



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POTENCIÁLNÍ MIKROBIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ V SOUČASNÝCH TRENDECH KOSMETIKY - BIO, VEGAN, RAW.

POTENTIAL MICROBIAL HAZARDS IN ACTUAL COSMETOLOGY TRENDS - BIO, VEGAN, RAW

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Simona Jančíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1098/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Simona Jančíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Potenciální mikrobiologické nebezpečí v současných trendech kosmetiky – bio, vegan, raw.

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) charakterizace kosmetických produktů typu bio, vegan a raw
- 2) analýza vybraných aktivních složek obsažených ve vybraných kosmetických produktech
- 3) možnosti potenciální mikrobiální kontaminace v daných typech kosmetických výrobků

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Simona Jančíková
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bio-, vegan- a raw-kosmetika patří k stále oblíbenějším druhům kosmetických produktů z důvodu absence syntetických látek a konzervantů, z tohoto hlediska se ale zvyšuje pravděpodobnost mikrobiální kontaminace. Předmětem práce je tedy především praktické zjištění potenciální mikrobiologické kontaminace pomocí zátěžového testu a také stanovení aktivních složek v kosmetických přípravcích. V teorii byla zpracována legislativa kosmetických přípravků, a také informace o certifikátech, které se pro bio-, vegan- a raw-kosmetiku udělují. Tato část také pojednává o složení rostlinných a esenciálních olejů, které se ve významné míře používají jako suroviny při výrobě kosmetiky a mají pozitivní vliv na pokožku. V neposlední řadě se práce zabývá možnou mikrobiologickou kontaminací, výčtem nejčastěji se vyskytujících patogenních mikroorganismů, které mohou mít negativní vliv na zdraví spotřebitele. V praktické části je pak testována trvanlivost vybraných vzorků krémů pomocí zátěžového Schülke Koko testu zaočkováním vybraných zástupců mikroorganismů z řady bakterií, kvasinek a plísní (*Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Aspergillus niger*). Dále byla otestována možná antimikrobiální aktivita přítomných esenciálních olejů, které mohou částečně nahrazovat účinek syntetických konzervantů. V práci byly analyzovány biologicky aktivní látky, konkrétně mastné kyseliny obsaženy v krémech, pomocí plynové chromatografie.

ABSTRACT

Bio-, vegan- and raw-cosmetics are continually more popular type of cosmetic products caused by an absence of synthetic and preservative substances but at the same time there is an increased probability of microbial contamination. The main aim of this thesis is a practical findings of potential microbiological contamination using a challenge test and a determination of any active ingredients in the cosmetic preparations. The legislation of cosmetic preparations as well as the information about certificates, which are awarded for bio-, vegan- and raw-cosmetics has been processed in the theory. This section also discusses a composition of vegetable and essential oils, which are used as raw materials in cosmetics production to a great extent and have a positive effect on skin. This thesis also deals with a possible microbiological contamination, listing the most frequently occurred pathogenic microorganisms, which can have a negative influence on consumer health. Operating life of selected samples using the Schülke Koko test by inoculating selected representatives of bacteria, yeasts and molds (*Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus niger*) are being tested in the practical part. In addition a possible antimicrobial activity which may partially replace an effect of synthetic preservatives in the presence of essential oils is also being tested. Finally any biological active substances were analysed by the gas chromatography, in particular fatty acids contained in the creams.

KLÍČOVÁ SLOVA

biokosmetika, mikrobiologická kontaminace, Schülke Koko test, mastné kyseliny, esenciální oleje, konzervační látky

KEY WORDS

biocosmetics, microbiological contamination, Schülke Koko test, fatty acids, essential oils, preservatives

JANČÍKOVÁ, S. *Potenciální mikrobiologické nebezpečí v současných trendech kosmetiky - bio, vegan, raw..* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Hároníková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Ing. Andree Hároníkové Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu a připomínky při psaní bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Martinovi Szotkowskému, Bc. Denise Romanovské, Martině Šťastné, a i dalším z laboratoře za pomoc s prací na experimentální části. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Legislativa.....	9
2.2	Kosmetické certifikáty	10
2.2.1	Certifikát NATRUE.....	11
2.2.2	Certifikát Vegan	11
2.2.3	Certifikát CPK	12
2.2.4	Certifikát BDIH	12
2.3	Složení bio, vegan a raw kosmetických přípravků	13
2.4	Rostlinné oleje	13
2.4.1	Slunečnicový olej	13
2.4.2	Olivový olej	14
2.4.3	Kokosový olej.....	14
2.4.4	Sójový olej.....	14
2.4.5	Mandlový olej.....	14
2.4.6	Bambucké máslo.....	14
2.4.7	Olej z hroznových jader.....	15
2.4.8	Meruňkový olej.....	15
2.4.9	Jojobový olej.....	15
2.5	Esenciální oleje	15
2.5.1	Eukalyptus kulatoplodý (<i>Eucalyptus globulus</i>).....	16
2.5.2	Levandule lékařská (<i>Lavandula angustifolia</i>)	16
2.5.3	Tea tree – Kajeput střídavolistý (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	16
2.5.4	Pomerančovník čínský (<i>Citrus sinensis</i>)	16
2.6	Mastné kyseliny	17
2.6.1	Nasyčené mastné kyseliny	18
2.6.2	Nenasycené mastné kyseliny	18
2.7	Mikrobiální kontaminace a konzervanty	20
2.7.1	Druhy mikrobiální kontaminace.....	20
2.7.2	Podmínky ovlivňující mikrobiální kontaminaci v kosmetických přípravcích	20
2.7.3	Mikroorganismy v kosmetických přípravcích	21
2.7.4	Antimikrobiální látky a konzervační látky	22

2.8	Testy používané pro zjištění trvanlivosti kosmetických přípravků	23
2.8.1	EU Pharmacopoeia	23
2.8.2	US Pharmacopoeia	23
2.8.3	Schülke Koko test.....	24
2.9	Polymerázová řetězová reakce.....	24
2.10	Gelová elektroforéza	25
2.11	Plynová chromatografie	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Použité chemikálie	27
3.2	Použité mikroorganismy	27
3.3	Složení kultivačních médií.....	28
3.4	Další složky použité při PCR.....	28
3.5	Přístroje	28
3.6	Další složky použité pro plynovou chromatografii.....	28
3.7	Zkoumané vzorky krémů a jejich složení	29
3.8	Kontrola potenciální kontaminace z výroby	31
3.9	Kontrola potenciální kontaminace z výroby metodou PCR	31
3.9.1	Lýze buněk a izolace DNA.....	31
3.9.2	Polymerázová řetězová reakce	32
3.9.3	Gelová elektroforéza DNA	33
3.10	Schülke Koko test	34
3.11	Antimikrobiální test u vzorků krémů.....	34
3.12	Antimikrobiální test esenciálních olejů	35
3.13	Stanovení aktivních složek plynovou chromatografií.....	35
3.13.1	Podmínky pro stanovení methylesterů mastných kyselin.....	35
3.13.2	Příprava vzorků pro analýzu na GC	36
3.13.3	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Kontrola potenciální kontaminace z výroby	38
4.2	Kontrola potenciální kontaminace z výroby metodou PCR	39
4.3	Schülke Koko test	41
4.4	Antimikrobiální test u vzorků krémů.....	42

4.5	Antimikrobiální test esenciálních olejů	43
4.6	Plynová chromatografie	45
5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51

1 ÚVOD

V současné době se začínáme čím dál více setkávat s různými novými druhy kosmetických přípravků. Mezi tyto nové druhy patří také biokosmetika, raw-kosmetika a veganská kosmetika.

Tyto druhy kosmetiky zatím nejsou nijak specifikovány v legislativě, spotřebitel si tedy musí dávat pozor na nákup těchto přípravků. Jediným způsobem, kterým se momentálně dá zaručit, že se skutečně jedná o bio, vegan nebo raw kosmetiku jsou certifikáty, které mají přesně specifikovány standardy, co musí kosmetický přípravek obsahovat a v jakých podmínkách probíhá jeho výroba.

U biokosmetiky se obecně jedná o kosmetiku obsahující přírodní a bio složky, které by v ideálním případě měly pocházet z ekologického zemědělství. Tyto složky pak kosmetický přípravek obsahuje buď výhradně, nebo jen v určitém procentuálním zastoupení [1].

U raw kosmetiky pak nesmí být kosmetický přípravek při výrobě zahříván na vyšší teplotu než 42°C, aby zůstaly zachovány všechny léčivé složky [2].

A u veganské kosmetiky se nesmí v kosmetických přípravcích objevit žádná složka živočišného původu [3].

Všechny tyto typy kosmetiky se také prezentují tím, že bývají bez škodlivých chemických syntetických přísad a i bez konzervantů. Což může být spotřebitelem vnímáno jako výhoda, že svoji kůži nezatěžuje nezdravými chemickými prostředky. Může to mít ale velký vliv na trvanlivost přípravků a také na velmi brzkou mikrobiální kontaminaci po otevření přípravku, která nemusí být rozpoznatelná pouhým okem. Je tedy otázka, zda jsou vůbec přírodní kosmetické přípravky vlastně pro pokožku prospěšné, respektive, zda pro ni nejsou prospěšné jen po velmi krátkou dobu po výrobě přípravku. Konzervanty by totiž v kosmetických přípravcích měly být natolik účinné, aby zamezily růstu nebo dokonce dokázaly zničit případné přítomné mikroorganismy, z tohoto důvodu však často vykazují nepříznivé účinky též u člověka [4].

Velkým trendem je také domácí výroba kosmetických přípravků, existuje řada knih s mnoha recepty na výrobu, krémů, balzámů na rty, mýdel, zubních past a podobně. Kde se zpravidla do přípravků nepřidávají žádné konzervanty, otázkou pak je, zda si spotřebitel/výrobce, jelikož přípravek nepodléhá kontrolním analýzám, uvědomuje, že v důsledku absence konzervantů se doba trvanlivosti může opravdu rapidně snížit a kosmetika opět místo pozitivního vlivu může mít spíše vliv negativní.

Pro ochranu spotřebitele existuje celá řada testů mikrobiální kontaminace, na základě kterých se určuje doba spotřeby daného výrobku.

Tato práce se zabývá především vlivem absence konzervantů v kosmetických přípravcích a specifikací výsledků testů mikrobiální kontaminace u bio, vegan a raw-kosmetiky jak komerčně dostupné, tak i u kosmetických přípravků vyráběných doma.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Legislativa

Kosmetické výrobky se řídí řadou různých zákonných norem, bez kterých by nemohly být dodávány na trh. Definice kosmetických přípravků, jejich složení a další vlastnosti upravuje především *Nářízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích*. Kde je tedy uvedeno, že „kosmetickým přípravkem“ je jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů; a také je zde uveden další důležitý pojem, že „konzervační přísadou“ je látka, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku. Dále je v tomto nařízení specifikováno popsání složení výrobků, které musí mít přesné pořadí, dle procentuálního zastoupení jednotlivých složek ve výrobcích, a to vždy od složky zastoupené nejvíce po složky zastoupené nejméně. U složek se zastoupením menším než 1 % pak už pořadí může být náhodné. Nařízení také uvádí, že suroviny, ze kterých je přípravek vyroben by měly být na výrobku napsány mezinárodním názvoslovím, což může být bráno jako nevýhoda, kdy český spotřebitel bez znalosti anglického či latinského jazyka může mít problém s tím zjistit, co je vůbec v kosmetice obsaženo [5].

V České legislativě se zaměřením na kosmetické přípravky zabývá především *zákon č. 267/2015 Sb., o ochraně veřejného zdraví*. Tento zákon specifikuje nařízení Evropské unie [6], a je k němu též vázána vyhláška Ministerstva zdravotnictví České republiky, upravuje hlavně výpis podmínek, které když výrobce nebo prodejce nedodrží, tak se dopouští správního deliktu.

Kosmetické výrobky jsou také kontrolovány pomocí ISO norem, které určují postup, jakým mají být kosmetické přípravky testovány a také přítomnost kterých mikroorganismů je nutná sledovat, norma ČSN EN ISO 17516 také udává mikrobiologické limity (viz *Tabulka 1 a Tabulka 2*).

Tabulka 1: Vybrané normy týkající se mikrobiologické kontroly kosmetických přípravků

Norma	Název normy
ČSN ISO 21148	Kosmetika – Mikrobiologie – Všeobecné pokyny pro mikrobiologické vyšetřování
ČSN ISO 21149	Kosmetika – Mikrobiologie – Stanovení počtu a průkaz aerobních mezofilních bakterií
ČSN ISO 18415	Kosmetika – Mikrobiologie – Průkaz specifických a nespecifických mikroorganismů
ČSN ISO 22717	Kosmetika – Mikrobiologie - Průkaz <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ČSN ISO 22718	Kosmetika – Mikrobiologie – Průkaz <i>Staphylococcus aureus</i>
ČSN EN ISO 21150	Kosmetika – Mikrobiologie – Průkaz <i>Escherichia coli</i>
ČSN EN ISO 18416	Kosmetika – Mikrobiologie – Průkaz <i>Candida albicans</i>
ČSN EN ISO 16212	Kosmetika – Mikrobiologie – Stanovení počtu kvasinek a plísní

Tabulka 2: Mikrobiologické limity dle ČSN EN ISO 17516

Druhy mikroorganismů	Výrobky specificky určené pro děti do tří let, pro oblast okolo očí nebo na sliznice	Jiné výrobky
Celkový počet aerobních mezofilních mikroorganismů	$\leq 1 \cdot 10^2$ KTJ na g nebo ml	$\leq 1 \cdot 10^3$ KTJ na g nebo ml
<i>Escherichia coli</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Candida albicans</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml

2.2 Kosmetické certifikáty

Pomocí kosmetických certifikátů je kontrolováno, jaké složky výrobek obsahuje i jakého jsou původu, zda syntetické nebo přírodní a jelikož není zatím v legislativě nijak specifikováno, co má obsahovat biokosmetika, veganská a nebo raw kosmetika, jsou tyto certifikáty jediným potvrzením pro spotřebitele, že kupují kvalitní výrobek, každý certifikát má totiž přísně specifikovány podmínky, které jsou nutné pro jeho získání. Existuje celá řada kosmetických certifikátů. Dále jsou uvedeny některé, se kterými se můžou spotřebitelé setkat v prodejních sítích.

2.2.1 Certifikát NATRUE

Certifikát NATRUE je nezávislý certifikát udělován kosmetickým výrobkům obsahujícím pouze přírodní složky z ekologicky kontrolovaného zemědělství, kde nedochází k pěstování nebo chování geneticky modifikovaných organismů. Certifikát je udělován produktům, které jsou přírodní minimálně ze 75 %. Zároveň se také řídí *Nařízením evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích*. Do procentuálního složení zde není zahrnuta voda, která bývá typickou součástí mnoha kosmetických přípravků a mohlo by tak dojít ke klamání spotřebitele, kdy by přípravek mohl být ze 75 % složený z vody, která je vždy přírodní. Certifikát NATRUE se ale primárně zaměřuje na další suroviny, ze kterých je kosmetika vyrobena, u kterých už nemusí být přírodní původ zcela prokazatelný na první pohled. Suroviny obsažené v kosmetice jako konzervanty, barviva a minerály tedy mohou být i syntetické původu, ale pořad musí být v této formě dohledatelné i v přírodě.

Vše je také rozděleno do 3 úrovní, která je vždy označena příslušným textem pod logem a to buď NATURAL COSMETICS, který zaručuje, že přípravek obsahuje přírodní ingredience, u kterých však není kontrolován původ z ekologického zemědělství, je to základní certifikát NATRUE, až po udělení toho certifikátu je možné žádat o další z certifikátů, který je pojmenován NATURAL COSMETICS WITH ORGANIC PORTION, který zaručuje, že minimálně 70 % z přírodních složek pochází z kontrolovaného ekologického zemědělství nebo kontrolovaného volného sběru. Posledním z certifikátů je pojmenován ORGANIC COSMETICS a zaručuje, že přípravek obsahuje minimálně 95 % složek z kontrolovaného ekologického zemědělství, také je zde brán ohled na to, aby přípravek obsahoval vyšší podíl přírodních surovin a menší podíl derivátů přírodních surovin [7].



Obrázek 1: Logo certifikátu NATRUE [7]

2.2.2 Certifikát Vegan

Certifikát Vegan je udělován kosmetickým přípravkům, které neobsahují žádné živočišné složky, také během vývoje ani výroby kosmetické přípravků nesmí být žádná ze složek nebo celý hotový produkt testovány na zvířatech.

Přípravky dále mohou obsahovat geneticky modifikované organismy, ale tyto nesmí zahrnovat žádné živočišné geny nebo látky pocházející ze zvířat.

Důraz je také kladen na hygienické podmínky během výroby, kdy veganská kosmetika a jiné druhy kosmetiky obsahující živočišné složky musí být vyráběny v odlišných nádobách, aby nedošlo ke kontaminaci veganských přípravků [8].



Obrázek 2: Logo The Vegan Society a logo pro veganské výrobky [8]

2.2.3 Certifikát CPK

Certifikát CPK - udělován KEZ o.p.s. je v současné době jediným českým kosmetickým certifikátem a zaručuje, že kosmetický přípravek obsahuje přírodní suroviny, nesmí obsahovat geneticky modifikované organismy ani suroviny, u kterých by během vývoje byla použity metody vycházející z genové manipulace. Samotný přípravek ani suroviny v něm obsažené nesmí být testovány na zvířatech. Při udělování certifikátu se bere ohled i na použití obalových materiálů, kde je zakázáno používat PVC a polystyren.

Certifikát CPK je udělován ve dvou formách, a to *CPK – certifikovaná přírodní kosmetika*, který zaručuje, že přípravek obsahuje minimálně 85% složek přírodního původu. Druhý je pak *CPK – bio*, který zaručuje, že kosmetický přípravek není složen z olejů a tuků, které byly připraveny chemickou rafinací, a obsahuje minimálně 90% surovin přírodního původu, kdy zároveň minimálně 20% hmotnostního podílu, do kterého se nezapočítává voda, musí být BIO [3].



Obrázek 3: Loga certifikátu CPK [3]

2.2.4 Certifikát BDIH

Další známý certifikát pro kosmetické přípravky nese název BDIH podle názvu společnosti – Bundesverband Deutscher Industrie- und Handelsunternehmen für Arzneimittel, Reformwaren, Nahrungsergänzungsmittel und kosmetische Mittel e.V. (Asociace německých průmyslových a obchodních firem z oblasti léčiv, zdravotnických potřeb, potravinových doplňků a osobní hygieny. Certifikát zaručuje, že kosmetický přípravek obsahuje pouze přírodní suroviny, které by měly v maximální možné míře pocházet z ekologického zemědělství, přípravek také nesmí obsahovat ropné produkty, syntetické parfémy, barviva nebo konzervanty a je také zakázáno testování na zvířatech jak u hotového kosmetického přípravku, tak i východních surovin v něm obsažených [9].



Obrázek 4: Logo BDIH [10]

2.3 Složení bio, vegan a raw kosmetických přípravků

Kosmetické přípravky z řady bio, vegan a raw se skládají z různých složek. Mezi základní patří tenzidy, které mají celou řadu různých funkcí, jako například smáčecí a čistící schopnost [11]. Patří sem jak tenzidy neinoické, například kyselina stearová či palmitová, tak i tenzidy ionické, které se dělí na anionické – palmitan sodný, stearan draselný apod. a na kationické tenzidy, které ale nejsou v těchto kosmetických přípravcích povoleny. Dalšími základními složkami jsou hydrofilní rozpouštědla nebo hydratační látky alkoholické povahy, kam se řadí voda, která však nesmí být chemicky ani fyzikálně dezinfikována. Dále alkoholy, kyseliny, cukry a aminokyseliny a proteiny rostlinného původu. Používají se také různé anorganické látky, jako oxid zinečnatý nebo chlorid draselný. Dále také barviva, který slouží k obarvení samotného kosmetického přípravku, celého těla nebo jen některých jeho částí, kam se řadí například anthokyany a karoteny. Pro parfemaci kosmetických přípravků mohou být využity vonné složky rostlinného původu, jako například esenciální oleje. Důležitou součástí jsou i antioxidační látky jako vitamíny A, E, C [3].

Další významnou složkou jsou oleje a tuky, které jsou v testovaných typech kosmetiky nejvíce zastoupené. Používají se například pro výrobu mýdel nebo se přidávají do krémů. Oleje patří také do skupiny takzvaných aktivních složek, což znamená, že tyto látky mají také vlastní specifické účinky, kterými obohacují kosmetický přípravek o další pozitivní vlastnosti, které mají přípravky na pokožku, vlasy, nehty nebo rty. K těmto vlastnostem patří u rostlinných olejů to, že dokáží sloužit jako náhrada kožního mazu a mají tedy zvláčňující účinek. Samotný kožní maz, který se tvoří ve speciálních žlázkách je složený ze směsi mastných kyselin a glyceridů, s věkem se jeho produkce snižuje a důsledkem toho může docházet k rychlejšímu stárnutí pokožky, k pozastavení tohoto procesu mohou být použity právě rostlinné oleje. Ve veganské kosmetice navíc platí podmínka, že nesmí být živočišného původu.

Oleje můžeme získávat různými způsoby, mezi nejběžnější patří lisování a extrakce. Při lisování dochází k vytlačení oleje z materiálu, který ho obsahuje (většinou olejnatých semen) pomocí šnekových lisů. U extrakce dochází k uvolnění oleje za použití vhodných rozpouštědel. Tento proces je typický pro získání oleje z nízkoolejnatých surovin [12].

2.4 Rostlinné oleje

2.4.1 Slunečnicový olej

Olej se získává ze Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), konkrétně ze semen a nažky. Oleje obsažené v nažkách je zhruba 20-45 %, v semenech pak 42-63 %. Pokud máme kvalitní slunečnicový olej, pak velmi prospívá pokožce, svým složením totiž připomíná lidský kožní maz, podobá se tedy přirozeným lipidům pokožky. Když se zaměříme na složení oleje, pak obsahuje 5-8 % kyseliny palmitové, 0,1-0,4 % kyseliny palmitolejové, 4-6 % kyseliny stearové, 15-25 % kyseliny olejové, 62-70 % kyseliny linolové, 0,2-1,4 % kyseliny linolenové, 0,0-0,3 % kyseliny arachidonové, 0,2-1,0 % kyseliny eikosanové a 0,5-1,1 % kyseliny behenové. Díky nízkému obsahu kyseliny linolenové, má slunečnicový olej vysokou trvanlivost. Obsahuje také karotenoidní látky, které mohou vykazovat i částečnou antioxidační aktivitu [13].

2.4.2 Olivový olej

Je typický pro oblast okolo Středozevního moře, získává se u Olivy obecné (*Olea sativa*, L.) a jeho dužina obsahuje až 60 % oleje. Olivový olej má zvláčňující a protizánětlivé účinky, používá se jako složka přípravků na ochranu proti slunečnímu záření a na citlivou a rozpraskanou pokožku. Samotný olivový olej obsahuje 60-85 % kyseliny olejové, 9-14 % kyseliny linolové a 1 % kyseliny linolenové. Pokud máme olivový olej lisovaný za studena, pak obsahuje i vitamíny A a E, které mají antioxidační účinky [13].

2.4.3 Kokosový olej

Kokosový olej se získává z Palmy kokosové (*Cocos nucifera* L.), konkrétně z usušené bílé dužiny z kokosového ořechu, která obsahuje 55-65 % oleje. Kokosový olej má různý vzhled v závislosti na teplotě okolního prostředí. Rozpouští se totiž při 25°C. Je velmi vhodný k ošetření pokožky, po jeho aplikaci je pokožka hladká a jemná. Olej obsahuje 6-10 % kyseliny kaprylové, 5-10 % kyseliny kaprinové, 39-54 % kyseliny laurové, 15-23 % kyseliny myristové, 6-11 % kyseliny palmitové, 1-4 % kyseliny stearové, 4-11 % kyseliny olejové a 1-2 % kyseliny linolové [13].

2.4.4 Sójový olej

Získává se z bobů Sóji luštinaté (*Soja hispida*), které obsahují 12-22 % oleje. Sojový olej je také velmi bohatý na obsah lecitinu a používá se jako výchozí surovina pro celou škálu výrobků z oblasti přírodní kosmetiky, jako například stabilizátorů, saponátů nebo emulgátorů. Má velmi dobré změkčovací schopnosti, posiluje obranyschopnost pokožky a také zabraňuje vysychání pokožky. Používá se tedy velmi často ve výživných krémech a prostředcích na hydrataci pokožky. Samotný sójový olej obsahuje 8-13 % kyseliny palmitové, 0,2 % kyseliny palmitolejové, 2-5 % kyseliny stearové, 17-26 % kyseliny olejové, 4-10 % kyseliny linolenové a 50-62 % kyseliny linolové [13].

2.4.5 Mandlový olej

K získávání oleje se používá jádro plodu mandloně obecné (sladké), (*Prunus amygdalis* var. *Dulcius*). Olej vyrobený ze sladkých mandlí je velmi bohatý na esenciální mastné kyseliny a je velmi oblíbenou složkou kosmetických přípravků. Co se týká složení oleje, tak se v něm nachází asi 6-8 % kyseliny palmitové, 0,5-2 % kyseliny stearové, 64-82 % kyseliny olejové a 8-28 % kyseliny linolové [13].

2.4.6 Bambucké máslo

Bambucké máslo se získává z rostliny *Butyrospermum parkii*, česky máslovníku afrického. Tato rostlina je zajímavá tím, že začíná naplno plodit až po 40 letech růstu. Máslo se získává z jader plodů, ze 4 kg jader získáme zhruba 1,5 kg bambuckého másla. Bambucké máslo tvoří hlavní aktivní složku těch nejkvalitnějších krémů, má výbornou schopnost zjemňovat pokožku. Má také velmi dobré vlastnosti jako ochrana pokožky proti UV paprskům. Obsahuje kyselinu skořicovou, která má ochranné vlastnosti. Bambucké máslo obsahuje 3-5 % kyseliny palmitové, 30-45 % kyseliny stearové, 40-45 % kyseliny olejové a 3-9 % kyseliny linolové [13].

2.4.7 Olej z hroznových jader

Tento druh oleje se získává z rostliny *Vitis vinifera*, česky réva vinná. Hroznová jádra obsahují velmi malé množství oleje, zhruba 5-20 %. Díky nízkému obsahu oleje v jádře je jeho výroba velmi náročná, dá se získávat jen rafinací. Je hojně využíván v mýdlárnách při výrobě tekutých mýdel. Při výrobě kosmetických přípravků se používá díky své nízké ceně poměrně hojně, má zvláčňující vlastnosti a vytváří na pokožce ochrannou vrstvu. Obsahuje 5-11 % kyseliny palmitové, 0,5 % kyseliny palmitolejové, 3-6 % kyseliny stearové, 12-28 % kyseliny olejové a 58-78 % kyseliny linolové [13].

2.4.8 Meruňkový olej

Meruňkový olej se získává z meruňky obecné (*Prunus armeniaca*). Získávání oleje z jader meruňek je poměrně finančně náročné a jeho složení se jen velmi málo liší od mandlového oleje, bývá tedy často zaměňován nebo falšován. Pokožka jej velmi rychle vstřebává a dodává jí vysoké dávky provitaminu A. Má velmi lehkou strukturu a dobře působí na suchou a citlivou pleť. Meruňkový olej obsahuje 3,6-6,6 % kyseliny palmitové, 0,5-1,0 % kyseliny palmitolejové, 0,5-1,5 % kyseliny stearové, 58-74 % kyseliny olejové, 25-30 % kyseliny linolové a 0,3 % kyseliny alfa-linolenové [13].

2.4.9 Jojobový olej

Jojobový olej se získává ze simondsie čínské (*Simmondsia chinensis*). Semena jojoby jsou velmi bohatá na olej, obsahují ho až 60 %. V surové formě se vyskytuje jako tekutý vosk, bývá základem balzámů a tyčinkových deodorantů. Na pokožku má velmi příznivý vliv, je považován za velmi účinnou složku přípravků určených k péči o pleť a také za aktivní látku zpomalující stárnutí pokožky. Používá se také v šamponech, kondicionérech, mýdlech, různých krémech a v opalovacích prostředcích nebo i v rtěnkách. Chemicky jojobový olej považujeme za vosk, obsahuje totiž směs esterů mastných kyselin s mastnými alkoholy, je velmi citlivý na teplotu, v chladu tuhne. Jeho použití je ideální na rozpraskanou pokožku, je ale i ideální pro mírnění produkce kožního mazu, tedy pro skupinu lidí se sklonem k mastné pleti. Obsahuje 0-2 % kyseliny palmitové, 10-13 % kyseliny olejové, 66-71 % kyseliny eikosanové, 0-1 % kyseliny behenové a 14-20 % kyseliny dokosenové. Obsahuje také mastné alkoholy eikosanol, dokosanol, tetrakosanol, oktadekanol a další [13].

2.5 Esenciální oleje

Mezi esenciální oleje patří oleje s intenzivní vůní a chutí. V rostlinách se nachází v siličných nádržkách a kanálcích. Jejich obsah je velmi proměnlivý a obvykle relativně nízký, proto je jejich získání velmi náročné, používá se většinou technologie destilace vodou a parou [12].

Esenciální oleje jsou také známé tím, že mají antimikrobiální účinky, mohou tedy fungovat jako konzervanty. Tato vlastnost je jim přisuzována díky tomu, že jsou složeny z mnoha aktivních složek, jako jsou terpeny, terpenoidy, karotenoidy, kumariny a kurkuminy (viz *Obrázek 5*). Jejich použití je velmi vhodné, protože patří mezi přírodní látky. Esenciální oleje se často používají k ochucení nebo dodání vhodného aroma v potravinářských nebo kosmetických výrobcích.

Kromě antimikrobiální aktivity mohou esenciální oleje fungovat také jako antioxidanty nebo insekticidy.

Například esenciální olej získaný z blahovičnicku kulatoplodého (*Eucalyptus globulus*) má antimikrobiální účinky proti bakteriím *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Účinkuje tedy proti gram-negativním i gram-positivním bakteriím [15].

2.5.1 Eukalyptus kulatoplodý (*Eucalyptus globulus*)

Olej z eukalyptu se získává destilací párou z listů, obsahuje 1,8-Cineole (Eucalyptol), který tvoří 58-80 %, dále Alpha-pinene z 10-22 %, limonene z 1-8 %, para-cymene z 1-5 %, trans-pinocarveol z 1-5 %, aromadendrene z 1-5 % a globulol z 0,5-1,5 %. Už domorodci používali listy eukalyptu na desinfekci ran, u samotného esenciálního oleje pak byly prokázány antimikrobiální účinky. Stromy eukalyptu byly dokonce vysazovány v severní Africe, kde úspěšně zabraňovaly šíření malárie, účinkuje tedy i na odpuzování hmyzu. Jeho vůně podporuje zdraví, pohodu, čištění a léčení [16].

2.5.2 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

U levandule se olej získává destilací párou z květů. Získaný esenciální olej obsahuje 24-45 % linalyl acetatu, 25-38 % linaloolu, 5-12 % camphoru, 4-10 % cis-beta-ocimenu, 1,5-6 % trans-beta-ocimenu a 2-6 % terpinen-4-olu. Olej má antiseptické, antimykotické, protinádorové a protikřečové účinky, působí také proti nadměrnému kožnímu mazu. Jeho vůně je uklidňující a vyvažující, zlepšuje koncentraci a duševní čilost [16].

2.5.3 Tea tree – Kajeput střídavolistý (*Melaleuca alternifolia*)

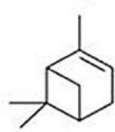
Esenciální olej se získává destilací párou z listů a obsahuje 30-45 % terpinenolu-4, 10-28 % gamma-terpinenu, 5-13 % alpha-terpinenu, 0-15 % 1,8-cineolu (eucalytol), 1,5-8 % alpha-terpineolu, 0,5-12 % para-cymenu, 0,5-4 % limonenu, 0-7 % aromadendrenu, 0-8 % delta-cadinenu a 1-6 % alpha pinenu. Vyznačuje se tím, že má antimikrobiální a antiseptický účinek. Jeho vůně podporuje čištění a čistotu [16].

2.5.4 Pomerančovník čínský (*Citrus sinensis*)

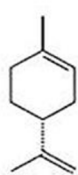
Olej z pomerančovníku se získává lisováním za studena z kůry a obsahuje 85-96 % limonenu a 0,5-3 % myrcenu. Má protinádorový a protisrážlivý účinek, jeho vůně působí antidepressivně a navozuje relaxaci [16].

Terpenes

Monoterpenes



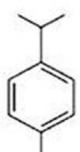
α -Pinene



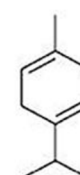
Limonene



Sabinene

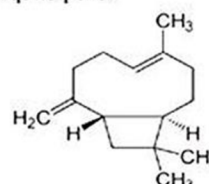


p-cymene



γ -Terpinene

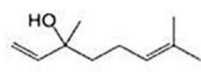
Sesquiterpenes



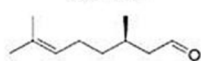
β -Caryophyllene

Terpenoids

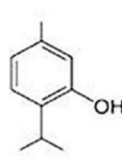
Monoterpenoids



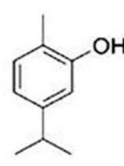
Linalool



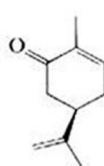
Citronellal



Thymol



Carvacrol

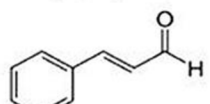


Carvone

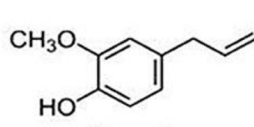


Borneol

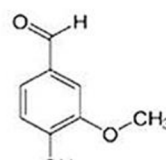
Phenylpropanoids



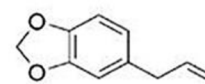
Cinnamaldehyde



Eugenol

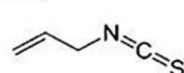


Vanillin

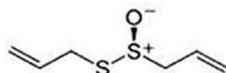


Safrole

Others



Allyl-isothiocyanate



Allicin

Obrázek 5: Vybrané složky esenciálních olejů [15]

2.6 Mastné kyseliny

K výrobě krémů se obvykle nejvíce používá voda a oleje. Oleje jsou složeny z různých mastných kyselin, které jsou navázány esterovou vazbou na glycerol a tvoří tak triacylglyceroly. Mastné kyseliny mají různý vzhled. Jejich společným znakem je přítomnost karboxylové skupiny a uhlíkatého řetězce s různým počtem uhlíků i jednoduchých a dvojných vazeb. Podle přítomnosti násobných vazeb se dělí na nasycené, které neobsahují dvojně vazby a na nenasycené, které obsahují minimálně jednu dvojnou vazbu. Pokud obsahují pouze jednu dvojnou vazbu, označují se jako mononenasycené, v případě přítomnosti více dvojných vazeb pak jako polynenasycené.

Další dělení, které se pro mastné kyseliny používá je na esenciální a neesenciální. Esenciální mastné kyseliny si není lidské tělo samo schopno vytvořit a do této skupiny se řadí kyseliny s větším množstvím dvojných vazeb, jako kyselina linolová, linolenová nebo arachidonová. Neesenciální mastné kyseliny si lidské tělo umí samo syntetizovat, patří sem například kyselina palmitová, stearová nebo olejová [17].

2.6.1 Nasycené mastné kyseliny

Pro nasycené mastné kyseliny se též používá zkratka SAFA, tedy saturated fatty acids. Obsahují od 4 do 60 atomů uhlíku a mají obvykle rovný, nerozvětvený řetězec. Kromě systematického názvosloví, se u těchto kyselin velmi často používá názvosloví triviální (viz *Tabulka 3*). Mezi nejobvyklejší nasycené mastné kyseliny patří kyselina palmitová, která se vyskytuje skoro ve všech živočišných i rostlinných lipidech [17].

Tabulka 3: Základní nasycené mastné kyseliny [17]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Triviální názvosloví
Butanová	4	Máselná
Hexanová	6	Kapronová
Oktanová	8	Kaprylová
Dekanová	10	Kaprinová
Dodekanová	12	Laurová
Tetradekanová	14	Myristová
Hexadekanová	16	Palmitová
Oktadekanová	18	Stearová
Eikosanová	20	Arachová
Dokosanová	22	Behenová
Tetrakosanová	24	Lignocerová

2.6.2 Nenasycené mastné kyseliny

Jak už bylo popsáno výše, nenasycené MK se dělí na mononenasycené, neboli MUFA – monounsaturated fatty acids a polynenasycené, tedy PUFA – polyunsaturated fatty acids. Pokud se zaměříme na obecné složení olejů a lipidů, pak oleje mohou obsahovat až 90 % nenasycených mastných kyselin a naopak tuky jich obsahují méně, cca kolem 50-70 % [17].

Mononenasycené mastné kyseliny díky přítomnosti dvojné vazby tvoří izomery označované cis a trans. Nejběžnějším zástupcem je kyselina olejová, která se nachází jak v rostlinných tak i v živočišných olejích (viz *Tabulka 4*) [17].

Tabulka 4: Základní mononenasyčené mastné kyseliny [17]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Poloha dvojně vazby a izomerie	Triviální názvosloví
Decenová	10	4-cis	Obtusilová
Decenová	10	9-cis	Kaprolejová
Dodecenová	12	3-cis	Linderová
Dodecenová	12	9-cis	Laurolejová
Tetradecenová	14	4-cis	Tsuzová
Tetradecenová	14	9-cis	Myristolejová
Hexadecenová	16	9-cis	Palmitolejová
hexadecenová	16	9-trans	Palmitelaidová
Oktadecenová	18	6-cis	Petroselová
oktadecenová	18	6-trans	Petroselaidová
oktadecenová	18	9-cis	Olejová
oktadecenová	18	9-trans	Elaidová

Polynenasycené mastné kyseliny opět mohou tvořit různé izomery, v literatuře se v jejich názvosloví setkáváme i s označením ω -6 nebo ω -3 mastné kyseliny. Toto označení udává, že se dvojná vazba nachází na 6. nebo 3. uhlíku od konce řetězce. Nejobvyklejším zástupcem polynenasycených mastných kyselin je kyselina olejová (viz Tabulka 5) [17].

Tabulka 5: Základní polynenasycené mastné kyseliny [17]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Poloha dvojně vazby a konfigurace	Triviální název
oktadekadienová	18	9,12-cis, cis	Linolová
oktadekadienová	18	9,12-trans, trans	Linolelaidová
oktadekatrienová	18	9,12,15 – all-cis	α -linolenová
oktadekatrienová	18	6,9,12 - all-cis	γ -linolenová
eikosatetraenová	20	5,8,11,14 - all-cis	Arachidnová
dokostetraenová	22	7,10,13,16 - all-cis	Adrenová

2.7 Mikrobiální kontaminace a konzervanty

2.7.1 Druhy mikrobiální kontaminace

Mikrobiální kontaminace se dělí na dva druhy, a to na kontaminaci primární a sekundární. V prvním případě dochází ke kontaminaci přímo surovin nebo vody, ze kterých je kosmetický přípravek vyroben. Ve druhém případě pak kontaminace nastává během výroby kosmetického přípravku ve výrobních prostorách, zařízeních nebo jej kontaminují lidé, tedy zaměstnanci, a nebo už přímo spotřebitelé kosmetického přípravku.

Na problém se naráží hlavně při práci s novými nevyzkoušenými surovinami, které mohou být vhodnou živnou půdou pro mikroorganismy nebo při práci s fyziologicky účinnými látkami, které se nemohou tepelně zpracovat. S tímto se můžeme setkat hlavně při výrobě raw kosmetiky, kde nesmí být kosmetický přípravek během výroby zahříván na teplotu vyšší než 42°C [2].

Hlavním zdrojem mikrobiální kontaminace je voda, která je typickou složkou naprosté většiny kosmetických přípravků, a dokonce i destilovaná voda umožňuje metabolismus a množení mikroorganismů [19].

2.7.2 Podmínky ovlivňující mikrobiální kontaminaci v kosmetických přípravcích

Jak už bylo popsáno výše, mikroorganismy pro svůj růst potřebují relativně velké dostupné množství vody, ale i v případě, kdy je vody ve výrobku nedostatek mohou v něm přežít různé spory nebo cysty, které jsou schopné přežít i v extrémnějších podmínkách. Požadavky vody pro přežití a růst organismů jsou vyjádřeny jako aktivita vody a_w , která udává obsah volné vody, která není vázaná na žádné složky. Mikroorganismy tedy tuto vodu mohou využívat pro svůj růst.

Mezi další faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů patří i to, jaký druh kosmetického přípravku je vyráběn, každý totiž nabízí různé prostředí. Jak už bylo popsáno výše, nejohroženější pro kontaminaci mikroorganismy jsou vodné roztoky, pokud ovšem máme dostatečně vysoké pH a vysoký osmotický tlak můžeme růstu MO zabránit. U emulzí O/V je vyšší pravděpodobnost kontaminace než u emulzí V/O, také různé práškové přípravky a kompaktní pudre podporují růst MO. Na těchto pudrech se můžou na povrchu vyskytovat i plísně.

Při výběru surového materiálu pro výrobu kosmetického přípravku je také důležité dbát na to, aby nebyl materiál kontaminovaný, zvláště u bio kosmetiky, kde se používají přírodní materiály, může být materiál poměrně hodně kontaminovaný. Mezi tyto materiály patří například talek, bentonit, kaolín, různé pigmenty, přírodní gumy, rostlinné extrakty, vajíčka, škroby, vitamíny, enzymy. Výrobci by tedy měli hledat prodejce, kteří prodávají materiál v ochranných obalech a specifikují, jestli je daný materiál kontaminovaný nebo ne.

K redukci kontaminace by měl být kosmetický přípravek při výrobě tepelně ošetřen, a to nejlépe tak, že vodní fáze by měla být zahřívána minimálně 30 minut a olejová fáze 10-15 minut při 85-90°C v nerezové nádobě zahříváné parou. Pokud je vyráběn produkt, který se během výroby nezahřívá, pak by měla být provedena mikrobiologická kontrola všech použitých surovin.

Při balení kosmetického přípravku jsou obvykle skleněné láhve sterilizovány, může být provedena i kontrola, kdy se pár z vysterilizovaných lahví promyje sterilní vodou a u té se poté provedeno mikrobiologická kontrola.

Další a snad i nejdůležitější věcí, kterou se výrobce musí zabývat je výběr vhodného konzervantu, který zamezí růstu MO [20].

2.7.3 Mikroorganismy v kosmetických přípravcích

Pseudomonas. *P. aeruginosa*, *P. maltophilia*, *P. paucimobilis*, *P. cepacia*. Tyto mikroorganismy můžeme nalézt v různých prostředích. Jsou velmi variabilní na přizpůsobování se okolním podmínkám, jsou např. schopné adaptovat se i na různé toxické chemikálie zahrnující i biocidy. Pseudomonasy patří mezi mikroorganismy, které způsobují infekce ran a spálenin. V případě, že se vyskytnou v kosmetickém výrobním závodě, tak se obvykle objevují v důsledku selhání kontroly a monitorování vodního systému. Příčinou může být nedostatečná sanitace nebo se mohou vyskytnout ve slepých koncích potrubí, kde může docházet ke stagnaci produktu.

Serratia. Mikroorganismy z rodu *Serratia* rozkládají cukry na pyruvát, který je dále redukován na butandiol, ethanol nebo oxid uhličitý. Mohou se nacházet v kontaminovaných desinfekčních prostředcích nebo v povrchově aktivních látkách, tedy například emulgátorech. Příčiny způsobující kontaminaci výrobků jsou obdobné jako u *Pseudomonas*.

Escherichia. Patří do kmene *Enterobacteriaceae*. Produkují laktát, acétát, sukcinát a buď formiát nebo vodík, plynný oxid uhličitý a ethanol. Patří mezi hlavní mikroorganismy nacházející se ve střevech člověka, a jsou tedy brány jako ukazatel na případné fekální znečištění vody. Některé kmeny způsobují gastroenteritidu nebo infekce močových cest. Obvykle se tyto mikroorganismy nachází ve starších vodních systémech nebo v systémech, jejichž potrubí obsahují velké vrstvy biofilmu.

Enterobacter. Mikroorganismy patřící do kmene *Enterobacter* produkují butandiol, ethanol a oxid uhličitý. Jedná se o typický kontaminant v domácnosti a může růst ve slabě konzervovaných produktech. Mezi druhy, které kontaminují kosmetické přípravky, patří *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter gergoviae* a *Enterobacter cloacae*. Tyto organismy se vyskytují v půdě a často napadají rostlinná pletiva, což může způsobovat různé nekrózy. Obecně nejsou považovány za lidské patogeny, pokud nejsou přímo vpraveny do krevního řečiště.

Klebsiella. Tento mikroorganismus je obecně velmi rozšířený, patří mezi lidské patogeny, některé druhy patří mezi komenzály. Vyskytují se především v půdě a ve vodě a jsou také patogeny rostlin. *Klebsiella pneumoniae* může způsobovat pneumonii u lidí, kteří jsou fyzicky oslabení nebo jsou oslabení v důsledku zvýšené konzumace alkoholu. Mikroorganismy jsou nepohyblivé a běžně se nachází v domácnosti, mohou tedy kontaminovat kosmetiku prostřednictvím spotřebitele během užívání.

Proteus. Organismy jsou pohyblivé a produkují plynný sirovodík, jsou typické svým speciálním pohybem nazvaným rojení. Obvykle se nachází ve střevech lidí a zvířat a v místech kontaminovaných fekáliemi. Mohou způsobovat hnisavé infekce v různých částech těla, pokud dojde k zanesení mikroorganismů do těla, např. infekce ran. Jejich přítomnost v kosmetice indikuje kontaminaci surovin, jako například povrchově aktivních látek nebo použití vody s vysokou hladinou nečistot.

Staphylococcus. Tyto mikroorganismy patří mezi nepohyblivé koky. Některé druhy způsobují tvorbu furunklů – hnisavých ložisek v oblasti vlasových nebo chlupových folikulů, nebo také otravu jídla. Když jsou kultivovány na krevním agaru, *Staphylococcus aureus* produkuje čisté zóny známé jako β -hemolysy, které jsou způsobeny v důsledku lýze červených krvinek. Jeho přítomnost v kosmetických přípravcích indikuje lidskou kontaminaci.

Streptococcus. Vyskytují se v řetězcích. Mohou způsobovat infekci ran a otravu krve. Jejich přítomnost v kosmetických výrobcích je velmi vzácná a může být výsledkem špatně dodržovaných hygienických předpisů, například, kdyby zaměstnanci vložili ruce do produktu nebo obalu na výsledný produkt.

Bacillus. Členové rodu *Bacillus* se vyskytují téměř všude na Zemi. Žijí primárně v půdě, a patří mezi běžné zdroje antibiotik, vytváří spóry. V kosmetickém průmyslu mohou být některé běžné rostlinné suroviny kontaminovány právě spórami. Například aloe vera, pokud se použije pouze pasterace u gelu z aloe vera, nemusí být dostatečná, protože spóry jsou velmi odolné. Místo toho se používá proces tyndalizace – opakovaného ohřevu, který probíhá během po sobě jdoucích třech dnů, spóry během této doby vyklíčí a stanou se tedy náchylné k vyšším teplotám. Výskyt těchto mikroorganismů v kosmetice je tedy nežádoucí, jelikož se členové rodu *Bacillus* vyskytují hlavně v půdě, jejich přítomnost tedy indikuje možné znečištění výrobku půdou.

Clostridium. Opět se nachází hlavně v půdě. Způsobují infekce ran. Mezi hlavní druhy, které způsobují kontaminaci kosmetiky, patří *C. perfringens* a *C. tetani*, představují totiž obdobně jako klostridie možné znečištění půdou [22].

Candida albicans. Kvasinka *Candida albicans* je oválná a tvoří pseudomycelium. Nachází se v lidském těle jako součást mikroflóry v dýchací a trávicí soustavě, a i v genitálním traktu u žen. Kvasinky se mohou stát invazní, když dojde k narušení imunity hostitele. Například při zánětech, které jsou léčeny pomocí antibiotik nebo také v případě popálenin. *Candida* i *Aspergillus* mohou způsobovat mykózy [21].

2.7.4 Antimikrobiální látky a konzervační látky

Při výrobě kosmetiky je nutné dodržovat sterilní podmínky, aby nedošlo ke kontaminaci, zároveň je ale nutné do přípravků přidávat ještě antimikrobiální či konzervační látky, které zaručí, že se v kosmetickém přípravku neobjeví mikrobiální kontaminace už po pár dnech či týdnech v důsledku např. špatného skladování přípravku, či kontaminace při používání ze špinavých rukou [23].

Jako konzervant se dá použít celá řada látek jako jsou například alkoholy nebo parabeny. U bio, raw a veganské kosmetiky však narážíme na problém, že některé z konzervačních látek mohou být syntetické, a tedy i nevhodné k použití. V případě certifikátů je vždy specifikováno, které látky může kosmetický přípravek obsahovat. V biokosmetice můžeme

použit jako konzervant i esenciální oleje, které mohou mít antimikrobiální účinek (viz kap. 2.5).

V přírodní kosmetice se tak může používat například kyselina benzoová, její soli a ethylestery, tato složka se v přírodě nachází například v benzoinu, tedy esenciálním oleji získaném z rostliny *Styrax benzoin*. Dále se používá benzylalkohol, který je obsažen v oleji z jasmínových květů, ale i v dalších esenciálních olejích. Kyselina dehydrooctová a její soli se nachází v květech solandry lesklé (*Solandra nitida*). Jako další se používají kyselina mravenčí, propionová, salicylová nebo sorbová a jejich soli [7].

2.8 Testy používané pro zjištění trvanlivosti kosmetických přípravků

Testy, kterými se zjišťuje trvanlivost nebo také jen účinnost konzervantů se nazývají zátěžové testy. Mohou se používat například pro zjištění minimální koncentrace konzervantů, která se musí přidávat do kosmetických přípravků, aby byla konzervace dostatečně účinná a nedocházelo k růstu nežádoucích mikroorganismů.

Při výrobě nových kosmetických přípravků je nutné provést test pro zjištění účinnosti konzervační látky, který určí, jaká minimální koncentrace konzervantů musí být použita. Když by byla použita příliš nízká koncentrace, pak by po krátké době mohlo dojít ke kontaminaci přípravků a pokud by byla koncentrace zase příliš vysoká mohl by mít přípravek škodlivé účinky na pokožku [21].

2.8.1 EU Pharmacopoeia

Test EU Pharmacopoeia je zavedený už několik let, trvá 28 dní, kdy je sledovaný mikroorganismus zaočkován pouze na začátku testu a pak jsou odebírány vzorky z testovaného přípravku 2., 7., 14. a 28. den po zaočkování. Vzorky jsou poté kultivovány na trypton sojovém agaru (TSA). Pro bakterie existují kritéria A a B, kdy u kritéria A musí po 2 dnech klesnout počet bakterií o 2 logaritmické řády, a po 7 a 14 dnech o 3 logaritmické řády, 28 den už by nemělo docházet ke zvýšení počtu bakterií. U kritéria B pak musí dojít k poklesu počtu bakterií o 3 logaritmické řády po 14 dnech a opět 28 den už by nemělo být zaznamenáno zvýšení počtu bakterií. U plísní platí u kritéria A, že po 14 dnech musí dojít ke snížení počtu buněk od 2 logaritmické řády a po 28 dnech by už nemělo být zaznamenáno zvýšení počtu buněk, u kritéria B je vyhodnocení obdobné, jen po 14 dnech stačí, aby došlo ke snížení počtu buněk o jeden logaritmický řád. Do zkoumaného vzorku musí být vždy naočkována kultura mikroorganismů o koncentraci $10^5 - 10^6$ CFU/ml a k testování se používají mikroorganismy *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger* [24].

2.8.2 US Pharmacopoeia

U test US Pharmacopoeia je testování obdobné jako u EU Pharmacopoeia. Opět je na začátku testování provedeno pouze jedno zaočkování sledovaných mikroorganismů. Test trvá 28 dní, ale odběry vzorků jsou provedeny jen dvakrát. U bakterií se po 14 dnech musí snížit počet buněk o 2 logaritmické řády a po 28 dnech nesmí dojít ke zvýšení počtu bakterií. U plísní pak stačí, že se od zaočkování po 14 a 28 dnech počet buněk nezvýší. Koncentrace kultur zaočkových do vzorků je obdobná jako u testu EU Pharmacopoeia, tedy $10^5 - 10^6$ CFU/ml. K testování se používají mikroorganismy *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger* [24].

2.8.3 Schülke Koko test

Schülke Koko test je velmi vhodný díky tomu, že kultivace sledovaných mikroorganismů probíhá v jednom jediném vzorku kosmetického přípravku na rozdíl od testů popsanych výše, kde se každý zkoumaný mikroorganismus zaočkovává do vzorku zvlášť, můžeme tedy říct, že tímto způsobem Schülke Koko test simuluje podmínky, které nastávají při běžném užívání přípravku spotřebitelem, zaočkování mikroorganismů také neprobíhá jen na počátku testu, ale v 6 za sebou jdoucích cyklech.

Příprava mikroorganismů a samotných vzorků kosmetického přípravku probíhá v několika krocích. Pro započítí testu je nejprve nutné připravit kolonii mikroorganismů vhodnou k zaočkování. Připraví se tedy živné médium do Erlenmeyerovy baňky, do kterého je pak z Petriho misky naočkován požadovaný mikroorganismus, poté se kultura nechá růst. K použití v Schülke Koko testu je nutné, aby zaočkováná kultura nebyla starší než 3 dny. Poté se stanoví počet mikroorganismů v 1 ml kultury, aby do vzorku zkoumaného kosmetického prostředku mohlo být naočkováno alespoň $4 \cdot 10^5$ - $4 \cdot 10^6$ CFU/ml. Očkování probíhá v 6 cyklech po 6 týdnů, kdy každý týden těsně před zaočkováním nové dávky mikroorganismů je proveden odběr vzorku a jeho zaočkování na Petriho misku s TSA, aby mohlo být zjištěno, zda mikroorganismy v daném vzorku rostou nebo nerostou. Pokud ve vzorku během této doby nezaznamenané žádný růst mikroorganismů, pak můžeme prohlásit, že tento vzorek má trvanlivost minimálně 30 měsíců. Pro testování se používají mikroorganismy, které se mohou obvykle vyskytovat v kosmetických přípravcích jak z řad kvasinek, bakterií, tak i plísní, konkrétně pak například *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* a *Penicillium funiculosum* [24].

2.9 Polymerázová řetězová reakce

Principem polymerázové řetězové reakce (PCR) je replikace nukleových kyselin, dochází k opakující se enzymové syntéze vybraných úseků DNA a to ve směru 5' → 3' pomocí DNA-polymerázy.

Nejprve dochází k denaturaci DNA. Dále je úsek, který má být replikován ohraničený připojením dvou primerů, které jsou navázány na protilehlé řetězce DNA, takovým způsobem, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Následně po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů dochází k syntéze nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. Při PCR se používá speciální termostabilní polymeráza např. *Taq* DNA-polymeráza, která je izolovaná z termofilních mikroorganismů *Thermus aquaticus*. Termostabilní polymerázy musí být používány z důvodu, aby nedošlo k jejich poškození při denaturaci DNA, kdy tento proces probíhá při velmi vysokých teplotách a během PCR se několikrát opakuje.

Obecně PCR probíhá ve třech krocích, které se několikrát opakují a probíhají během nich tři odlišně děje.

Tabulka 6: Popis jednotlivých kroků PCR

Krok	Popis děje
1.	Denaturace DNA (94 °C)
2.	Připojení primerů k denaturovaným řetězcům DNA (30-65 °C)
3.	Syntéza nových řetězců pomocí DNA-polymerázy (65-75 °C)

Všechny kroky se provádějí na speciálním zařízení tzv. thermocykleru, kde se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Při opakujících se cyklech exponenciálně roste počet kopií nukleových kyselin 2^n , kde n je počet cyklů. Vytváří se tak až miliarda kopií.

Pro PCR je optimální počet cyklů 25-35. Při vysokém počtu cyklů se zvyšuje i počet vznikajících nespecifických produktů PCR. Rozhodující je také co nejdokonalejší denaturace DNA templátu v prvním kroku, kdy denaturace docílíme zahřátím směsi na 94–97 °C po dobu 2-5 min. Teplota pro připojení primerů se pohybuje zhruba od 55 až po 68 °C po dobu 30-60 s. A poslední krok, syntéza DNA pak probíhá při 68-72 °C.

Výsledným produktem PCR jsou tzv. amplikony, tedy úseky DNA o definované délce a velikosti, která se pohybuje obvykle kolem desítek až tisíce bp. Jejich přítomnost ve směsi se dokazuje pomocí elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu.

Při použití PCR musí být brán velký zřetel, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku, protože i jedna molekula neznámé DNA může vést k získání falešného signálu. Musí být tedy provedena opatření jako desinfekce pracovního povrchu UV-světlem, kdy dojde k odstranění exogenních nukleových kyselin, používání rukavic, a přidání vzorku DNA až jako poslední složky.

Požívá se také varianta PCR, kdy je přímo zaznamenána kvantifikace PCR-produktu v průběhu reakce, tedy v reálném čase, tzv. real-time PCR. Celá kvantifikace naamplifikované DNA se provádí prostřednictvím detekce fluorescenčního signálu v zařízení, které kromě cyklického střídání teplot pro průběh jednotlivých kroků PCR umožňuje i detekci fluorescence, výsledky tedy mohou být průběžně pozorovány přímo na počítači bez nutnosti analýzy elektroforetickou metodou [26].

2.10 Gelová elektroforéza

V molekulární biologii patří elektroforéza k nejpoužívanějším separačním technikám, používá se při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforézy je, že se nabitě molekuly pohybují v elektrickém poli, kdy nukleová kyselina má díky přítomnosti fosfátové skupiny záporný náboj, pohybuje se tedy ke kladně nabitě elektrodě – anodě. U gelové elektroforézy se nejčastěji používá polyakrylamidový nebo agarózový gel. Gel tvoří složitou síťovou strukturu, podle velikostí separovaných nukleových kyselin se používá příslušný druh gelu. Agarózové gely se používají pro separaci nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po 50 kb, zatímco polyakrylamidové gely se používají, pokud se separují menší molekuly o velikosti 10 až 1000 bp. U gelové elektroforézy je rychlost pohybu molekul nukleových kyselin ovlivněna jejich velikostí, kdy menší molekuly prochází gelem rychleji, a

tedy i dál než molekuly větší. Neznámá DNA je srovnávána s DNA o známé velikosti. Po dokončení elektroforézy je k identifikaci a vyhodnocení separovaných molekul potřeba obarvení molekul DNA, aby došlo k jejich zviditelnění. Jako barvivo se používá ethidium bromid, který funguje tak, že se vmezuje mezi sousední páry bází a vytváří komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Po osvětlení jsou molekuly DNA detekovány jako proužky na gelu s různou intenzitou svitu, která závisí na koncentraci DNA. Místo ethidium bromidu se také používá barvivo s komerčním označením SYBR, jedná se o skupinu fluorescenčních kyaninových barviv. Dokonce lze gelovou elektroforézu použít i pro separaci a studium molekul DNA, které se nacházejí v různých typech, lze tedy odlišit kružnicové molekuly DNA od molekul lineárních nebo otevřených [26].

2.11 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie se jako mobilní fáze používá plyn. Vzorek je dávkován do proudu nosného plynu dusíku, vodíku, helia nebo argonu a ten jej dále unáší kolonou. Aby mohl být vzorek unášen mobilní fází, musí být nejdříve přeměněn na plyn, k této přeměně dochází v dávkovači, kde musí být zajištěno odpaření vzorku v co nejkratším čase. Po nastříknutí vzorku do kolony se stacionární fází dochází k separaci složek v koloně dle různé schopnosti složek vzorku poutat se na stacionární fází. Kolony používané v plynové chromatografii mohou mít velmi rozdílné vlastnosti, náplňové kolony bývají vyrobeny ze skla nebo oceli, kdy jejich vnitřní průměr je 2 – 3 mm a mohou mít délku 1 až 3 metry, mají také větší kapacitu než kapilární kolony a jejich náplň mohou tvořit například silikagel nebo hlinitokřemičitany. U kapilárních kolon pak tvoří stacionární fází vnitřní stěna, a to obvykle s křemene. Složky, které opouštějí kolonu, pak indikuje detektor. Mezi nejpoužívanější patří tepelně-vodivostní detektor, plamenový ionizační a detektor elektronového záchytu. Dále se signál z detektoru vyhodnocuje a z časového průběhu se získá kvalitativní informace o složce a z intenzity signálu pak její kvantitativní zastoupení.

Pomocí plynové chromatografie se dají stanovovat látky, které musí být tepelně stálé, mít dostatečný tlak syté páry a jejich relativní molekulová hmotnost je menší 1000. Mezi tyto látky patří například plyny, nedisociovatelné kapaliny, pevné organické molekuly a organokovové látky. Používá se také postup chemické změny analytů, které mají nevyhovující vlastnosti na deriváty, které už jsou pro použití v analýze plynovou chromatografií vhodné [27].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek, bakterií a plísní

Nutrient Broth, Himedia
Agar, Bacteriological, Himedia
D-glukóza bezvodá p.a., Lachner
Kvasničný autolyzát, Himedia
Kaseinový pepton, Carl Roth
Kvasničný extrakt - prášek, Himedia
Tryptonová voda, Himedia
Kaseinový pepton, enzymatic digest, Sigma Aldrich
Chlorid sodný p.a., Lachner

Chemikálie používané při PCR

Agarosa pro elektroforézu, Serva
Nanášecí pufr Yeallow load, Top-Bio
DNA standard, Malamité
Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich
Ethanol p.a., Penta
Ethidium bromid (5 mg/ml), Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva
Fluorescenční barvivo GoldView, Ecoli
Chlorid sodný, Lachema
Lysozym, Serva
Polyethylen glykol (PEG 6000), FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich
Proteináza K, Serva

Chemikálie použité pro plynovou chromatografii

Hexan p.a., Lach-Ner
Methanol p.a., Lach-Ner
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner

Chemikálie použité pro ověření antibakteriálních vlastností esenciálních olejů

Limonen, 97%
Linalool, 97%
Geraniol, 97%
Citral, 95%
Citronellol, 96%
Všechny od firmy Alfa Aesar, a Johnson Matthey Company, Germany

3.2 Použité mikroorganismy

Serratia marcescens CCM 8587
Micrococcus luteus CCM 1569
Candida glabrata CCM 8270
Aspergillus niger F8189
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955
Escherichia coli CCM 3988

3.3 Složení kultivačních médií

YPD médium

20 g/l	Pepton
20 g/l	Glukóza
10 g/l	Kvasničný extrakt
20 g/l	Agar

LB médium

10 g/l	Trypton
5 g/l	Kvasničný extrakt
5 g/l	NaCl

NB médium

25 g/l	Nutrient Broth
--------	----------------

TSA médium

41,5 g/l	Trypton sojový agar
----------	---------------------

3.4 Další složky použité při PCR

Roztoky na PCR

Směs B (1M Tris-HCl, pH 7,8; 0,5M EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml)

TE pufr (1M Tris-HCl, pH 7,8; 0,5M EDTA, pH 8,0; destilovaná voda)

Komponenty pro PCR

PPP Master mix (směs DNA-polymerázy, směs dNTP, PCR pufr s Mg^{2+} ionty) (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

Primery specifické pro doménu *Bacteria*

Primery specifické pro kvasinky *Candida glabrata*

Magnetické nosiče

F-kol B 77 ox (2 mg/ml) připravené Ing. Danielem Horákem CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze.

3.5 Přístroje

Plynový chromatograf TRACE GC (Thermoquest Italia S. p. A., Itálie) s plamenovo-ionizačním detektorem. Split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,125 μ m

Počítač PC, Intel Pentium Procesor

Thermal cycler DNA Engine, BIO-RAD Lab., USA

3.6 Další složky použité pro plynovou chromatografii

Chemikálie použité pro přípravu vzorku na GC

Hexan p.a., Lach-ner

Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner

Methanol p.a., Lach-ner

Plyny

Dusík 5.0 SIAD v tlakové nádobě s redukčním ventilem FMO

Vodík 5.5 v tlakové nádobě s redukčním ventilem

Vzduch 5.0 SIAD v tlakové nádobě s redukčním ventilem FMO


3.7 Zkoumané vzorky krémů a jejich složení

Pro praktickou část byly vybrány 3 vzorky krémů, které jsou k dostání v obchodní síti a dále 3 vzorky krémů pocházející z domácí výroby. Jako komerční krémy byly vybrány: krém značky Lavera, značky URTEKRAM a značky Neobio. Každý z těchto produktů je držitelem alespoň jednoho certifikátu. Stejně tak i krémy z domácí výroby jsou vyrobeny tak, aby splňovala kritéria pro získání certifikátů, konkrétně certifikátu NATRUE.

Tabulka 7: Základní informace zkoumaných krémů

Název krému	Složení
<p>Lavera - pleťový a tělový krém</p> <ul style="list-style-type: none">– Certifikáty: Natrue, Vegan– Datum spotřeby: 07/2019 	<p>Water (aqua), Glycine soja (Soybean) Oil, Alcohol, Glycerin, Butyrospermum Parkii (Shea Butter), Cetyl Alcohol, Cetearyl alcohol, Glyceryl Stearate Citrate, Helianthus Annus (sunflower) seed oil, Prunus Amygdalus Dulcius (sweet Almond) oil, Prunus Amygdalus Dulcius (sweet Almond) seed extract, Calendula Officinalis Flower extract, Potassium Cetyl Phosphate, Beta-Carotene, Xanthan Gum, Tocopherol, Helianthus Annus (sunflower) seed oil, Ascorbyl Palmitate, Fragrance (Parfum), Limonene, Linalool, Geraniol, Citral, Citronellol, Benzyl Benzoate, Benzyl Alcohol</p>
<p>Neobio – jemný krém na ruce Bio Aloe & Oliva</p> <ul style="list-style-type: none">– Certifikáty: Natrue– Datum spotřeby: 6 měsíců po otevření 	<p>Aqua (water), Alcohol denat., Cocos Nucifera (coconut) oil, Butyrospermum Parkii (Shea) Butter, Palmitic acid, Stearic Acid, Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Isoamyl Laurate, Cetearyl Alcohol, Cetearyl Glucoside, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Vitis Vinifera (grape) Seed Oil, Xanthan gum, Sodium PCA, Betaine, Sodium Lactate, Tocopherol, Helianthus Annus (Sunflower) Seed Oil, Lactic Acid, PCA Ethyl Cocoyl Arginate, Parfum (essential oils), Limonene, Linalool, Coumarin</p>

Název krému	Složení
<p>URTEKRAM – tělové mléko bez parfemace</p> <ul style="list-style-type: none"> – Certifikáty: Vegan, Cruelty Free, Cosmos organic – Datum spotřeby: 6 měsíců po otevření <div data-bbox="406 474 624 759" data-label="Image"> </div>	<p>Aqua, Butyrospermum parkii butter, Olea europaea oil, Aloe barbadensis Leaf extract, Polyglyceryl-3-dicitrate/stearate, glycerin, Zea mays starch, Cetyl alcohol, Cococaprylate, Zea mays starch, Glyceryl caprylate, Glyceryl stearate se, punus armeniaca karnel oil, Simmondsia chinensis seed oil, Xanthan Gum, Tocopherol, Beta-sitosterol, squalene</p>
<p>Vyživující krém</p> <div data-bbox="314 913 715 1305" data-label="Image"> </div>	<p>Aqua, Simmondsia chinensis seed oil, Punus armeniaca kernel oil, Caprilis oil, Glyceryl Stearate citrate, Butyrospermum parkii (Shea) butter, Cetearyl alcohol, skvalan, panthenol, allantoin, tee tree oil, eukalyptus essential oil, orange essential oil</p>
<p>Univerzální levandulový krém</p> <div data-bbox="240 1480 790 1890" data-label="Image"> </div>	<p>Aqua, Aloe Barbadensis Leaf extract, Oryza Sativa Bran oil, Olea Europea oil, Vitis Vinifera seed oil, Cocos Nucifera oil, Behentrimonium methosulfate, Cetearyl alcohol, Lavandula Angustifolia oil, Benzyl alcohol, Dehydro Acetic, Sorbic and Benzoic acid, Hydrolyzed Silk protein, Tocopherol</p>

Název krému	Složení
<p>Krém na zralou pleť</p> 	<p>Aqua, Rosa Mosqueta Juice, Olea Europea oil, Vitis Vinifera seed oil, Fish oil, Soya Been Oil, Daucus Carota Sativa Root Extract, Beta-Carotene, Behentrimonium-methosulfate, Cetearyl alcohol, Glycerine, Canaga Odorata oil, Vanilla Planifolia oil, Benzyl alcohol, Dehydro Acetic, Sorbic and Benzoic acid, Tocopherol, Hydrolyzed Silk protein, Hyaluronic Acid</p>

3.8 Kontrola potenciální kontaminace z výroby

V rámci praktické části bakalářské práce ještě před započítím přímo Schülke Koko testu, byla provedena kultivace jednotlivých krémů jen na TSA, abychom potvrdili, že krém z výroby opravdu neobsahuje žádnou mikrobiální kontaminaci.

Příprava vzorků na kultivaci probíhala tak, že z každého vybraného krému byl odebrán 0,1 g do zkumavky, k této navážce pak bylo přidáno 0,9 ml sterilní dest. H₂O a pak bylo provedeno desítkové ředění až po hodnotu 10⁻⁵. Kultivace na TSA v Petriho miskách byla provedena pro ředění 10⁻³ a 10⁻⁵, kdy na agar bylo naneseno vždy 0,1 ml roztoku příslušného ředění. Pro kontrolu byly vzorky pro každé ředění kultivovány na dvou Petriho miskách a to po dobu 69 hodin, po této době byly vzorky vyhodnoceny. Ředění i roztěr na agar byly prováděny v boxu předem vysterilovaným UV zářením, aby bylo zamezeno kontaminaci z ovzduší.

3.9 Kontrola potenciální kontaminace z výroby metodou PCR

3.9.1 Lýze buněk a izolace DNA

Nejprve byla provedena lýze buněk ze zkoumaných vzorků krémů. Bylo odebráno 0,3 g krému ve sterilním prostředí. Poté bylo přidáno 0,6 ml směsi B a vzorky byly kultivovány hodinu při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinázy K poté byly vzorky inkubovány při 55°C do dalšího dne. Dále byla provedena izolace DNA, kdy do Eppendorfových zkumavek byla připravena směs o následujícím složení viz *Tabulka 8*.

Tabulka 8: Složení směsi pro izolaci DNA

Pořadí	Složka	Objem (μl)
1.	NaCl (5M)	400
2.	DNA (lyzát)	100
3.	PEG 6000 (40%)	400
4.	Magnetický nosič (2 mg/ml)	100
Výsledný objem		1000

Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě, poté byla krátce stočena na minicentrifuze a dále byla umístěna do magnetického separátoru. Kdy byly magnetické částice separovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl ze zkumavky odebrán supernatant a byl přidán 1 ml 70% ethanolu, vzorky byly vloženy do magnetického separátoru, ethanol byl odebrán a poté byly ještě magnetické částice promyty 0,5 ml ethanolu. Zkumavky poté byly přendány do exsikátoru, aby se odpařil zbylý ethanol.

Po odpaření ethanolu bylo do zkumavek přidáno 50 μl TE pufru. Zkumavky byly inkubovány 2,5 hodiny při laboratorní teplotě, dále byly zkumavky umístěny na magnetický nosič a byl odebrán eluát obsahující DNA do Eppendorfových zkumavek.

3.9.2 Polymerázová řetězová reakce

Ve sterilním boxu byla připravena směs na stanovení bakteriální i kvasinkové DNA o následujícím složení viz Tabulka 9. U negativní kontroly byl 1 μl matrice DNA nahrazen 1 μl vody. U pozitivní kontroly byla pro doměnu *Bacteria* použita DNA *Lactobacillus casei ssp. Casei* CCM 7088^T a pro kvasinky DNA *C. glabrata* CCM 8270.

Tabulka 9: Složení PCR směsi

Složka	Objem (μl)
Voda pro PCR	18
PCR pufr	2,5
Směs Dntp	0,5
Primer 1	1
Primer 2	1
<i>Taq</i> DNA-polymeráza	1
Matrice DNA	1
Celkem	25

Tabulka 10: Seznam specifických primerů pro PCR reakce

Specifická PCR	Primer	Sekvence 5' – 3'	Velikost produktu PCR (bp)	reference
Doména <i>Bacteria</i>	F eub	TCC TAC GGG AGG GAG CAG CAG T	466	[28]
	R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
kvasinky	Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152	[29]
	Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC		

Po přípravě PCR směsi byl zapnut thermocycler se speciálním programem pro PCR kvasinek a bakterií viz Tabulka 11.

Tabulka 11: Použité amplifikační programy

Krok cyklu		Specifita PCR	
		Doména <i>Bacteria</i>	Kvasinky
1	Denaturace DNA před 1. cyklem	95°C/5 min	94°C/5 min
2	Denaturace	95°C/30 s	94°C/60 s
3	Připojení primerů	55°C/30 s	51°C/30 s
4	Syntéza DNA	72°C/60 s	72°C/60 s
5	Dosyntetizování řetězce v posledním cyklu	72°C/5 min	72°C/5 min
6	Počet cyklů	35	35

3.9.3 Gelová elektroforéza DNA

Na gelovou elektroforézu byl připraven 1,6% agarosový gel navážením 1,92 g agarosu, která byla rozpuštěna ve 120 ml 0,5 × TBE pufru a do směsi byl přidán 1 µl interkalačního činidla Gold view a směs byla následně rozpuštěna a rozvařena v mikrovlnné troubě. Vzniklý roztok byl ponechán chvíli stát a poté byl nalit do vaničky s hřebínkem. K produktům PCR bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru a zkumavky byly krátce centrifugovány. Po zatuhnutí gelu byl z gelu vyjmut hřebínek a do vzniklých jamek bylo pipetováno vždy 30 µl z každého vzorku, také bylo nanášeno 5 µl DNA standardu (100bp žebříček). Vanička s gelem a nanesenými vzorky byla poté vložena do elektroforetické vany a převrstvena 0,5 × TBE puftrem. Samotná elektroforéza probíhala 2,5 hodiny při napětí 70 V. Jakmile elektroforéza skončila, tak byl gel vložen do barvicího roztoku ethidiumbromidu zhruba na 20 minut a poté bylo provedeno vyhodnocení na transilluminátoru v UV světle a výsledky byly fotograficky zdokumentovány.

3.10 Schülke Koko test

U Schülke Koko testu byla nejprve provedena příprava inokulačních médií s vybranými mikroorganismy, byly vybráni dva zástupci bakterií, a to *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Jeden zástupce za kvasinky *Candida glabrata* a jeden zástupce za plísně *Aspergillus niger*. Do Erlenmayerových baněk bylo připraveno pro bakterie LB médium, pro kvasinku YPD médium. Pro plísně bylo připraveno médium ze sladu. Inokula byla dále ponechána 2 dny kultivovat při 30°C. Po dvou dnech kultivace bylo dohromady z každé kultury zaočkováno $4 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ CFU/ml do 10 g vzorku vždy ve sterilním prostředí boxu. Sedmý den po zaočkování bylo provedeno kontrolní očkování vzorku na Petriho misku s TSA pro ředění 10^{-3} a 10^{-5} a hned poté bylo provedeno zaočkování další dávky vybraných mikroorganismů do 10 g vzorku krému. Tento postup byl opakován po dobu 6 týdnů.

3.11 Antimikrobiální test u vzorků krémů

Pro potvrzení antimikrobiální aktivity ve vzorcích krémů byl proveden test následujícím postupem. Nejprve byly připraveny kultury mikroorganismů v živném médiu. Byly vybrány tři mikroorganismy, jeden zástupce za kvasinky *Candida glabrata* a jeden zástupce za gram-pozitivní bakterie *Micrococcus luteus* a jeden za gram-negativní bakterie *Serratia marcescens*, kultivace mikroorganismů probíhala 24 hodin.

Další den bylo provedeno zaočkování na Petriho misky obsahující vhodné médium pro vybrané MO, a to pro kvasinky YPD médium a pro bakterie NB médium. Před samotným zaočkováním bylo provedeno zředění kultury u kvasinek 5x a u bakterii 10x. Ze zředěného objemu MO bylo poté pipetováno vždy 0,1 ml na Petriho misky a tento objem byl rozetřen sterilní hokejkou. Poté byly misky ponechány 20 minut stát, aby došlo k zaklimatizování MO v živném médiu a započal jejich růst. Po 20 minutách byly na Petriho misky s MO naneseny vzorky krémů, do každé misky vždy po 3 částech. Očkování MO bylo provedeno vždy ve sterilním boxu pomocí UV záření, pro kontrolu byla vždy pro každý vzorek krému provedena paralelní kultivace v další Petriho misce. Vyhodnocení bylo provedeno po 69 hodinách.



Obrázek 6: Petriho miska s kulturou bakterie *Serratia marcescens* po 20 minutách kultivace a nanesení vzorku krému

3.12 Antimikrobiální test esenciálních olejů

Obdobný antimikrobiální test jako u vzorků krémů byl proveden také pro látky terpenového charakteru obsažených ve zkoumaných vzorcích krémů. Test byl nejprve proveden pro látky koncentrované v rozmezí od 95 do 97 % a poté pro látky 1%, v takovém procentu bývají obsaženy v kosmetických přípravcích a měly by fungovat částečně jako přírodní konzervanty. Nejprve bylo opět provedeno zaočkování vybraných mikroorganismů a to gramnegativní bakterie *Serratia marcescens*, grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* do NB média a kvasinka *Candida glabrata* do YPD média. Po 24 hodinách růstu kultur bylo provedeno zaočkování na agarové plotny na Petriho miskách obsahující opět NB nebo YPD médium. Následně byly misky ponechány 20 minut stát, aby došlo k aklimatizaci zaočkovaných MO a jejich růstu. Po 20 minutách bylo do jamek v Petriho miskách naneseno 50 μ l vzorku. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno po 24 hodinách.

3.13 Stanovení aktivních složek plynovou chromatografií

Plynovou chromatografií byly stanoveny aktivní látky, konkrétně mastné kyseliny, obsaženy ve vzorcích krémů jakožto složky účinných rostlinných olejů.

3.13.1 Podmínky pro stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona: DB o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
- Teplotní program:
 - 60°C 10 minut
 - Vzestupný gradient 12°C/min do 200°C s výdrží 10 minut
 - Vzestupný gradient 5°C/min do 220°C s výdrží 15 minut
 - Vzestupný gradient 10°C/min do 240°C s výdrží 7 minut
 - Celková doba analýzy: 60 minut
- Vstup:
 - Teplota injektoru: 250°C
 - Doba bezděličového dávkování: 5 minut
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) (1 μ l)
- Nosný plyn:
 - Průtok dusíku: 0,5 ml/min
- Detektor FID – plamonově-ionizační:
 - Teplota detektoru: 250°C
 - Průtok vzduchu: 350 ml/min
 - Průtok vodíku 35 ml/min
 - Make-up dusíku: 30 ml/min

3.13.2 Příprava vzorků pro analýzu na GC

U vzorků krémů byla nejprve provedena extrakce a esterifikace, bylo naváženo 0,53 g krému Lavera, 0,48 g krému Neobio a 0,49 g krému Urtekram. Do každého vzorku pak bylo přidáno 10 ml hexanu a vzorky byly ponechány 4 minuty na vortexu a 5 minut v ultrazvuku. Dále bylo do vzorku přidáno 5 ml dest. H₂O. Do baniček bylo napipetováno 0,5 ml vytvořené horní fáze, 4,5 ml hexanu a 0,5 ml 2M KOH v methanolu. A s roztoky se třepalo 8 minut. Dále byl odebrán 1 ml horní fáze na plynovou chromatografii.

3.13.3 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Identifikace a kvantifikace mastných kyselin byla provedena na základě srovnání retenčních časů a ploch píků s retenčními časy a plochy píků standardů o známé koncentraci. (viz *Tabulka 12*).

Tabulka 12: Standardy mastných kyselin

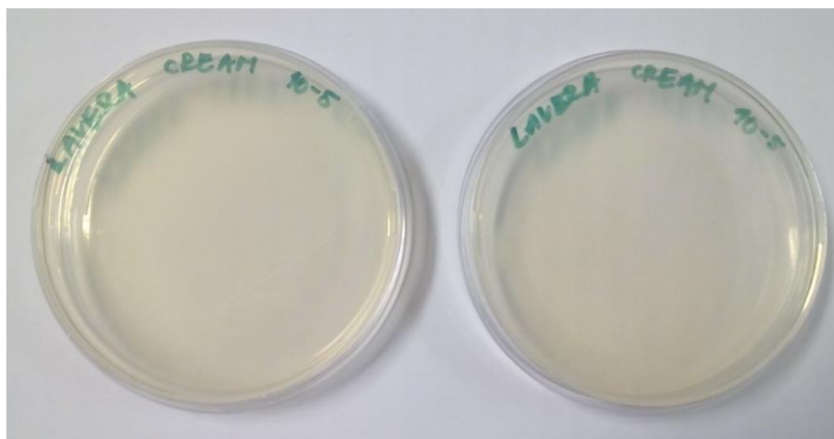
Číslo píku	Mastná kyselina	Retenční čas (min)	Koncentrace (mg/ml)	Plocha píku (mV·s)
1	Kapronová	18,28	0,04	2825843
2	Kaprylová	21,68	0,04	3466573
3	Kaprinová	24,15	0,04	3824882
4	Undekanová	25,26	0,02	2083691
5	Laurová	26,39	0,04	4363197
6	Tridekanová	27,59	0,02	2160471
7	Myristová	28,99	0,04	5142349
8	Myristolejová	29,72	0,02	2165183
9	Pentadekanová	30,61	0,02	2198462
10	cis-10-pentadecenová	31,55	0,02	2002343
11	Palmitová	32,63	0,06	11862097
12	Palmitoolejová	33,35	0,02	2204918
13	Heptadekanová	34,61	0,02	1951607
14	cis-10-heptadecenová	35,41	0,02	1855260
15	Stearová	36,79	0,04	6146507
16	Elaidová	37,20	0,02	2123704
17	Olejová	37,56	0,04	12419087
18	Linolelaidová	38,04	0,02	1732572
19	Linolová	38,86	0,02	5671779

Číslo píku	Mastná kyselina	Retenční čas (min)	Koncentrace (mg/ml)	Plocha píku (mV·s)
20	γ-linolenová	39,69	0,02	1789686
21	linolenová	40,60	0,02	1986463
22	Arachová	42,02	0,04	3477495
23	cis-11-eicosenová	43,03	0,02	2041954
24	cis-11,14-eicosadienová	44,97	0,02	1641102
25	Heneicosanová	45,38	0,02	1676667
26	cis-8,11,14-eicosatrienová	46,24	0,02	1632369
27	Arachidonová	47,10	0,02	1269034
28	cis-11,14,17-eicosatrienová	47,58	0,02	1405360
29	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	49,54	0,02	3310808
30	Behenová	50,04	0,04	1303750
31	Eruková	51,03	0,02	1683480
32	cis-13,16-docosadienová	53,00	0,02	1489194
33	Tricosanová	53,26	0,02	1614542
34	Lignocerová	56,70	0,04	3029313
35	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová	57,97	0,02	1501724
36	Nervonová	58,31	0,02	867969

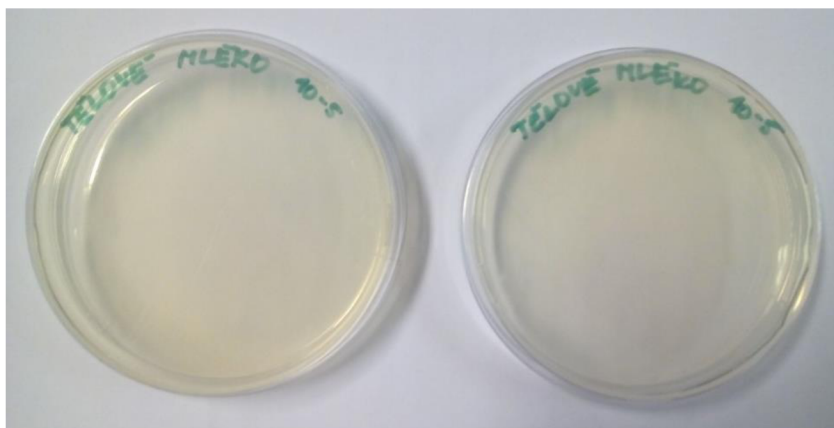
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kontrola potenciální kontaminace z výroby

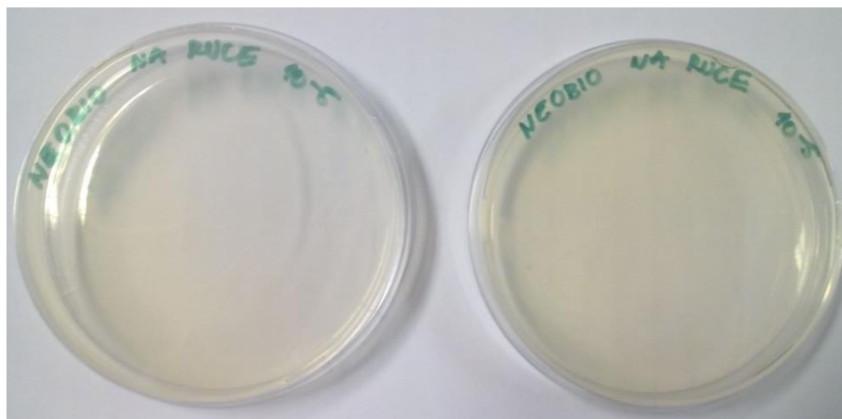
Kontrola potenciální mikrobiální kontaminace kosmetických vzorků z výroby byla provedena dle kap. 3.8. Po 69 hodinách po nanesení zředěného vzorku na Petriho misku s TSA bylo provedeno vyhodnocení výsledků. U všech vzorků krémů bylo potvrzeno, že z výroby neobsahují žádnou mikrobiální kontaminaci. Na ukázkou jsou uvedeny fotografie Petriho misek s naočkovanými vzorky ředěných 10^{-5} .



Obrázek 7: Lavera krém ředění 10^{-5}



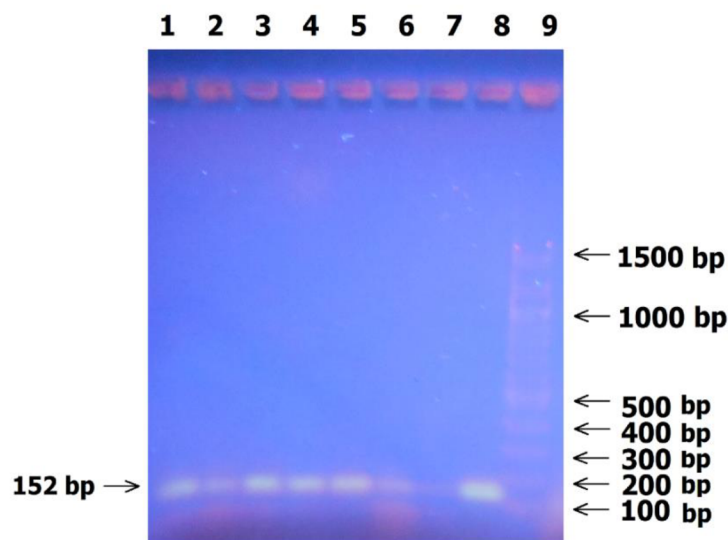
Obrázek 8: Tělové mléko Urtekram ředění 10^{-5}



Obrázek 9: Neobio krém na ruce ředění 10^{-5}

4.2 Kontrola potenciální kontaminace z výroby metodou PCR

Byla provedena agarósová gelová elektroforéza produktů PCR dle kap. 3.9 (viz *Tabulka 13*), kdy byly detekovány produkty PCR specifické velikosti pro kvasinky (152 bp) po obarvení v ethidium bromidu (viz *Obrázek 10*). V tabulkách jsou také uvedeny intenzity produktů: +++ silná, ++ střední, + slabá, - nedetekovaná. U všech testovaných kosmetických přípravků byla prokázána přítomnost DNA kvasinek, jen u vzorku levandulového krému a vyživujícího krému byly detekovány produkty PCR střední intenzity, z toho lze usuzovat, že se v těchto přípravcích nacházelo menší množství DNA kvasinek než v ostatních vzorcích krémů.



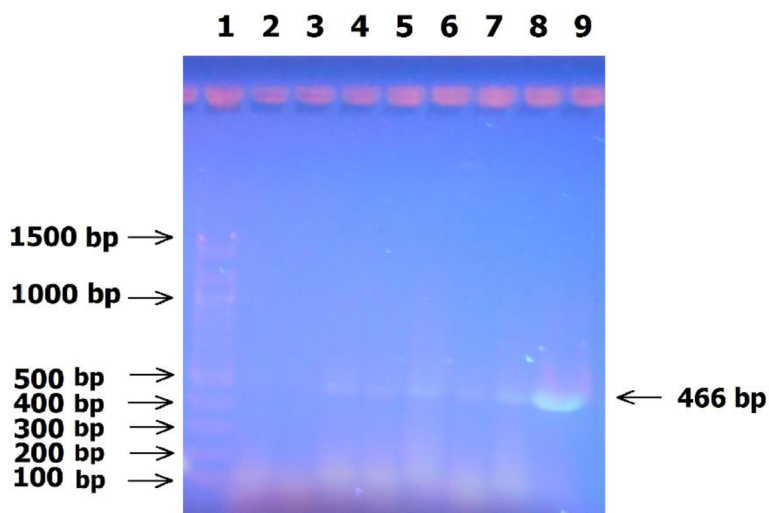
Obrázek 10: Agarósová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro kvasinky

Tabulka 13: Schéma nanesení vzorků na agarósovou gelovou elektroforézu PCR produktů specifických pro kvasinky

Běh č.	DNA	Detekce produktů PCR
1	Krém na zralou pleť	++
2	Vyživující krém	+
3	Neobio	++
4	Lavera	++
5	Urtekram	++
6	Levandulový krém	+
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola (DNA <i>C.albicans</i> CCM)	+++
9	DNA standard	100 bp žebříček

(Pozn. Symbol + znamená slabá intenzita, ++ střední intenzita, +++ silná intenzita a symbol - znamená nedetekovaná)

U výsledků PCR pro produkty specifické pro doménu *Bacteria* (466 bp) viz *Obrázek 11*, byla prokázána přítomnost bakteriální DNA skoro u všech analyzovaných vzorků krémů. Detekované produkty PCR však měly slabou intenzitu. Lze tedy usuzovat na nižší množství bakteriální DNA přítomné ve vzorcích nebo na přítomnost inhibitorů PCR. Přítomnost bakteriální DNA nebyla prokázána v případě krému na zralou pleť.



Obrázek 11: Gelová elektroforéza PCR produktů ze vzorků krémů specifických pro doménu Bacteria

Tabulka 14: Schéma nanesení vzorků na agarósovou gelovou elektroforézu PCR produktů specifických pro doménu Bacteria

Běh č.	DNA	Detekce produktů PCR
1	DNA standard	100 bp žebříček
2	Negativní kontrola	-
3	Krém na zralou pleť	-
4	Neobio	+
5	Lavera	+
6	Urtekram	+
7	Levandulový krém	+
8	Vyživující krém	+
9	Pozitivní kontrola (DNA <i>Lactobacillus casei ssp. Casei</i> CCM 7088 ^T)	+++

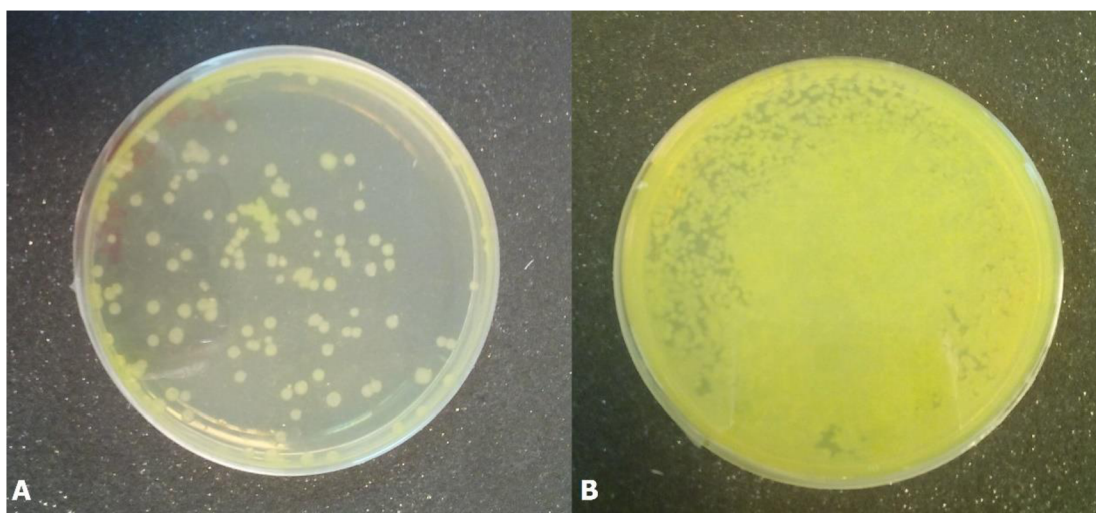
(Pozn. Symbol + znamená slabá intenzita, ++ střední intenzita, +++ silná intenzita a symbol - znamená nedetekovaná)

Při porovnání výsledků kultivačních testů a analýzy PCR nebyla v případě kultivačních testů prokázána přítomnost bakterií ani kvasinek v žádném z kosmetických přípravků. Analýzou PCR byla však prokázána přítomnost DNA bakteriální i kvasinkové téměř u všech

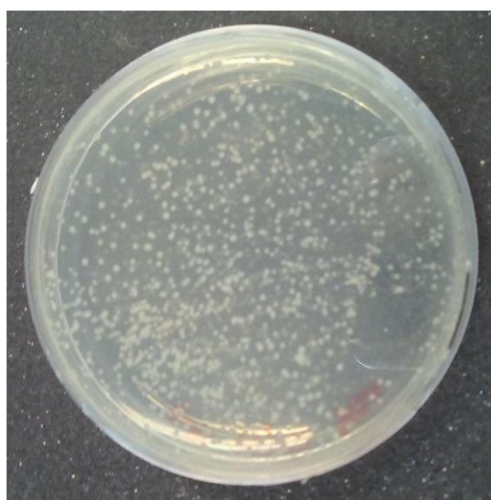
analyzovaných vzorků, lze tedy usuzovat na pravděpodobnou přítomnost bakteriální a kvasinkové DNA z důvodu jejich přítomnosti v surovinách, ze kterých byly krémy vyrobeny. Během výroby krémů, kdy dochází k zahřívání a přidávání antimikrobiálních látek mohly být mikroorganismy usmrceny a z tohoto důvodu nedošlo k jejich růstu při kultivaci na Petriho miskách, avšak přítomná DNA mohla být amplifikována pomocí PCR.

4.3 Schülke Koko test

Po 6 týdnech trvání Schülke Koko testu provedeného dle kap. 3.10 bylo zjištěno, že většina zkoumaných krémů má dobu trvanlivosti minimálně 30 měsíců, protože po celou dobu průběhu testu nebyl zaznamenán růst mikroorganismů. Jen v případě krému značky Urtekram byl pozorován růst mikroorganismů, konkrétně bakterií už po prvním zaočkování, což znamená, že krém má velmi krátkou dobu trvanlivosti. U vyživujícího krému pak byl růst mikroorganismů, konkrétně kvasinek pozorován po čtvrtém zaočkování, což znamená, že krém má kratší dobu trvanlivosti než 30 měsíců.



Obrázek 12: Výsledky očkovaní na Petriho misky 6. týden Schülke Koko testu – krém značky Urtekram (A – ředění 10^{-5} , B – ředění 10^{-3})



Obrázek 13: Výsledky očkovaní na Petriho misku 6. týden Schülke Koko testu – vyživující krém, ředění 10^{-3}

Tabulka 15: Výsledky Schülke Koko test

Vzorek	Ředění	1.týden	2.týden	3.týden	4.týden	5.týden	6.týden
Lavera	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-
Neobio	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-
Urtekram	10 ⁻³	++B	++B	++B	++B	++B	++B
	10 ⁻⁵	+++B	+++B	+++B	+++B	+++B	+++B
Levandulový krém	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-
Krém na zralou pleť	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-
Vyživující krém	10 ⁻³	-	-	-	+Y	+Y	+Y
	10 ⁻⁵	-	-	-	++Y	++Y	++Y

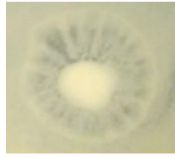


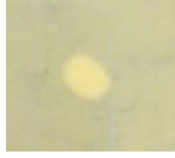


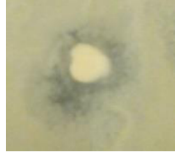











(Pozn. Symbol - znamená, že na Petriho miskách nebyl pozorován žádný růst MO, symbol + znamená nepatrný růst MO, symbol ++ mírný růst, symbol +++ masivní růst MO, symbol B značí růst bakterií, symbol Y značí růst kvasinek)

4.4 Antimikrobiální test u vzorků krémů

Antimikrobiální test testovaných vzorků byl proveden dle kap. 3.11. U všech vzorků krémů byl pozorován po 24 hodinové kultivaci jen částečný inhibiční účinek. Antimikrobiální účinek byl pravděpodobně jen krátkodobý, cca v jednotkách hodin a poté mikroorganismy vzniklé zóny začaly zarůstat.

U všech vzorků krémů až na krém značky Lavera byla pozorována při použití mikroorganismu *C.glabrata* částečný inhibiční účinek. U mikroorganismu *M.luteus* pak byla pozorována tvorba částečných inhibičních zón jen u krému na zralou pleť. V případě posledního zkoumaného mikroorganismu *S.marcescens* byl velmi malý inhibiční účinek, kdy bylo pozorováno lehké zesvětlení narostlých kolonii kolem vzorku u krému na zralou pleť, dále pak u krému značky Lavera, Urtekram a Neobio. Z výsledků je tedy patrné, že krémy nemají antimikrobiální aktivitu, což od nich spotřebitelé ani neočekávají, protože by pak fungovaly jako desinfekce, což není v zájmu výrobců ani spotřebitelů. Z těchto výsledků můžeme ale odvodit, že krémy, kde byla zaznamenána alespoň částečná antimikrobiální aktivita, by nemusely tolik podléhat mikrobiální kontaminaci.

Tabulka 16: Výsledky antimikrobiálního testu pro vzorky krémů

Krém	Použité mikroorganismy		
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
Neobio			
Lavera			
Urtekram			
Vyživující krém			
Levandulový krém			
Krém na zralou pleť			

4.5 Antimikrobiální test esenciálních olejů

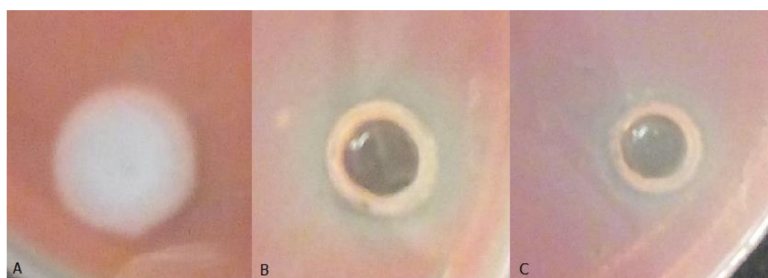
U antimikrobiálního testu provedeného dle kap. 3.12 bylo po 24 hodinách kultivace provedeno vyhodnocení inhibičních zón na Petriho miskách. Konkrétní výsledky u jednotlivých vzorků esenciálních olejů pro vybrané sledované mikroorganismy jsou uvedeny v tabulce níže (viz Tabulka 17).

Nejvyšší inhibiční účinek byl pozorován u vzorku citralu, kde na Petriho miskách s *C.glabrata* a *M.luteus* byly inhibiční zóny tak velké, že nebyl skoro vůbec pozorován růst mikroorganismů. Velké inhibiční zóny byly také zaznamenány u *C.glabrata* a *M.luteus* u geraniolu a linaloolu. Naopak vzorek limonenu neměl u žádného ze zaočkovaných mikroorganismů inhibiční zóny, můžeme tedy tvrdit, že nemá žádný nebo velmi malý antimikrobiální efekt.

Tabulka 17: Velikosti inhibičních zón u koncentrovaných olejů

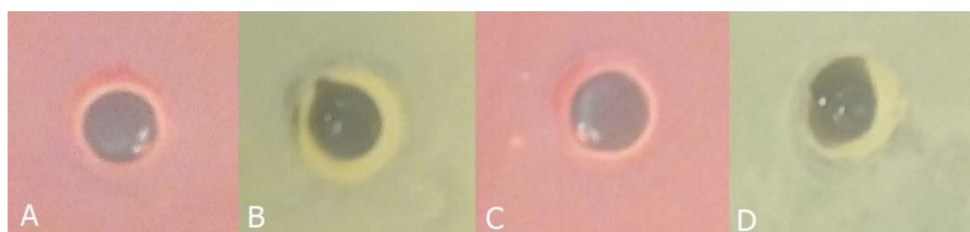
Esenciální olej	Mikroorganismus		
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
	Velikost inhibiční zóny [mm]		
Geraniol	2,9	7	6,2
Cítral	4,9	-	-
Limonen	0	0	0
Linalool	3,7	7,7	5,7
Citronellol	1	5,3	Část. inhib. efekt

(Symbol – značí, že inhibiční zóny byly tak velké, že na místě nebyl skoro vůbec pozorován růst MO)



Obrázek 14: Ukázka inhibičních zón při použití *S.marcescens* (A – limonen, B – geraniol, C – cítral)

Antimikrobiální test byl také proveden pro 1 % esenciální oleje. Zde však nebyl pozorován ani částečný inhibiční efekt. U všech zkoumaných mikroorganismů *C.glabrata*, *S.marcescens* i *M.luteus* byl povrch celé Petriho misky rovnoměrně porostlý mikroorganismy až po hranici jamky s esenciálním olejem. Ze získaných výsledků vyplývá, že pouze přítomnost esenciálních olejů v kosmetice nedokáže zaručit dostatečný antimikrobiální efekt a je tedy potřeba přítomnost i dalších povolených přírodních konzervačních látek (viz kap. 2.7.4).



Obrázek 15: Ukázka výsledku testu pro 1 % esenciální oleje (A – citral SM, B – citral CG, C – linalool SM, D – linalool CG)

4.6 Plynová chromatografie

Po úpravě vzorků dle kap. 3.13.2 a analýze získaných dat z chromatogramu bylo vyhodnoceno procentuální množství mastných kyselin, jako biologicky účinných látek, ve zkoumaných vzorcích krémů. Nejvyšší zastoupení mastných kyselin je ve vzorku krému značky Urtekram potom v krému značky Lavera a nakonec v krému značky Neobio. Co se týká zastoupení jednotlivých mastných kyselin, pak nejvyšší počet obsahuje krém značky Neobio.

V krému Neobio se s nejvyšším podílem nachází kyselina kaprylová, čímž byla potvrzena přítomnost kokosového oleje, který tuto kyselinu obsahuje ze 6-10 %. Krém tedy díky obsahu kokosového oleje působí pozitivně na pleť, která je po jeho použití hladká a jemná.

V krému značky Urtekram se s nejvyšším podílem nachází kyselina stearová, což potvrzuje přítomnost bambuckého másla, které kyselinu stearovou obsahuje. Bambucké máslo je hlavní aktivní složkou těch nejkvalitnějších krémů a podobně jako kokosový olej zjemňuje pokožku, pomáhá také ochránit pokožku proti UV paprskům.

V krému značky Lavera se s nejvyšším podílem nachází kyselina heptadekanová a linolová, výsledky potvrzují, že krém obsahuje sojový olej a také bambucké máslo. Sojový olej má výborné vyživující a hydratační účinky, pomáhá také zlepšovat obranyschopnost pokožky.

Tabulka 18: Procentuální složení mastných kyselin ve vzorcích krémů

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku a počet dvojných vazeb	Neobio	Urtekram	Lavera
		Zastoupení (%)		
Kaprylová	8:0	9,49	-	-
Kaprinová	10:0	1,10	-	-
Undekanová	11:0	4,31	-	0,17
Laurová	12:0	0,38	-	0,33
Tridekanová	12:0	0,04	0,21	0,21
Myristová	14:0	0,04	0,30	2,23
Myristolejová	14:1	0,04	-	-
Pentadekanová	15:0	-	3,55	0,26
Palmitová	16:0	0,66	0,28	6,73
Palmitolejová	16:1	0,11	-	0,39
Heptadekanová	17:0	0,16	-	12,07
Stearová	18:0	0,39	47,45	0,11
Elaidová	18:1	1,74	-	0,12
Olejová	18:1	0,41	3,11	0,32
Linolelaidová	18:2	0,14	-	-

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku a počet dvojných vazeb	Neobio	Urtekram	Lavera
		Zastoupení (%)		
Linolová	18:2	-	0,23	7,48
γ-linolenová	18:3	0,56	10,53	1,31
Linolenová	18:3	0,12	0,17	0,12
cis-11,14- eikosadienová	20:2	0,24	0,95	0,24
Behenová	22:0	2,20	3,07	2,20
Eruková	22:1	-	2,12	-
cis-13,16- dokosadienová	22:2	0,17	1,03	0,17
Celkem		22,30	72,95	34,46

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit potenciální mikrobiologické nebezpečí v biokosmetice, raw kosmetice a veganské kosmetice a také analýza aktivních složek v kosmetických prostředcích. U všech zkoumaných vzorků krémů bylo nejprve mikrobiologickou metodou prokázáno, že neobsahují žádnou mikrobiální kontaminaci z výroby. Metodou PCR byla zaznamenána přítomnost bakteriální i kvasinkové DNA, která však mohla pocházet i ze surovin, ze kterých byl krém vyroben a při výrobě nebo po přidání konzervačních látek mohly být přítomné mikroorganismy zahubeny, proto pak nebyl jejich výskyt potvrzen na Petriho miskách.

Při provádění Schülke Koko testu 4 ze 6 zkoumaných krémů testem prošly, tedy po dobu 6 týdnů nebyl zaznamenán žádný růst mikroorganismů. U krémů značky Lavera. Neobio a dále levandulového krému a krému pro zralou pleť nebyla zaznamenána po 6 týdnech testu žádná kontaminace. U krému značky Urtekram se kontaminace projevila už po prvním týdnu Schülke Koko testu a u vyživujícího krému po 4. týdnu Schülke Koko testu.

Dále bylo zkoumáno, jestli esenciální oleje obsažené v krémech nemají významnou funkci kromě provonění krému i jako antimikrobiální látka. U koncentrovaných olejů byla tato vlastnost potvrzena až na limonen, který netvořil inhibiční zóny. Avšak když byl test proveden pro 1% esenciální oleje, které se obvykle v této koncentraci nachází v kosmetických přípravcích, nebyla tvorba inhibičních zón pozorována. Z toho vyplývá, že v krémech musí být zastoupeno více složek s antimikrobiálním účinkem, aby díky synergickému efektu byl krém dostatečně chráněn proti kontaminaci mikroorganismů z prostředí.

Dále byl vyhodnocen obsah mastných kyselin ve vzorcích krémů značky Urtekram, Lavera a Neobio, mastné kyseliny fungují v krému jako tzv. účinná látka a dodávají krému specifické vlastnosti, jako například zjemnění pokožky, ochrana před UV paprsky nebo pokožku vyživují a hydratují. Nenasycené mastné kyseliny mohou však také fungovat jako antimikrobiální látky [30].

Ze získaných výsledků tedy můžeme vyvodit, že u krémů značky Lavera, Neobio, levandulového krému a krému pro zralou pleť nedošlo k výskytu mikroorganismů během 6týdenního Schülke Koko testu z důvodu, že krémy obsahují povolené přírodní konzervanty jako jsou kyselina sorbová, benzoová nebo benzylalkohol, betain, ale také mastné kyseliny, které mohou mít také antimikrobiální účinek. Krém značky Urtekram neobsahuje žádný povolený přírodní konzervant, pouze esenciální oleje a mastné kyseliny, podíl nenasycených mastných kyselin je u vzorku sice poměrně velký, ale díky absenci dalších konzervačních látek může být synergický efekt nedostačující, a proto může být trvanlivost krému kratší. Poslední ze zkoumaných krémů také neobsahuje žádné povolené přírodní konzervanty, jelikož však byl vyráběn doma, tak mohl být přidán vyšší podíl esenciálních olejů, a tudíž mohlo dojít k růstu mikroorganismů až v pozdější fázi testu, tedy po 4. týdnu.

Můžeme tedy shrnout, že obecně jsou krémy s certifikáty biokosmetiky a veganské kosmetiky z hlediska potenciální mikrobiologické kontaminace bezpečné, pokud obsahují alespoň některé povolené přírodní konzervanty (viz kap. 2.7.4). Pokud obsahují pouze esenciální oleje a mastné kyseliny z rostlinných olejů, pak je jejich trvanlivost poměrně zkrácena a krémy by tedy měly být používány jen krátkou dobu po otevření.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Přírodní či biokosmetika - jak je poznáte? *Celostnimediceina.cz* [online]. c2004-2016 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <https://www.celostnimediceina.cz/prirodni-ci-biokosmetika-jak-je-poznate.htm>.
- [2] PERŠINOVÁ, Eva. *Raw food jako zážitek: uživej si pestrost živé stravy každý den!*. Praha: Grada, 2016. ISBN 9788024757995.
- [3] Biokosmetika. *KEZ o.p.s. - kontrola ekologického zemědělství* [online]. Chrudim, c2009 [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: <http://www.kez.cz/prirodni-a-bio-kosmetika>
- [4] SYROVÝ, Vít. *Tajemství kosmetiky*. Praha: Vít Syrový, 2015. ISBN 9788090313774.
- [5] *NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích*. In: . ročník 2009, č.1223. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- [6] *Zákon č. 267/2015 Sb., kterým se mění zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony*. In: . ročník 2015, číslo 267. Dostupné také z: <http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/zakon-c267/2015-sb-kterym-se-meni-zakon-c258/2000-sb-o-ochrane-verejneho-10910-11.html>
- [7] NATRUE CRITERIA. *NATRUE* [online]. Brusel [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <http://www.natrue.org/information-for/manufacturers/natrue-criteria/>
- [8] Vegan Trademark standards. *The Vegan Society* [online]. Birmingham, c1944-2016 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: <https://www.vegansociety.com/your-business/vegan-trademark-standards>.
- [9] BDIH STANDARD - criteria. *Naturkosmetik* [online]. Mannheim, c2016 [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: <http://www.ionc.info/index.php?id=16&L=1>
- [10] Certifikát BDIH. *BIOOO.CZ - biokosmetika a ekodrogerie* [online]. Praha, c2007-2016 [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: <http://www.biooo.cz/images/card/certifikat-bdih-1.jpg>
- [11] RIEGER, Martin M. a Linda D. RHEIN. *Surfactants in cosmetics*. 2nd ed., rev. and expanded /. New York: Marcel Dekker, c1997. ISBN 0824798058.
- [12] TAUFEROVÁ, Alexandra, Michaela PETRÁŠOVÁ, Jana POKORNÁ, Bohuslava TREMLOVÁ a Pavel BARTL. *Rostlinná produkce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-716-9.
- [13] TAUFEROVÁ, Alexandra, Martina OŠŤÁDALOVÁ, Zdeňka JAVŮKOVÁ, Michaela PETRÁŠOVÁ a Petra ČÁSLAVKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I, II*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6.
- [14] KUSMIREK, Jan. *Tekuté slunce: rostlinné oleje pro masáže, aromaterapii, kosmetiku a výživu*. Praha: One Woman Press, 2005, 213 s. ISBN 808635641

- [15] PANDEY, Abhay K., Pradeep KUMAR, Pooja SINGH, Nijendra N. TRIPATHI a Vivek K. BAJPAI. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*. 2017, (7), 1-14. DOI: 10.3389/fmicb.2016.0216
- [16] YOUNG, Gary. *Essential Oils Pocket Reference*. 5. USA: Life Science Publishing, 2011. ISBN 0983518327.
- [17] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 8086659003.
- [18] CHOW, Ching Kuang. *Fatty acids in foods and their health implications*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, 2000. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 96. ISBN 0824767829.
- [19] KRS, Václav. *Materiály I pro 1. a 2. ročník oboru Kosmetička*. Praha: Informatorium, 2001. ISBN 8086073734.
- [20] BUTLER, Hilda. a W. A. POUCHER. *Poucher's perfumes, cosmetics and soaps*. 10th ed. / Boston: Kluwer Academic Publishers, c2000. ISBN 0751404799.
- [21] ORTH, Donald S. *Handbook of cosmetic microbiology*. New York: Marcel Dekker, c1993. Cosmetic science and technology series, v. 12. ISBN 082479012X.
- [22] GEIS, Philip A. *Cosmetic microbiology: a practical approach*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 295 s. ISBN 0-8493-1453-4
- [23] PAYE, Marc, A. O. BAREL a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. / New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 1574448242.
- [24] SIEGERT, Wolfgang. Evaluation of the Microbiological Safety of Finished Cosmetic Products. *Euro cosmetics*. 2010, **2010**(3), 16-19.
- [25] SIEGERT, Wolfgang. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics. *H&PC Today - Household and Personal Care Today*. 2013, **2013**(Vol. 8(2) March/April), 32-39.
- [26] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 8021038411.
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 9788086369228.
- [28] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, č. 4, s. 2359-2365. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [29] TOFALO, R. et al. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*. 2012, roč. 23, č. 2, s. 356-362. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.07.032

- [30] ZHENG, Chang Ji, Jung-Sung YOO, Tae-Gyu LEE, Hee-Young CHO, Young-Ho KIM a Won-Gon KIM. *Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids*. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.028. ISBN 10.1016/j.febslet.2005.08.028. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2005.08.028>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MK	mastné kyseliny
SAFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
MO	mikroorganismy
O/V	olej ve vodě
V/O	voda v oleji
CFU	kolonie tvořící jednotku (colony-forming unit)
TSA	trypton sojový agar
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
bp	pár bází (base pair)
YPD	specifické médium pro kultivaci kvasinek
LB	specifické médium pro kultivaci bakterií
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
SDS	dodecylsulfát sodný
PEG	polyethylen glykol