Issue 1, Page 31-40, Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12164>

- [29] LUNDOV M. D., JOHANSEN J. D., ZACHARIAE, C., MOESBY. *Low-level efficacy of cosmetic preservatives*. International Journal of Cosmetic Science, 2001. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00619.x>
- [30] JUNCAN, A. M., RUS, L. L., CRACIUN, V. I., et al. *Application of a Multifunctional Additive in Cosmetic Preparations for Safe Preservation*. REVISTA DE CHIMIE, 2019, Volume 70, Issue 7, 2429-2433. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000485843500028>
- [31] REIGER, Martin, M., *Harry's Cosmeticology*. 2000, Volumes I-II (8th Edition). Chemical Publishing Company.  
Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHCVIIIIEH/harrys-cosmeticology/harrys-cosmeticology>
- [32] SALVADOR, Amparo, CHISVERT, Alberto. *Bacterial Resistance in Cosmetics*. Chapter-From Analysis of Cosmetic Products. 2nd Edition, Elsevier, 2018. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011G7G31/analysis-cosmetic-products/bacterial-resistance>
- [33] <https://www.technicke-normy-csn.cz/csn-en-iso-11930-681561-216820.html>
- [34] TAYLOR, T. M. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier, 2015, Chapter 9, UKUKU, D.O., MUKHOPADHYAY, S., JUNEJA, V., RAJKOWSKI, K., Evaluating natural antimicrobials for use in food products,  
Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00U8RIL2/handbook-natural-antimicrobials/antimicrobial-susceptibility>
- [35] *Disková difúzní metoda*. Dostupné z: <http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast>
- [36] *Vyšetření MIC*. Dostupné z: <http://www.szu.cz/vysetreni-mic>
- [37] ŠMÉTKOVÁ, P. B. Z., a ZEMANOVÁ, J. *Studium konzervačních systémů pro kosmetiku*. 2009. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/16470>
- [38] BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., & MYŠKOVÁ, M. P. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 2014. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Brno.
- [39] ŠTĚRBOVÁ, L. *Antimikrobiální působení rostlinných extraktů proti mikroorganismům izolovaných z mléka a mléčných výrobků*. 2016.  
Dostupné z: [https://theses.cz/id/hsbbnf/zaverecna\\_prace.pdf](https://theses.cz/id/hsbbnf/zaverecna_prace.pdf)
- [40] JANEČKOVÁ, H. *Synergický efekt vybraných silic a antibiotik pro zevní použití proti Staphylococcus aureus*. 2021.  
Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/zid6i/Diplomova\\_prace\\_Hana\\_Janeckova.pdf](https://is.muni.cz/th/zid6i/Diplomova_prace_Hana_Janeckova.pdf)

- [41] HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Department of Microbiology, The University of Western Australia. First published, 25 December 2001, Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
- [42] SANDLE, Tim, *Antimicrobial Susceptibility Test Concepts*. Chapter From *Pharmaceutical Microbiology-Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, Elsevier 2016.  
Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00URX1M1/pharmaceutical-microbiology/antimicrobial-efficacy>
- [43] WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R. *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. *Agar. Nat Protoc* 3, 163–175 2008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- [44] *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution*. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 6, Issue 9, 2000, Pages 509-515, ISSN 1198-743X, Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
- [45] [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz)
- [46] EL SAYED ZAKI, Maysaa, BASTAWY Samah, MONTASSER Karim. *Molecular study of resistance of Staphylococcus aureus to antiseptic quaternary ammonium compounds*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 17, 2019, Pages 94-97. ISSN 2213-7165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.022>.
- [47] SHEPHERD, J. A., WAIGH, R. D., GILBERT, P. *Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol)*. *ASM Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol. 32, No. 11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.32.11.1693>
- [48] FUURSTED, K., HJORT, A., KNUDSEN, L. *Evaluation of bactericidal activity and lag of regrowth (postantibiotic effect) of five antiseptics on nine bacterial pathogens*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Volume 40, Issue 2, Pages 221-226. doi:10.1093/jac/40.2.221
- [49] ELIUZ, E. *Antimicrobial activity of citric acid against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Candida albicans as a sanitizer agent*. *Eurasian Journal of Forest, 2020, Science*, 8 (3), 295-301. Dostupné z: <https://doi.org/10.31195/ejejfs.787021>
- [50] MUTLU-INGOK, A., DEVECIOGLU, D., DIKMETAS, D. N., KARBANCIOGLU-GULER, F., CAPANOGLU, E. *Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils. An Updated Review*, *Molecules*, Volume 25, Issue 20, 2020, Article Number 4711. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>

[51] HEDLOVÁ, Dana. *Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních*. 2006. Směrnice pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

KP Kosmetický prostředek

EDTA Kyselina ethylendiamintetraoctová

PVP Polyvinylpyrrolidon

PE Polyethylen

BC Benzalkonium chlorid (nejvyšší povolená koncentrace)

BR Bronopol (nejvyšší povolená koncentrace)

PH phenoxyethanol (nejvyšší povolená koncentrace)

KC kyselina citronová (nejvyšší povolená koncentrace)

TS tymiánová silice (nejvyšší povolená koncentrace)

MIC Minimální inhibiční koncentrace

SMODCH Směrodatná odchylka



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Vzorec kyseliny benzoové; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 2 Vzorec kyseliny salicylové; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 3 Vzorec kyseliny dehydrooctové; [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)

Obrázek 4 Vzorec kyseliny propionové; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 5 Vzorec kyseliny sorbové; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 6 Vzorec kyseliny mravenčí; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 7 Vzorec kyseliny citronové; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 8 Vzorec benzyl alkoholu; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 9 Vzorec 4-isopropyl-m-kresolu; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Obrázek 10 Vzorec parabenu; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 11 Vzorec phenoxyethanolu; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 12 Vzorec bifenyl-2-olu; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 13 Vzorec formaldehydu; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 14 Vzorec imidazolidinyl urea; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 15 Vzorec diazolidinyl urea; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 16 Vzorec DMDM hydantoin; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 17 Vzorec methenamine; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 18 Vzorec quaternium 15; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 19 Vzorec methylisothiazolinone; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 20 Vzorec methylchlorisothiazolinone; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 21 Vzorec 5-brom-5-nitro-1,3dioxan; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 22 Vzorec bronopol; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 23 Vzorec chloracetamide; [www.cs.wikipedie.org/](http://www.cs.wikipedie.org/)

Obrázek 24 Vzorec chlorbutanol; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 25 Vzorec chlorphenesin; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 26 Vzorec benzalkonium chlorid; [www.tcichemicals.com](http://www.tcichemicals.com)

Obrázek 27 Vzorec chlorhexidin; [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org)

Obrázek 28 Vzorec polyaminopropylbiguanid; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 29 Vzorec kyselina kaprylhydroxymová; [www.m.chemicalbook.co](http://www.m.chemicalbook.co)

Obrázek 30 Vzorec pentylene glycol; <https://www.wikidata.org>

Obrázek 31 Vzorec 2-monoacylglycerolu; [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)

Obrázek 32 Laminární box připravený k pipetování a roztěru roztoku konzervantu a bakteriální suspenze

Obrázek 33 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *E.coli* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 34 Inhibiční zóny u *E.coli* , vlevo benzalkonium chlorid a vpravo bronopol (analýza přístrojem SCAN 500)

Obrázek 35 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Staphylococcus aureus* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 36 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus*, vlevo benzalkonium chlorid, vpravo bronopol (analýza přístrojem SCAN 500)

Obrázek 37 Inhibiční zóny u *E.coli* nahoře a *Staphylococcus aureus* dole, (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

Obrázek 38 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Aspergillus brasiliensis* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 39 Inhibiční zóny u *Aspergillus brasiliensis*, vlevo benzalkonium chlorid, vpravo bronopol (analýza přístrojem SCAN 500)

Obrázek 40 Graf závislosti šířky inhibičních zón u *Candida albicans* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 41 Inhibiční zóny u *Candida albicans*, vlevo benzalkonium chlorid, vpravo bronopol (analýza přístrojem SCAN 500)

Obrázek 42 Inhibiční zóny u *Candida albicans* (nahore) a *Aspergillus brasiliensis* (dole), (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

Obrázek 43 Graf závislosti inhibičních zón u *E.coli* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody

Obrázek 44 Inhibiční zóny u *E.coli* u benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo)

Obrázek 45 Graf závislosti inhibičních zón u *Staphylococcus aureus* na koncentraci jednotlivých konzervantů u modifikované difúzní metody

Obrázek 46 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus* u benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo)

Obrázek 47 Inhibiční zóny u *E.coli* (nahore) a *Staphylococcus aureus* (dole), (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

Obrázek 48 Graf závislosti inhibičních zón u *Aspergillus brasiliensis* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 49 Inhibiční zóny u *Aspergillus brasiliensis* u benzalkonium chlorid (vlevo) a tymiánová silice (vpravo)

Obrázek 50 Graf závislosti inhibičních zón u *Candida albicans* na koncentraci jednotlivých konzervantů

Obrázek 51 Inhibiční zóny u *Candida albicans* u benzalkonium chlorid (vlevo) a bronopol (vpravo)

Obrázek 52 Inhibiční zóny u *Candida albicans* (nahore) a *Aspergillus brasiliensis* (dole), (A – benzalkonium chlorid, B – bronopol, C – phenoxyethanol, D – kyselina citronová, E – tymiánová silice)

Obrázek 53 Stanovení MIC benzalkonium chloridu (vlevo) a bronopolu (vpravo) u *E.coli*

Obrázek 54 Stanovení MIC benzalkonium chloridu (vlevo) a bronopolu (vpravo) u *Staphylococcus aureus*

Obrázek 55 Stanovení MIC phenoxyethanolu (vlevo) a kys. citronové (vpravo) u *Staphylococcus aureus*

Obrázek 56 Stanovení MIC phenoxyethanolu (vlevo) a kys.citronové (vpravo) u *E.coli*

Obrázek 57 Stanovení MIC tymiánové silice u *Staphylococcus aureus* a u *E.coli*

Obrázek č 58 Porovnání konzervantů na jednotlivé mikroorganismy v difúzní diskové metodě

Obrázek 59 Porovnání účinku konzervantů na jednotlivé mikroorganismy v modifikované difúzní metodě

Obrázek 60 Graf závislosti MIC na typu konzervantu a druhu mikroorganismu

Obrázek 61 Porovnání difúzních metod

Obrázek 62 Porovnání hodnot MIC

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Příprava roztoků konzervantů různých koncentrací u diskové difúzní metody

Tabulka 2 Příprava roztoků konzervantů různých koncentrací u modifikované difúzní metody

Tabulka 3 Příprava zásobních roztoků

Tabulka 4 Příprava koncentrační řady roztoků konzervantu a bakteriální suspenze

Tabulka 5 Inhibiční zóny u *Escherichia coli*, disková difúzní metoda

Tabulka 6 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus*, disková difúzní metoda

Tabulka 7 Inhibiční zóny u *Aspergillus niger*, disková difúzní metoda

Tabulka 8 Inhibiční zóny u *Candida albicans*, disková difúzní metoda

Tabulka 9 Inhibiční zóny u *E.coli*, modifikovaná difúzní metoda

Tabulka 10 Inhibiční zóny u *Staphylococcus aureus*, modifikovaná difúzní metoda

Tabulka 11 Inhibiční zóny u *Aspergillus niger*, modifikovaná difúzní metoda

Tabulka 12 Inhibiční zóny u *Candida albicans*, modifikovaná difúzní metoda

Tabulka 13 Vyhodnocení růstu bakterií v diluční metodě

Tabulka 14 Hodnota MIC u jednotlivých koncentrací a mikroorganismů

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 Produktová specifikace – tymiánová silice

Příloha č. 2 Bezpečnostní list – tymiánová silice

