

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA BOBNAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA BOBNAR

Zagotavljanje mikrobiološke zaščite pred bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* s sestavinami naravnega izvora v dermalnem pripravku

Microbiological preservation efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in dermal formulation

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravila na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Lunder.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentoriciizr. prof. dr. Mojci Lunder za spodbudo in usmerjanje pri delu ter strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za pomoč pri laboratorijskem delu, ki se je včasih zavleklo tudi v pozne večerne ure. Zahvala tudi doc. dr. Nini Kočever Glavač za vso pomoč in napotke.*

*Posebna zahvala gre moji družini, prijateljem, predvsem fantu Mateju, ker so verjeli vame, mi ves čas študija stali ob strani in me spodbujali pri doseganju tega cilja.*

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Lunder.

Ljubljana 2017

Aleksandra Bobnar



## VSEBINA

|   |            |
|---|------------|
| <b>KAZALO ENAČB.....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>KAZALO SLIK.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>POVZETEK .....</b>   | <b>VI</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>1 UVOD.....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 NARAVNA KOZMETIKA .....   | 1          |
| 1.2 KONZERVANSI.....  | 2          |
| 1.3 MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA.....  | 3          |
| 1.4 VRSTE KONZERVANSOV IN NJIHOVO DELOVANJE .....   | 4          |
| 1.4.1 KONZERVIRANJE Z ENCIMSKIM SISTEMOM.....   | 6          |
| 1.4.2 KONZERVIRANJE Z ZNIŽEVANJEM AKTIVNOSTI VODE .....   | 6          |
| 1.4.3 KONZERVIRANJE Z MONOESTRI SREDNJE-DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH<br>KISLIN VISOKE ČISTOTE.....             | 6          |
| 1.4.4 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA, KI IZKAZUJEJO PROTIMIKROBNO<br>DELOVANJE .....                | 7          |
| 1.5 IZBRANE SESTAVINE NARAVNEGA IZVORA ZA IZVEDBO IZZIVNEGA PRESKUSA<br>UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA ..... | 8          |
| 1.6 IZZIVNI PREIZKUS .....  | 12         |
| <b>2 NAMEN DELA .....</b>   | <b>13</b>  |
| <b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>   | <b>14</b>  |
| 3.1 MATERIALI .....   | 14         |
| 3.1.1 PRIPRAVA KOZMETIČNE FORMULACIJE.....  | 14         |
| 3.1.2 IZBIRA NARAVNIH SESTAVIN S PROTIMIKROBNIM DELOVANJEM .....  | 16         |
| 3.1.3 SESTAVA GOJIŠČA TSA .....   | 18         |
| 3.1.4 SESTAVA EUGON LT 100.....   | 19         |
| 3.1.5 SESTAVA MEDIJA ZA REDČENJE .....  | 19         |
| 3.1.6 PRIBOR.....   | 20         |
| 3.2 METODE .....  | 20         |
| 3.2.1 TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA .....  | 21         |
| 3.2.2 IZZIVNI PRESKUS .....   | 23         |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>4</b> | <b>REZULTATI</b> .....                            | <b>25</b> |
| 4.1      | TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA .....            | 25        |
| 4.2      | IZZIVNI PRESKUS .....                             | 26        |
| <b>5</b> | <b>RAZPRAVA</b> .....                             | <b>30</b> |
| <b>6</b> | <b>ZAKLJUČEK</b> .....                            | <b>33</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURA</b> .....                           | <b>34</b> |
| <b>8</b> | <b>PRILOGE</b> .....                              | <b>36</b> |
| 8.1      | PRILOGA 1: TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA ..... | 36        |
| 8.2      | PRILOGA 2: IZZIVNI PRESKUS .....                  | 37        |

## KAZALO ENAČB

|   |    |
|---|----|
| Enačba 1: Prikaz zmanjšanja logaritemske vrednosti..... | 21 |
|---|----|

## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| Slika 1: Simbol minimalni rok trajanja .....  | 3  |
| Slika 2: Simbol odprtega lončka.....  | 3  |
| Slika 3: Postopek izvedbe testa učinkovitosti deaktivatorja.....  | 22 |
| Slika 4: Prikaz izvedbe izzivnega preskusa učinkovitosti izbranih sestavin naravnega izvora po ISO-standardu..... | 24 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|   |    |
|---|----|
| Preglednica 1: Sestava topikalne O/V-formulacije .....  | 14 |
| Preglednica 2: Uporabljene koncentracije naravnih sestavin s protimikrobnim delovanjem .....  | 15 |
| Preglednica 3: Topnost in dovoljena koncentracija sestavin s protimikrobnim delovanjem po uredbi o kozmetičnih izdelkih, ki se ne sperejo s kože, za uporabljene sestavine naravnega izvora ..... | 17 |
| Preglednica 4: Ocenjevalni kriterij po ISO-standardu.....   | 20 |
| Preglednica 5: Povprečno število kolonij bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ki so zrastle pri testu učinkovitosti deaktivatorja .....  | 25 |
| Preglednica 6: Logaritem zmanjšanja Rx.....   | 27 |
| Preglednica 7: Rezultati testa delovanja deaktivatorja .....  | 36 |
| Preglednica 8: Rezultati izzivnega preskusa 7 dni po inokulaciji.....   | 37 |
| Preglednica 9: Rezultati izzivnega preskusa 14 dni po inokulaciji .....   | 38 |
| Preglednica 10: Rezultati izzivnega preskusa 28 dni po inokulaciji .....  | 40 |

## POVZETEK

Konzervansi so zelo pomembna sestavina kozmetičnega izdelka, saj le-tega ščitijo pred mikrobiološko kontaminacijo. V današnjem času nas na vseh področjih spremlja trend naravnega, ekološkega in organskega in tako je prisotna težnja po naravnih sestavinah tudi na področju kozmetičnih izdelkov. Proizvajalci tako v naravnih virih iščejo sestavine, ki bi zamenjale sintetične sestavine, ki so bile do sedaj v uporabi. Dejstvo je, da potrošniki povezujejo naravo z zdravjem in pozitivnimi učinki narave in njenih virov na naše telo. Vendar pa se ob tem moramo vprašati, ali je naravno res tako dobro. Primer naravnega je tudi zelena mušnica, vendar ob tem vsi vemo, da gre za zelo strupeno gobo, ki povzroči hudo zastrupitev in lahko tudi smrt. Tako se moramo zavedati, da so naravne sestavine lahko tudi zelo strupene. Poleg tega ne moremo vplivati na okoljske dejavnike, v katerih naravna sestavina zraste, prav tako ne moremo zagotoviti ponovljivih serij, kar pri proizvodnji sintetičnih sestavin vsekakor lahko. Proizvajalci so pričeli iskati alternative sintetičnim konzervansom, ki bi poleg konzerviranja izdelka izkazovale še druge pozitivne lastnosti, kot je na primer protimikrobno delovanje. V diplomski nalogi smo izbrali 12 naravnih sestavin, ki primarno izkazujejo druge lastnosti (npr. emolienti, vlažilci, antioksidanti ...), hkrati pa delujejo protimikrobno. Ker sestavine s protimikrobnim delovanjem dejansko niso konzervansi, prav tako niso navedene na seznamu dovoljenih konzervansov, lahko na samem kozmetičnem izdelku navajamo dikcijo, da izdelek ne vsebuje konzervansov.

Konzervanse smo testirali po ISO-standardu 11930. Test temelji na tem, da končni produkt (kozmetični izdelek) obremenimo z znanim številom mikroorganizmov. Produkt nato pod določenimi pogoji inkubiramo 28 dni. Po 7, 14 in 28 dneh vzamemo vzorec okuženega produkta in ga nanesimo na gojišče. Gojišče z vzorcem inkubiramo pod točno določenimi pogoji, v točno določenem časovnem intervalu. Po končani inkubaciji preštejemo kolonije, ki so zrastle na gojišču in glede na to nato določimo, ali izdelek ustreza ISO-standardu. Izdelek je mikrobiološko zaščiten, če konzervans zagotovi ustrezno zmanjšanje števila mikroorganizmov, oziroma ni znatnega povečanja. Skozi izvajanje testa smo dokazali, da nekatere izmed izbranih sestavin ustrezno ščitijo izdelek pred enim izmed štirih sevov, ki jih določa ISO-standard, in imajo potencial za novo dobo naravnih sestavin s protimikrobnim delovanjem.

Ključne besede: naravne sestavine, konzervansi, izzivni preskus učinkovitosti, ISO-standard 11930, *Pseudomonas aeruginosa*



## **ABSTRACT**

Preservatives are an essential part of a cosmetic product because they protect it against microbiological contamination. Nowadays we are surrounded by natural, ecological and organic trends so the tendency to get natural components in cosmetic products is logical as well. This is the reason why manufacturers try to find components in natural sources to replace synthetic ones that have been used so far. The fact is that consumers connect nature with health and its positive effects on their body. But the question is whether all natural components are really good. An example of something natural is a death cap. We all know that it is a very poisonous mushroom that can cause severe poisoning or even death. We have to be aware that natural components can be poisonous as well. Furthermore, we cannot have influence on environmental factors, a natural component grows in, we cannot provide repeatable series which can be done in production of synthetic components. Manufacturers have started to look for alternative synthetic preservatives which have, besides product preservation, shown some other positive characteristics, such as antimicrobial application. In the diploma thesis we chose 12 natural components which primarily indicate other characteristics (softening agents, moisturisers, antioxidants ...), but at the same time they also function antimicrobially. Since components with antimicrobial function are actually not preservatives, they are also not mentioned on the list of permitted preservatives, a diction can be placed on the cosmetic products saying that it does not involve preservatives.

Preservatives were tested according to ISO standard 11930. The test is based on the fact that the final product (cosmetic product) is loaded with a familiar number of microorganisms. The next stage was a 28-day incubation of the product under certain conditions. After 7, 14 and 28 days a sample was taken out of the product and put in the medium. The medium was incubated together with the sample under certain conditions, within a specific time interval. After incubation colonies, grown in the medium, were calculated and it was determined whether the product was appropriate according to the ISO standard. A product is microbiologically protected if a preservative provides proper number reduction of microorganisms or if there is no additional increase. During the process of testing it was proved that some chosen components provide suitable protection of the product against one of four strains, defined by the ISO standard, and present potential for a new era of natural components with antimicrobial function.

Key words: natural components, preservatives, challenge test of efficiency, ISO standard 11930, *Pseudomonas aeruginosa*



## **SEZNAM OKRAJŠAV**

ISO – mednarodna organizacija za standardizacijo (International Organization for Standardization)

DPP – dobra proizvodna praksa (Good Manufacturing Practice)

INCI – mednarodno poimenovanje kozmetičnih sestavin (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (Minimal Inhibitory Concentration)

CFU – število enot, ki tvorijo kolonije (Colony Forming Units)

V<sub>n</sub> – viabilnost inokuluma brez formulacije

V – viabilnost inokuluma

V<sub>f</sub> – viabilnost inokuluma s formulacijo

# 1 UVOD

## 1.1 NARAVNA KOZMETIKA

Ozaveščenost ljudi glede skrbi za okolje, varovanja narave, s katero sobivamo in do samih sebe je vse večja. S trendom vračanja nazaj k naravi na vseh področjih se je v devetdesetih letih prejšnjega stoletja prebudil tudi trg naravne in ekološke kozmetike, ki si je do današnjega dne izboril svoj, sicer še majhen, delež med kozmetiko, ki jo najdemo na trgu (1). V današnjem času velikokrat slišimo hvalnice na račun naravne kozmetike, vendar se moramo zavedati, da ima tako naravna kot konvencionalna kozmetika svoje prednosti in slabosti.

Svet evropskih smernic (Council of the Europe guidelines) pojem »naravna kozmetika« definira kot kozmetične izdelke, ki vsebujejo naravne sestavine botaničnega, mineralnega ali živalskega izvora, pridobljene s fizikalnimi (ekstruzija, centrifugiranje, filtracija, destilacija, ekstrakcija, perkolacija, adsorptivne tehnike, zmrzovanje in sušenje), encimskimi ali mikrobiološkimi metodami. Mikroorganizmi in encimi se lahko uporabljajo le pri izvajanju mikrobioloških in encimskih postopkov. Ekstrakcijo lahko izvedemo z vodo, etilnim alkoholom ali z drugimi naravno pridobljenimi topili (2). Sestavine naravne kozmetike (npr. emulgatorje) lahko pridobimo iz naravnih snovi, kot so maščobe, olja in voski, sladkorji, škrob, celuloza, proteini, polisaharidi in vitamini, z naslednjimi tehnološkimi procesi: hidroliza, hidrogeniranje, oksidacija, redukcija, zaestritev ali z drugimi metodami cepitve in kondenzacije (3). V naravnih kozmetičnih izdelkih se lahko uporabljajo tiste naravne dišave in snovi, izolirane s fizikalnimi metodami, katerih imena in definicije so v skladu z mednarodnim standardom ISO9235, prav tako pa se lahko uporabljajo dišave biotehnološkega izvora. Za uporabo v naravni kozmetiki niso dovoljeni parafin in drugi naftni derivati (3).

Po izsledkih raziskave kar 94 % od 87,1 % uporabnikov kozmetike meni, da kemijsko sintetizirane snovi povzročajo negativne stranske učinke na koži. Le 6 % pa jih je bilo mnenja, da največkrat stranske učinke na koži povzročijo produkti naravne kozmetike (4). Vendar tako kot povsod ima tudi oznaka »naravne kozmetike« dve plati. Prednost naravne kozmetike je v njenem večinskem deležu naravnih sestavin ter embalaži, ki je prijazna okolju. Dodano vrednost naravne kozmetike doprinesejo tudi certifikati, ki jih naravnim izdelkom podeljujejo različne organizacije (npr. Natrue, BDIH, Ecocert, ipd.).

Povečevanje in oglaševanje medijev priljubljenosti naravnega in okolju prijaznega pa je terjalo svoj davek in pripeljalo do prve slabosti naravne kozmetike, tj. visoke cene. Izdelki, ki jih oglašujejo kot certificirano naravno kozmetiko, imajo višjo ceno kot konvencionalna kozmetika, kar meni tudi 87,1 % anketirancev (4). Druga pomembna slabost naravne kozmetike je njen rok trajanja. Konzervansi, ki jih lahko dodamo v naravno kozmetiko za preprečevanje kontaminacije z mikroorganizmi, so točno določeni in ne delujejo v tako dolgem časovnem intervalu kot npr. konzervansi, ki jih uporabljamo za konzerviranje konvencionalne kozmetike. Tako proizvajalci naravne kozmetike ves čas iščejo alternative v sestavinah, katerih primarna funkcija v izdelku ni konzerviranje, a poleg prvotne funkcije izkazujejo tudi zaviranje rasti mikroorganizmov. Področje naravne kozmetike v Evropski uniji ni zakonsko urejeno, saj Uredba o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009 ne vsebuje nobenega člena, ki bi se izrecno nanašal na naravno kozmetiko. S tega vidika ni enotnih kriterijev, ki bi jih izdelki morali izpolnjevati, da bi lahko dobili oznako naravno, in tako posledično dopuščajo zavajajoče oglaševanje izdelkov (1). Res je sicer, da 20. člen te uredbe splošno opredeljuje, da kozmetičnim izdelkom pri označevanju, dostopnosti na trgu in oglaševanju ne smemo pripisovati funkcij in značilnosti, ki jih v resnici nimajo, vendar se kljub temu pojavi veliko kršitev (5). Kot primer zavajajočega oglaševanja lahko izpostavimo 2 različni trditvi, in sicer da izdelek ne vsebuje konzervansa in da ni testiran na živalih. Tako naravni kot konvencionalni kozmetični izdelek mora, v primeru vsebnosti vode, vsebovati konzervans ali sestavino s protimikrobnim delovanjem, ki ga bo ščitila pred kvarjenjem. Po veljavni direktivi pa od leta 2013 noben kozmetični izdelek, ki je dan na trg v EU, ne sme biti testiran na živalih.

## **1.2 KONZERVANSI**

Konzervansi so snovi, ki so izključno ali v glavnem namenjene zaviranju razvoja mikroorganizmov v kozmetičnem izdelku (5). V Uredbi o kozmetičnih izdelkih (1223/2009) v prilogi V je navedenih 57 konzervansov, ki jih lahko uporabljamo v kozmetičnih proizvodih, ter njihove najvišje dovoljene koncentracije v izdelku (5). V povezavi z zagotavljanjem mikrobiološke kakovosti izdelka se pojavlja še nekaj izrazov. Antiseptik je snov, ki preprečuje rast in/ali uničuje mikroorganizme, kadar se aplicira na živo tkivo (npr. vodikov peroksid). Dezinfekcijska sredstva so materiali, ki uničujejo mikroorganizme, ki povzročajo bolezni na neživih predmetih. Primer dezinfekcijskega sredstva je etanol, ki ga

uporabljammo za razkuževanje delovne površine in pribora v laboratoriju. Germicid pa je splošen izraz za izdelke, ki ubijajo mikroorganizme (6). Mikrobiološke kakovosti izdelka ne zagotavljamo le z dodatkom konzervansa, temveč tudi z dobro proizvodno prakso (DPP), ki zagotavlja, da se proizvodi dosledno proizvajajo in nadzirajo v skladu s standardi kakovosti (7). Zgolj dodatek ustreznega konzervansa v formulacijo tako ne more in ne sme nadomestiti DPP.

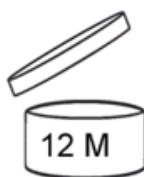
Uredba (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih v odstavku »Vsebina in način označevanja kozmetičnih proizvodov« določa informacije, ki jih mora proizvajalec navesti na primarno in sekundarno embalažo. Med njimi je tudi datum, do katerega kozmetični izdelek, shranjen pod ustreznimi pogoji, ohrani svojo prvotno funkcijo in predvsem ostane skluden s 3. členom (8). V zvezi z označevanjem roka uporabnosti se uporabljata 2 simbola:

- Simbol »minimalni rok trajanja« se na embalaži pojavlja skupaj z datumom, ki je določen na podlagi predhodnih testiranj in zagotavlja, da je izdelek do navedenega datuma varen za uporabo.



**Slika 1:** Simbol – minimalni rok trajanja

- Na simbolu odprtega lončka pa je navedeno časovno obdobje po odprtju izdelka, ko je kozmetični izdelek varen za uporabnika. S tem simbolom označujemo kozmetične izdelke, ki imajo minimalni rok trajanja več kot 30 mesecev (8).



**Slika 2:** Simbol odprtega lončka

### **1.3 MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA**

V skladu z Uredbo (ES) št.1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 je potrebno za vsak kozmetični izdelek na trgu izdelati oceno varnosti in na podlagi

pridobljenih informacij pripraviti poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka, kar vključuje tudi mikrobiološko kakovost in varnost izdelka oziroma njegovih komponent. K poročilu o varnosti morajo biti priloženi tudi rezultati učinkovitosti konzerviranja (5). Proizvajalci morajo tako med samo formulacijo izdelka izbrati ustrezen konzervans v ustrezni koncentraciji. Pri tem si pomagamo z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). MIC je najnižja koncentracija konzervansa, ki zavira rast mikroorganizmov, a jih ne ubije. Določimo jo tako, da pripravimo različne redčitve konzervansa in jih naneseemo na gojišča, ki so okužena z znanim številom in vrsto mikroorganizma. Poudariti je potrebno, da količina konzervansa, ki je enaka MIC, še ne zagotavlja ustrezne mikrobiološke zaščite končnega izdelka. V formulaciji imamo lahko snovi, ki niso kompatibilne z izbranim konzervansom in lahko izničijo njegovo delovanje. Pred dokončno odločitvijo za konzervans in njegovo koncentracijo moramo opraviti še izzivni test, ki se izvaja na končnem kozmetičnem izdelku. V sedmem členu Uredbe o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih so navedene koncentracije mikroorganizmov, ki jih izdelek lahko vsebuje in so sprejemljive. Kozmetični izdelki v 0,1 g ali 0,1 ml vzorca ne smejo vsebovati naslednjih mikroorganizmov: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans*. Kozmetični izdelki v 0,5 g ali 0,5 ml vzorca, ki so namenjeni za nego otrok, mlajših od treh let, ali za uporabo na koži v območju oči in na sluznicah, ne smejo vsebovati zgoraj naštetih mikroorganizmov. V kozmetičnih izdelkih v 1 g ali v 1 ml vzorca skupno število živih aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ne sme biti večje kot 1000. Ne glede na prejšnji odstavek v 1 g ali v 1 ml vzorca kozmetičnega izdelka, ki je namenjen za nego otrok, mlajših od treh let, ali za uporabo na koži okoli oči ali na sluznicah, skupno število živih aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ne sme biti večje od 100 (9).

#### **1.4 VRSTE KONZERVANSOV IN NJIHOVO DELOVANJE**

Konzervanse glede na njihov kemizem delimo na alkohole (fenoksietanol, etanol), derivate gvanidina, organske živosrebrove spojine, kvarterne amonijeve spojine, aromatske spojine (estri in soli parahidroksibenzojske kisline), kisline in njihove soli (sorbinska, benzojska kislina), tvorce formaldehida in druge snovi (11).

Tarče delovanja konzervansov so celična stena, citoplazemska membrana in citoplazma. Na celično steno delujejo tako, da povzročijo ekstruzijo celične vsebine, spremembo oblike stene in lizo. Vgradijo se v citoplazemsko membrano in spremenijo njeno permeabilnost.

Vplivajo tudi na izražanje genov, sintezo proteinov v ribosomih in na koagulacijo citoplazme. (11)

Pri formuliranju novih kozmetičnih izdelkov si vsak proizvajalec želi uporabiti idealen konzervans. Idealen konzervans mora imeti širok spekter delovanja, kar pomeni, da mora zavirati/ubijati vse vrste mikroorganizmov, kot so plesni, glive in bakterije. Na rast mikroorganizmov mora vplivati v nizkih koncentracijah, saj bi lahko v nasprotnem primeru končni izdelek povzročal iritacije. Konzervans mora biti topen v vodi in imeti ustrezno topnost v olju, saj se mikroorganizmi razvijajo v vodni fazi izdelka. Ne glede na to, katerim temperaturnim, svetlobnim ali pH-pogojem je konzervans podvržen, mora biti v formulaciji stabilen in tako zagotavljati varno uporabo izdelka v določenem roku uporabe. Poleg tega da je konzervans varen za uporabo, ne sme vplivati na estetske lastnosti končnega produkta, kot so barva, vonj, okus, hkrati mora biti kompatibilen z ostalimi sestavinami. Z ekonomskega vidika je pomembno, da je konzervans relativno poceni. Ceno končnega izdelka namreč v veliki meri kreirajo cene uporabljenih vhodnih sestavin in glede na povprečni ekonomski položaj potrošnikov je potrebno vsekakor upoštevati tudi to.

Na vsakem koraku so dostopni različni neznanstveni članki o zdravju škodljivih konzervansih, ki jih potrošniki prebirajo in zaradi česar so pri nakupu kozmetičnih izdelkov bolj previdni. Začeli so se vračati k naravni kozmetiki, misleč, da izdelki ne vsebujejo konzervansov, vendar mora vsak kozmetični izdelek vsebovati sestavino, ki bo preprečevala razrast mikroorganizmov, ki ogrožajo zdravje potrošnika. Zaradi težnje potrošnikov in medijev so proizvajalci kozmetičnih izdelkov pričeli iskati alternativne sestavine, ki bi ustrezno mikrobiološko zaščitile izdelek. Vendar se moramo pri naravnih sestavinah zavedati, da ni vse, kar je naravno, nujno tudi varno za uporabo. Naravno je namreč lahko tudi zelo strupeno – močni strupi, rakotvorne snovi in motilci hormonov. Protimikrobne sestavine, ki po svoji primarni vlogi niso konzervansi, ne izkazujejo dobre protimikrobne učinkovitosti v nizkih koncentracijah in tako jih je potrebno v formulacijo dodajati v velikih koncentracijah, s čimer tvegamo nastanek iritacij. Poleg tega ni ponovljivosti v sestavi, saj ta zaradi različnih pogojev rasti, pridobivanja in ostalih dejavnikov variira. Tako je potrebno testirati učinkovitost in varnost vsake serije naravne sestavine. Poleg iskanja konzervansov med naravnimi sestavinami so proizvajalci kozmetike pričeli razvijati tudi druge metode za zaščito končnega produkta pred mikroorganizmi, kot so konzerviranje z encimskimi sistemi,



zniževanje aktivnosti vode, monoestri visoke čistote in naravne protimikrobne sestavine, katerih primarna vloga v kozmetičnem izdelku ni protimikrobno delovanje (11).

#### **1.4.1 KONZERVIRANJE Z ENCIMSKIM SISTEMOM**

Encimski sistem je dvokomponentni sistem sestavin, ki delujeta kot konzervansi, ko sta zmešani skupaj, posamezno namreč protimikrobnih lastnosti ne izkazuje. Sistem deluje tako, da napada encime v mikroorganizmih in posledično ustavi celične procese. Primer konzerviranja z encimskim sistemom je encim laktoperoksidaza, ki je prisotna v svežem mleku (10). Sam po sebi ne poseduje antibakterijskih lastnosti, vendar lahko v prisotnosti vodikovega peroksida oksidira tiocianatni ion, pri čemer nastane laktoperoksidazni sistem, ki ima bakteriostatski in baktericidni učinek. Sistem ne bo učinkoval, če ga izpostavimo povišani temperaturi (nad 40 °C) ali reducentom (npr. cistein ali natrijev hidrosulfit), saj oba dejavnika povzročata uničenje encimov (11).

#### **1.4.2 KONZERVIRANJE Z ZNIŽEVANJEM AKTIVNOSTI VODE**

Mikroorganizmi se razmnožujejo v vodni fazi končnega produkta in tako je glavni razlog za rast mikroorganizmov v formulaciji voda. Aktivnost vode je parameter, s katerim kvantitativno ovrednotimo dostopnost vode v izdelku. Podana je kot razmerje med delnim tlakom vodne pare nad izdelkom pri določeni temperaturi in tlaku ter delnim tlakom vodne pare nad čisto vodo pri isti temperaturi. Z znižanjem aktivnosti vode zmanjšamo možnost za razrast mikroorganizmov. Snovi, ki zmanjšujejo aktivnost vode in na ta način zagotavljajo mikrobiološko zaščito, so glicerol, glicerilpoliakrilat in etoksidiglikol (11).

#### **1.4.3 KONZERVIRANJE Z MONOESTRI SREDNJE-DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN VISOKE ČISTOTE**

Med neklasične konzervanse spadajo tudi monoestri srednje-dolgoverižnih maščobnih kislin visoke čistote. Jon Kabara je odkril, da monoestri srednje-dolgoverižnih maščobnih kislin visoke čistote delujejo protimikrobno, vendar izkazujejo slabšo zaščito pred razvojem mikroorganizmov kot klasični konzervansi. Med te estre spadajo glicerilkaprilat, glicerillaurat in propilenglikolkaprilat. Zaradi hidro-lipofilne strukture se v kozmetičnih izdelkih primarno uporabljajo kot emulgatorji. Fosfolipidi (npr. kokamidopropil

propilenglikoldimonium klorid fostfat) izkazuje širok spekter protimikrobne zaščite pred grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami ter najpogostejšimi plesnimi in glivami (11).

#### **1.4.4 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA, KI IZKAZUJEJO PROTIMIKROBNO DELOVANJE**

Želja potrošnika je idealen naraven konzervans, pri čemer pa že pri najpomembnejši lastnosti konzervansa, ki je širok spekter delovanja, naletimo na težavo. Večina naravnih konzervansov namreč izkazuje ozek spekter delovanja, sploh proti bakterijam iz rodu *Pseudomonas*, ki proizvajalcem kozmetike predstavljajo največ težav. Prav tako ne razpolagamo z informacijami, kaj se je dogajalo pri pridelovanju, nabiranju, sušenju, drobljenju, shranjevanju in med samim postopkom ekstrakcije sestavin, in tako so lahko naravne sestavine rastlinskega izvora, ki imajo podobno funkcijo kot sintezne, celo manj varne za uporabo. Nekateri rastlinski izvlečki in eterična olja imajo odlične protimikrobne učinke, vendar imajo tudi nekaj pomanjkljivosti, kot so ozek spekter delovanja, povzročitev preobčutljivostnih in fototoksičnih reakcij, izrazit vonj v višjih koncentracijah, hlapnost. Iz tega razloga jih največkrat uporabljamo v kombinacijami z drugimi spojinami za konzerviranje kozmetičnega izdelka in s tem dosežemo boljše učinke, saj je dokazano, da nekateri rastlinski izvlečki (npr. izvleček čajevec), ki so namenjeni za druge namene uporabe, izboljšajo delovanje primarnega konzervansa (1).

Za pridobitev kakovostnih rastlinskih izvlečkov je pomembnih veliko dejavnikov, od kakovostnega rastlinskega materiala oz. droge do ustreznih postopkov pridobivanja. V farmaciji so rastlinski izvlečki in postopki njihovega pridobivanja natančno opredeljeni, zato sta kakovost in ponovljivost zagotovljeni. Na področju kozmetičnih izdelkov pa zahteve niso tako stroge, vendar bi vsekakor morale biti, saj sta sestava in kakovost izvlečka odvisni od načina izdelave. Poleg opredeljenosti in kakovosti rastlinskega izvlečka je pomembna tudi njegova koncentracija. V kozmetičnih izdelkih so velikokrat prisotni le sledovi, od katerih žal ne moremo pričakovati kakšnih posebnih učinkov. Med rastlinske izvlečke spadajo neemovo olje, aloja, borovnica in čajevec. Za želeni protimikrobni učinek je potrebno v izdelek dodati velike količine izvlečka, kar lahko pripelje do morebitnih zdravstvenih težav uporabnika.

Veliko eteričnih olj izkazuje protimikrobno delovanje, a šele v zelo visokih koncentracijah, ki lahko povzročijo nastanke kontaktnih dermatitisov in drugih preobčutljivostnih reakcij. Iz tega razloga se v kozmetičnem izdelku za konzerviranje nikoli ne uporabljajo samo eterična olja, temveč v kombinaciji s sinteznim konzervansom ali samokonzervirajočo tehnologijo (dobra proizvodnja praksa, primerno pakiranje, oblika emulzije, aktivnost vode, nadzor pH in uporaba multifunkcionalnih sestavin, ki izkazujejo protimikrobno delovanje) (12). Protimikrobno delovanje izkazuje eterično olje rožmarina, sivke, janeža, grenivke, limone in cimetoovca ter poprova meta.

### **1.5 IZBRANE SESTAVINE NARAVNEGA IZVORA ZA IZVEDBO IZZIVNEGA PRESKUSA UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA**

Dermosoft GMCY je bela, voskasta, trdna, multifunkcionalna kozmetična sestavina, proizvedena iz ene aktivne sestavine – gliceril kaprilata, ki je rastlinskega izvora. Primarna funkcija gliceril kaprilata v formulacijah je ko-emulgator, uporablja se tudi zaradi emolientnega delovanja. Sestavina izkazuje tudi protimikrobne lastnosti, in sicer ima širok spekter delovanja (bakterije, kvasovke, plesni), zaradi česar je zelo priljubljena pri proizvajalcih izdelkov za nego kože. Zaradi delovanja proti grampozitivnim bakterijam in bakterijam, ki povzročajo akne (*Propionibacterium acne*), je pomembna sestavina produktov za nego aknaste kože. Učinkovita je v koncentracijah od 0,3–1,0 %. Za optimalno učinkovitost mora biti pH-formulacije med 4,5–7,0. V večini formulacij lahko njeno učinkovitost povečamo z dodatkom cinkovih soli (0,1–0,2 %), citrata (0,5–1,0 %) ali laktata (0,5–1,0 %). Vgradimo jo v oljno fazo. Gliceril kaprilat je s strani certifikata za naravno kozmetiko ECOCERT dovoljen za uporabo v naravni in organsko certificirani kozmetiki (13).

Janeževa kislina je bela, praškasta, multifunkcionalna kozmetična sestavina, ki je v naravi prisotna v mnogih rastlinah, kot so semena janeža ali koromač. Ena izmed vlog v kozmetičnih izdelkih je prikrivanje vonja ostalih kozmetičnih sestavin v formulaciji. Nežen vonj janeževe kisline ne doda vonja formulaciji in prav tako ne reagira s parfumskimi sestavinami v formulaciji. Janeževa kislina je šibka kislina ( $pK_a = 4,6$ ) in tako ohranja naravno raven kislosti naše kože. Študije so namreč pokazale, da ohranjanje kislega pH-ja kože pripomore k zmanjšanju razvoja nekaterih bakterij (*Propionibacterium acne* in

*Staphylococcus aureus*) in virusov. Sestavina je znana tudi po svojem protivnetnem delovanju in tako blagodejno učinkuje na razdraženo kožo. Učinkovita je v koncentracijah 0,05–0,3 %. Učinkovito deluje proti plesnim, slabše pa je njeno protimikrobno delovanje proti bakterijam in kvasovkam. Optimalni pH-delovanja je 4,5–5,5. Sestavina je topna v vodni fazi pri 80 °C in ob intenzivnemu mešanju (14).

Benzojska kislina je naravna sestavina, ki jo najdemo v mnogih živilih in rastlinskih ekstraktih. Benzojska kislina, njene soli in estri se v kozmetiki uporabljajo kot konzervansi, pri čemer je koncentracija dodanega konzervansa v formulacijo odvisna od namena uporabe izdelka. Maksimalna koncentracija v kozmetičnih izdelkih, ki jih speremo s kože, je 2,5 %, v kozmetičnih izdelkih za nego ustne votline 1,7 % in v kozmetičnih izdelkih, ki ostanejo na koži, 0,5 %. Sestavina je topna v vodni fazi izdelka (15).

Fenoksietanol je konzervans, ki se uporablja v mnogih kozmetičnih izdelkih za nego kože in las. Zaradi svojih lastnosti, kot je nizka stopnja iritacije in senzibilizacije, je primeren tudi za uporabo v kozmetičnih izdelkih za nego dojenčkov. Fenoksietanol je zaradi svoje dobre topnosti vključen v veliko formulacij, saj lahko v njem pred vključitvijo v formulacijo raztopimo konzervans, ki je slabo topen ali netopen v vodi. Poleg tega da izboljša topnost drugega konzervansa v vodi, izboljša tudi njegovo protimikrobno delovanje v formulaciji. Priporočena koncentracija fenoksietanola v formulaciji je do 1 %. Kadar ga uporabljamo v kombinaciji z drugimi snovmi, ki zavirajo rast mikroorganizmov, pa je lahko koncentracija nižja. Fenoksietanol je stabilen v širokem pH- in temperaturnem območju. Uspešno zavira rast gramnegativnih in grampozitivnih bakterij. V formulacijah je kompatibilen z vsemi površinsko aktivnimi snovmi, z večino konzervansov ter aktivnih snovi (16).

Glavni sestavini Cosgarda sta dehidroocetna kislina in benzil alkohol. Zaradi svojih dobro poznanih sestavin je dovoljen za uporabo v večini kozmetičnih izdelkov, kot so izdelki za nego las, kože, dojenčkov in izdelki za sončenje. Cosgard je v formulaciji zelo stabilen, dobro topen v vodi in ne vpliva na organoleptične lastnosti izdelka, saj je svetle barve in brez vonja. Tako v izdelkih, ki ostanejo na koži in tistih, ki se izperejo, se uporablja v koncentraciji od 0,2 % do 0,8 %. Učinkovit je v širokem temperaturnem in pH-območju 2–6,5. Dehidroocetna kislina in benzil alkohol sta bila pregledana in testirana ter sta tako dovoljena za uporabo v kozmetičnih izdelkih v Evropi. Poleg gliceril kaprilata ima certifikat

za naravno kozmetiko ECOCERT, kar pomeni, da je dovoljen za uporabo v naravni in organsko certificirani kozmetiki (17).

Aktivna sestavina ekstrakta fermentacije *Leuconostoc Kimichii* je antimikrobni peptid, ki izhaja iz mlečnokislinskih bakterij *Leuconostoc Kimichii*. Kot mnogo drugih mlečnokislinskih bakterij tudi *L. Kimichii* z zakisanjem okolja omejuje razrast mikroorganizmov. Poleg zakisanja okolja proizvaja tudi antimikrobni peptid, ki ga pridobivajo s fermentacijo in bioprosesno tehnologijo in se na tržišču pojavlja pod imenom leucidal. Leucidal je bistra do rahlo motna tekočina, topna v vodi, stabilna pri temperaturi do 70 °C in v širokem pH-območju 3 - 8. V formulacijah izkazuje učinkovito protimikrobno delovanje v koncentracijah od 1,0 % do 2,0 % proti razrasti bakterij in gliv. Poleg dobrih protimikrobnih lastnosti izkazuje tudi dobre vlažilne lastnosti. Študija je pokazala, da dodatek 1 % leucidala v kozmetični izdelek izboljša vlažilne lastnosti izdelka do 10 % (18).

Sorbinska kislina je naravna organska spojina, ki se uporablja kot konzervans v prehrani in kozmetičnih izdelkih. Gre za brezbarvno trdno snov, ki je slabo topna v vodi in nad 60 °C zlahka sublimira. Učinkovita je v pH-območju do pH 6. Proti bakterijam in plesnim je učinkovita v koncentraciji od 0,05 % do 0,2 %. Dokazano je, da ni toksična, ne iritira kože in ne povzroča fotosenzitacije (uporaba v izdelkih za zaščito pred soncem) (19).

Levulinska kislina je obnovljiva, naravna sestavina, proizvedena iz biomase in predstavlja alternativo petrokemičnim biocidom in konzervansom (npr. benzojska in sorbinska kislina). V organskih in naravnih kozmetičnih izdelkih se že uporablja kot parfum in sestavina, ki blagodejno vpliva na kožo in jo neguje (npr. preprečuje nastanek gub), poleg tega pa uravnava pH in deluje protimikrobno. Levulinska kislina je brezbarvna keto kislina, topna v vodi, etanolu in dietiletru. Uporabljamo jo lahko samostojno ali v kombinaciji z benzojsko ali sorbinsko kislino, prav tako se uporablja v več funkcionalnih sistemih za konzerviranje kozmetičnih izdelkov. Uporablja se v koncentraciji od 0,5 % do 1,5 % (20).

Salicilna kislina je brezbarvna kristalinična snov, ki se široko uporablja v organskih sintezah. Topna je v vodi, etanolu in dietil etru. Salicilna kislina je zelo dober keratolitik in tako se široko uporablja v dermatologiji, za zdravljenje aknaste in problematične kože. Uporablja se kot konzervans v prehrani, antiseptik in antimikotik v topikalnih formulacijah, ki se

uporabljajo v veterinarski medicini. Kot konzervans ga uporabljamo tudi v kozmetičnih izdelkih. V kozmetičnih izdelkih, ki se ne izpirajo, jo lahko uporabljamo v maksimalni koncentraciji do 0,5 %. V koncentraciji do 1 % jo lahko uporabljamo v kozmetičnih izdelkih za lase, ki se ne izpirajo. V kozmetičnih izdelkih za obraz, ki so namenjeni čiščenju kože in pilingih ter v izdelkih, ki se izperejo (npr. geli za prhanje, šamponi, balzami za lase, odstranjevalci ličil), jo lahko uporabljamo do koncentracije 2 % (21).

Dehidroocetna kislina je bela, praškasta, organska sestavina brez vonja, ki je dovoljena za uporabo v naravni kozmetiki. Kot konzervans deluje tako, da ustavi razmnoževanje in rast bakterij in gliv. Uporablja se v mnogih kozmetičnih izdelkih in izdelkih za osebno nego, kot so vlažilne kreme, izdelki za čiščenje obraza, adstringenti, pilingi, geli za prhanje, dekorativni pudri, izdelki za lase in zaščito pred soncem. Maksimalna koncentracija, ki jo lahko dodamo v kozmetične izdelke, je 0,6 %. Sestavina je varna za uporabo, saj ne povzroča nastanka preobčutljivostnih reakcij (kontaktni dermatitis ali alergične reakcije) in učinkovito zavira razrast mikroorganizmov v kozmetičnih izdelkih (22). Dehidroocetna kislina se na trgu največkrat pojavlja v kombinaciji z benzil alkoholom (1).

Ekstrakt grenivke je praškasta ali tekoča snov, ki jo pridobivajo iz skorje, celuloze in semen do 15 m subtropskega drevesa – grenivke. Med postopkom hladnega stiskanja dobimo ekstrakt grenivke, ki je rumene do zelene barve in močnega, svežega vonja po agrumih. V kozmetičnih izdelkih je dovoljena v koncentraciji od 0,5 % do 1 %. Podatkov o samem delovanju na kožo ni veliko, dokazano je le, da izkazuje protimikrobno delovanje. V eni izmed *in vitro* raziskav navajajo, da naj bi zavirala encim elastazo, ki razgraja elastin v koži. Na podlagi te raziskave domnevajo, da bi lahko sestavino uporabljali v kozmetičnih izdelkih za zrelejšo kožo, saj bi lahko prispevala k zmanjšanemu nastajanju gub in upočasnila vidne znake staranja (1).

p-hidroksibenzojska kislina tvori v vodi težko topne kristale (0,8 g na 100 ml). V kozmetičnem izdelku deluje kot konzervans tako, da zmanjša znotrajcelični pH mikroorganizmov, kar povzroči njihovo smrt. V izdelke naravne kozmetike lahko vgrajujejo rastlinske izvlečke, ki vsebujejo p-hidroksibenzojsko kislino in njene estre, ki so nam vsem bolj znani pod imenom parabeni (1). Parabeni ščitijo kozmetični izdelek pred večino mikroorganizmov, ki se pojavljajo v kozmetičnih izdelkih, slabše protimikrobno delovanje

izkazujejo proti glivam in plesnim. V klasičnih kozmetičnih izdelkih se lahko propil in butilparaben uporabljata v maksimalni koncentraciji 0,14 %, ko gre za posamezni ester ali mešanico estrov (26), medtem, ko se lahko ostali dovoljeni parabeni uporabljajo v koncentraciji 0,4 % ko gre za posamezni ester, ter v maksimalni koncentraciji 0,8 % ko gre za zmes estrov (1). Dokazano je, da lahko učinkovitost parabenov še povečamo z dodajanjem nekaterih drugih konzervansov, kot je npr. janeževa ali levulinska kislina.

Etanol je brezbarvna, vnetljiva tekočina, ki se meša z vodo v vseh razmerjih. Pridobivamo ga s fermentacijo škroba, sladkorjev in drugih ogljikovih hidratov, ki jih najdemo v krompirju, žitih, sadju, sladkorni pesi ipd. Na trgu običajno najdemo 96 % (V/V) etanol. Etanol se v kozmetičnih izdelkih uporablja kot topilo, prav tako poveča prodiranje snovi skozi kožo, s tem tudi delovanje in učinek kozmetično aktivnih sestavin. Uporablja se tudi kot konzervans, saj uničuje membrano mikroorganizmov in tako izkazuje protimikrobno delovanje (1).

## 1.6 IZZIVNI PREIZKUS

Za testiranje učinkovitosti konzerviranja kozmetičnih izdelkov se uporablja več testov, kot sta ISO 11930, »schülke KoKo test«, testi pa se nahajajo tudi v smernicah Zdravstvenega odbora za varstvo potrošnikov, Združenja proizvajalcev kozmetičnih izdelkov, izdelkov za osebno nego in dišav ter v farmakopeji Združenih držav Amerike in Evropski farmakopeji, ki sta namenjeni predvsem farmacevtskim izdelkom in s tega vidika tudi strožji. Zahteve za izvedbo izzivnega preizkusa in samo interpretacijo rezultatov se razlikujejo od organizacije do organizacije, za evropski trg pa merila postavlja Evropska farmakopeja, v kateri je za kozmetične izdelke priporočen standard ISO 11930. Pri izzivnem preizkusu formulacijo obremenimo s predpisano količino predpisanega testnega mikroorganizma in ob določenih časovnih intervalih vrednotimo učinkovitost predpisane količine protimikrobne spojine. Uporabljeni mikroorganizmi so *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* in *Aspergillus brasiliensis*. Izdelek je z mikrobiološkega vidika varen za uporabo, če dobljeni rezultati ustrezajo predpisanim kriterijem, ki so podrobneje predstavljeni v nadaljevanju pod točko 3.2. Metode v preglednici 4 (23).

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je vrednotenje sestavin naravnega izvora, ki bi v dermalnem pripravku tipa O/V nadomestile parabene in druge sintezne konzervanse. Z izzivnim preskusom, ki ga določa standard ISO 11930, bomo ugotavljali učinkovitost konzerviranja izbranih sestavin naravnega izvora v O/V-emulziji za topikalno aplikacijo z uporabo bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. V diplomski nalogi bomo vrednotili učinkovitost sestavin le proti enemu mikroorganizmu, ki ga določa ISO-standard. Za dokončno potrditev učinkovitosti izbranih sestavin je potrebno izvesti test tudi s preostalimi mikroorganizmi, ki jih predpisuje standard (*Escherichia Coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* in *Staphylococcus aureus*).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 PRIPRAVA KOZMETIČNE FORMULACIJE

Za izvedbo testa smo najprej pripravili enostavno emulzijo tipa O/V za vlažilno nego kože, v katero smo, med samim postopkom izdelave, vgradili izbrane sestavine s protimikrobnim delovanjem v nižji in višji koncentraciji. Koncentracije smo izbrali na podlagi pridobljenih podatkov o najnižji in najvišji dovoljeni koncentraciji posameznega konzervansa, ki so po evropski direktivi dovoljeni za uporabo v kozmetičnih izdelkih, ki se sperejo s kože. Nato smo se na podlagi tega odločili, da bomo učinkovitost vsake sestavine vrednotili v dveh koncentracijah:

1. Nižja koncentracija predstavlja najnižjo koncentracijo posamezne sestavine, ki je potrebna za zaviranje rasti mikroorganizmov.
2. Višja koncentracija predstavlja vmesno vrednost med najnižjo in najvišjo dovoljeno koncentracijo posamezne sestavine.

Kriterij za izbor testiranih koncentracij sta bila uspešno zaviranje rasti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in čim nižja koncentracija konzervansa v izdelku. O/V-emulzijo za topikalno aplikacijo smo pripravili po spodnji recepturi:

**Preglednica 1:** Sestava topikalne O/V-formulacije

| <b>Sestavina</b>        | <b>Odstotek sestavine v formulaciji</b> | <b>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)*</b> |
|-------------------------|---|---|
| <i>Voda</i>             | 79,9**                                  | Aqua  |
| <i>Mandljevo olje</i>   | 11,2                                    | Almond oil  |
| <i>Glicerol</i>         | 5                                       | Glycerol  |
| <i>Karitejevo maslo</i> | 2                                       | Shea butter   |

|                          |                            |                    |
|--------------------------|----------------------------|--------------------|
| <i>Konzervans</i>        | Nizka/visoka<br>količina** |                    |
| <i>Cetearil glukozid</i> | 0,8                        | Cetearyl glucoside |
| <i>Cetearil alkohol</i>  | 0,5                        | Cetearyl alcohol   |
| <i>Ksantan</i>           | 0,4                        | Xanthan gum        |

\*Mednarodno poimenovanje kozmetičnih sestavin

**Preglednica 2:** Uporabljene koncentracije naravnih sestavin s protimikrobnim delovanjem

| <b>Konzervans</b>                                     | <b>Nizka koncentracija (%)</b> | <b>Visoka koncentracija (%)</b> |
|---|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol 1 : 10</i> | 0,2                            | 0,4                             |
| <i>Dehidroocetna kislina</i>                          | 0,15                           | 0,3                             |
| <i>Levulinska kislina</i>                             | 0,2                            | 0,25                            |
| <i>Sorbinska kislina</i>                              | 0,15                           | 0,3                             |
| <i>Gliceril kaprilat</i>                              | 0,3                            | 0,5                             |
| <i>Janeževa kislina</i>                               | 0,05                           | 0,15                            |
| <i>Ekstrakt fermentacije L.Kimichii</i>               | 1                              | 1,5                             |
| <i>Benzojska kislina</i>                              | 0,13                           | 0,25                            |
| <i>Fenoksietanol</i>                                  | 0,25                           | 0,5                             |
| <i>Etanol 70%</i>                                     | 14                             | 17                              |
| <i>Ekstrakt grenivkinih pečk</i>                      | 0,1                            | 0,5                             |
| <i>Salicilna kislina</i>                              | 0,13                           | 0,25                            |
| <i>Emulzija brez konzervansa</i>                      | /                              |                                 |
| <i>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</i>          | 0,1                            |                                 |

\*\*Količina vode in količina konzervansa v kozmetičnem pripravku sta medsebojno povezani. Glede na količino konzervansa (nizka/visoka), ki smo ga dodali, se je spreminjala količina vode – ko smo dodali višjo dovoljeno koncentracijo konzervansa, je bila količina vode manjša in obratno.

Postopek izdelave: Na vodni kopeli, segreti na 80 °C, smo raztalili komponente lipofilne faze, vodno fazo pa smo segreti na enako temperaturo. Izbrane preskušane naravne sestavine s protimikrobnim delovanjem, ki jim bomo primerjali protimikrobno delovanje, smo med postopkom izdelave vgradili v eno izmed faz, odvisno od tega, ali je kozmetična sestavina lipofilna ali hidrofilna (topna v vodi ali v olju). Lipofilno fazo smo med mešanjem dodali vodni fazi, nato pa smo zmes homogenizirali 2 min s paličnim mešalnikom. Na koncu smo kremi dodali zgoščevalo (zmes glicerola in ksantana) in jo nalili v 50 ml sterilno centrifugirko. Vsaki emulziji smo izmerili tudi pH-vrednost. Pričakovana pH je bila 5–6. Pri nekaterih emulzijah je bila vrednost nižja in smo pH uravnali z dodatkom nasičene raztopine sode bikarbone (NaHCO<sub>3</sub>).

Izdelane emulzije smo do izvedbe testa shranili v hladilniku (5 °C). Na začetku našega testa oz. ob času T<sub>0</sub> smo v nove 50 ml centrifugirke natehtali 20 g vsake emulzije. 26 centrifugirk z 20 g emulzije je predstavljajo našo osnovo za nadaljnjo izvedbo testa.

### **3.1.2 IZBIRA NARAVNIH SESTAVIN S PROTIMIKROBNIM DELOVANJEM**

Za izvedbo testa smo si izbrali 11 sestavin naravnega izvora, ki se že uporabljajo v naravni kozmetiki in ki poleg primarne naloge v izdelku izkazujejo tudi protimikrobno delovanje. Vsako sestavino v določeni koncentraciji smo med izdelavo formulacije vgradili v lipofilno ali hidrofilno fazo, odvisno od tega, v kateri fazi je posamezna sestavina bolj topna. Poleg izbranih sestavin, ki izkazujejo lastnosti konzervansa, smo izdelali še emulzijo O/V brez dodatka protimikrobne sestavine in emulzijo O/V z dodatkom zmesi metil- in propilparabena v razmerju 2 : 1. Topnost posamezne sestavine je navedena v spodnji preglednici št. 2.

**Preglednica 3:** Topnost in dovoljena koncentracija sestavin s protimikrobnim delovanjem po uredbi o kozmetičnih izdelkih, ki se ne sperejo s kože, za uporabljene sestavine naravnega izvora

| <b>Konzervans</b>                                       | <b>Hidrofilnost/lipofilnost</b>   | <b>Dovoljena količina v formulaciji</b>          |
|---|---|--|
| <i>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (1 : 10)</i> | <i>Hidrofilen</i>   | 0,2–0,8 %  |
| <i>Dehidroocetna kislina</i>                            | <i>Hidrofilen</i>   | Max 0,6 %  |
| <i>Levulinska kislina</i>                               |   | 0,2–0,3 %  |
| <i>Sorbinska kislina</i>                                | <i>Hidrofilen</i>   | Max 0,6 %  |
| <i>Gliceril kaprilat</i>                                | <i>Amfifilen</i>  | 0,3–1,0 %  |
| <i>Janeževa kislina</i>                                 | <i>Hidrofilna</i>   | 0,05–0,3 %                                       |
| <i>Ekstrakt fermentacije L. Kimichii</i>                | <i>Hidrofilen</i>   | 1,0–2,0 %  |
| <i>Benzojska kislina</i>                                | <i>Hidrofilen</i>   | Max 0,5 %  |
| <i>Fenoksietanol</i>                                    | <i>Topen v glikolih in alkoholih; zmerno topen v vodi</i>   | Max 1,0 %  |
| <i>Etanol 70 %</i>                                      | <i>Damo v končano emulzijo (centrifugiramo, da preverimo stabilnost emulgatorja pri dodani količini fenoksietanola)</i> | 17 ml  |
| <i>Ekstrakt grenivkinih pečk</i>                        |   | 0,1–0,5 %  |
| <i>Salicilna kislina</i>                                | <i>Lipofilen</i>  | 0,0008–0,5 %                                     |
| <i>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</i>            | <i>Hidrofilen</i>   | 0,1 % (0,07 metilparabena + 0,03 propilparabena) |

Za izvedbo preizkusa smo uporabili bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* seva ATCC® sev 9027. *Pseudomonas aeruginosa* je Gram negativna bakterija iz družine *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* lahko metabolizira širok spekter organskih molekul, vključno z organskimi spojinami, kot so benzoati. Ravno zaradi tega je *Pseudomonas aeruginosa* zelo razširjen mikroorganizem, ki ga najdemo v različnih okoljih, kot so zemlja, voda, ljudje, živali, rastline, kanalizacija in bolnišnice. (24) Seve mikroorganizmov, med katerimi je tudi

*Pseudomonas aeruginosa*, smo kupili pri podjetju Biomerieux, saj jih ponuja v praktični, kroglični obliki, imenovani Bioball™. Bioball™ je liofilizirana oblika mikroorganizmov, ki se ob dodatku rehidracijskega pufra v hipu raztopi in je takoj primerna za uporabo. Prednosti so enostavna priprava in uporaba, natančno znana koncentracija mikroorganizmov v raztopini in konsistentno število mikroorganizmov med posameznimi serijami (25). Različni mikroorganizmi rastejo na različnih gojiščih. Bakterije, med katere spada *Pseudomonas aeruginosa*, rastejo na gojišču TSA (triptični soja agar). Za izvedbo testa smo uporabljali sterilno in vnaprej pripravljeno praškasto zmes Gelose Trypase Soja (TSA-D), ki smo jo kupili pri podjetju Biomerieux.

### 3.1.3 SESTAVA GOJIŠČA TSA

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Pankreasni hidrolizat kazeina | 15,0 g  |
| Papainski hidrolizat soje     | 5,0 g   |
| Natrijev klorid               | 5,0 g   |
| Agar                          | 15,0 g  |
| Voda                          | 1000 ml |

Priprava: Natehtano praškasto zmes smo s pomočjo magnetnega mešala in med segrevanjem raztopili v prečiščeni vodi. Vsebnike z gojišči smo sterilizirali v avtoklavu pri povišanem tlaku (2 bara) 15 min na 121 °C. Na steklene vsebnike z medijem za redčenje smo nalepili avtoklavirni trak. Avtoklavirni trak je kemični indikator, ki pri doseganju ciljnih sterilizacijskih pogojev spremeni barvo in s tem pokaže na uspešnost sterilizacije. Po končanem postopku avtoklaviranja še vroče vsebnike prestavimo na magnetno mešalo, da se med konstantnim mešanjem raztopijo posedli delci ter da se gojišče ohladi na približno 48 °C. Vsebnike nato prestavimo v vodno kopel, ki ima temperaturo 52 °C, ter jih tam shranjujemo do uporabe.

Za izvedbo testa potrebujemo tudi deaktivator Eugon LT 100, ki ga predpisuje ISO-standard. Deaktivator prepreči delovanje konzervansa med izzivnim testom. Gre za medij, ki vsebuje sestavine za deaktivacijo inhibitorne sestavine, prisotne v vzorcu (konzervans), in porazdelitveni agent oktksinol 9 (triton X 100). Glavni sestavini, ki preprečita delovanje

konzervansa v vzorcu, sta jajčni lecitin in polisorbat 80. Deaktivator smo, tako kot gojišče TSA, kupili pri podjetju Biomerieux.

### 3.1.4 SESTAVA EUGON LT 100

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Pankreasni hidrolizat kazeina | 15 g    |
| Papainski hidrolizat soje     | 5 g     |
| Natrijev klorid               | 4 g     |
| L-cistin                      | 0,7 g   |
| Natrijev sulfat               | 0,2 g   |
| Glukoza                       | 5,5 g   |
| Jajčni lecitin                | 1 g     |
| Polisorbat 80                 | 5 g     |
| Oktoksinol 9                  | 1 g     |
| Voda                          | 1000 ml |

Za redčenje smo uporabljali medij za redčenje.

### 3.1.5 SESTAVA MEDIJA ZA REDČENJE

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Pankreasni hidrolizat kazeina | 1,0 g   |
| Natrijev klorid               | 8,5 g   |
| Voda                          | 1000 ml |

Ustrezno količino medija za redčenje smo pripravili po zgornji recepturi. Komponente medija za redčenje smo med mešanjem na magnetnem mešalu raztopili v prečiščeni vodi, nato pa pripravljene raztopine 15 min sterilizirali v avtoklavu pri povišanem tlaku (2 bara) na 121 °C. Na steklene vsebnike z medijem za redčenje smo nalepili avtoklavirni trak. pH-vrednost medija za redčenje, izmerjena pri sobni temperaturi, po avtoklaviranju mora biti enaka  $7,0 \pm 0,2$ .

Na začetku vsake časovne točke (T7, T14, T28) smo pripravili ustrezno količino reagentov, ki smo jih potrebovali za izvedbo testa.

### 3.1.6 PRIBOR

Za izvedbo testa smo potrebovali 50 ml sterilne centrifugirke, v katere smo natehtali 20 g formulacije ter jih inokulirali z  $10^8$  cfu/ml raztopino Bioballa. V vsaki časovni točki smo potrebovali 15 ml sterilne centrifugirke, v katerih smo pripravili redčitve formulacije. Za vse nadaljnje redčitve smo uporabljali 1,5 ml mikrocentrifugirke. Ves uporabljeni potrošni plastični material smo pred uporabo avtoklavirali in ga nato posušili v sušilnikih na 70 °C 2 dni oziroma do izhlapitve vlage ter tako s tem preprečili možnost kontaminacije emulzije in vzorcev z uporabljenim potrošnim materialom.

### 3.2 METODE

Učinkovitost izbranih sestavin s protimikrobnim delovanjem smo ugotavljali s testiranjem izdelka po standardu ISO 11930. V emulzijo inokuliramo znano število mikroorganizmov in v različnih časovnih točkah (7, 14 in 28 dni) opazujemo, ali izdelek ustreza predpisanim standardom. Standard predpisuje število mikroorganizmov, ki jih moramo nacepiti. ISO-standard vsebuje preglednico, ki prikazuje kriterij za preizkus učinkovitosti konzervansa, ki je naveden v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Ocenjevalni kriterij po ISO-standardu

| Zmanjšanje logaritemske vrednosti <sup>a</sup>                               |              |                          |             |                    |             |             |                        |             |
|--|--------------|--------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|
| Rx = logN0 – logNx   |              |                          |             |                    |             |             |                        |             |
| Mikroorganizmi   | Bakterije    |                          |             | <i>C. albicans</i> |             |             | <i>A. brasillensis</i> |             |
| Inkubacijski čas   | T7           | T14                      | T28         | T7                 | T14         | T28         | T14                    | T28         |
| Kriterij A   | ≥3           | ≥3 in<br>NI <sup>b</sup> | ≥3 in<br>NI | ≥1                 | ≥1 in<br>NI | ≥1 in<br>NI | ≥0 <sup>c</sup>        | ≥1          |
| Kriterij B   | Ne<br>deluje | ≥3                       | ≥3 in<br>NI | Ne<br>deluje       | ≥1          | ≥1 in<br>NI | ≥0                     | ≥0 in<br>NI |
| a sprejemljivo je odstopanje 0,5 log   |              |                          |             |                    |             |             |                        |             |
| b NI: ni povečanja števila mikroorganizmov od prejšnjega inkubacijskega časa |              |                          |             |                    |             |             |                        |             |
| c Rx = 0, ko je logN0 = logNx  |              |                          |             |                    |             |             |                        |             |

$$R_x = \log N_0 - \log N_x$$

$N_0$  je število inokuliranih mikroorganizmov ob času  $T_0$

$N_x$  je število preživelih mikroorganizmov v posamezni časovni točki

#### Enačba 1: Prikaz zmanjšanja logaritemske vrednosti

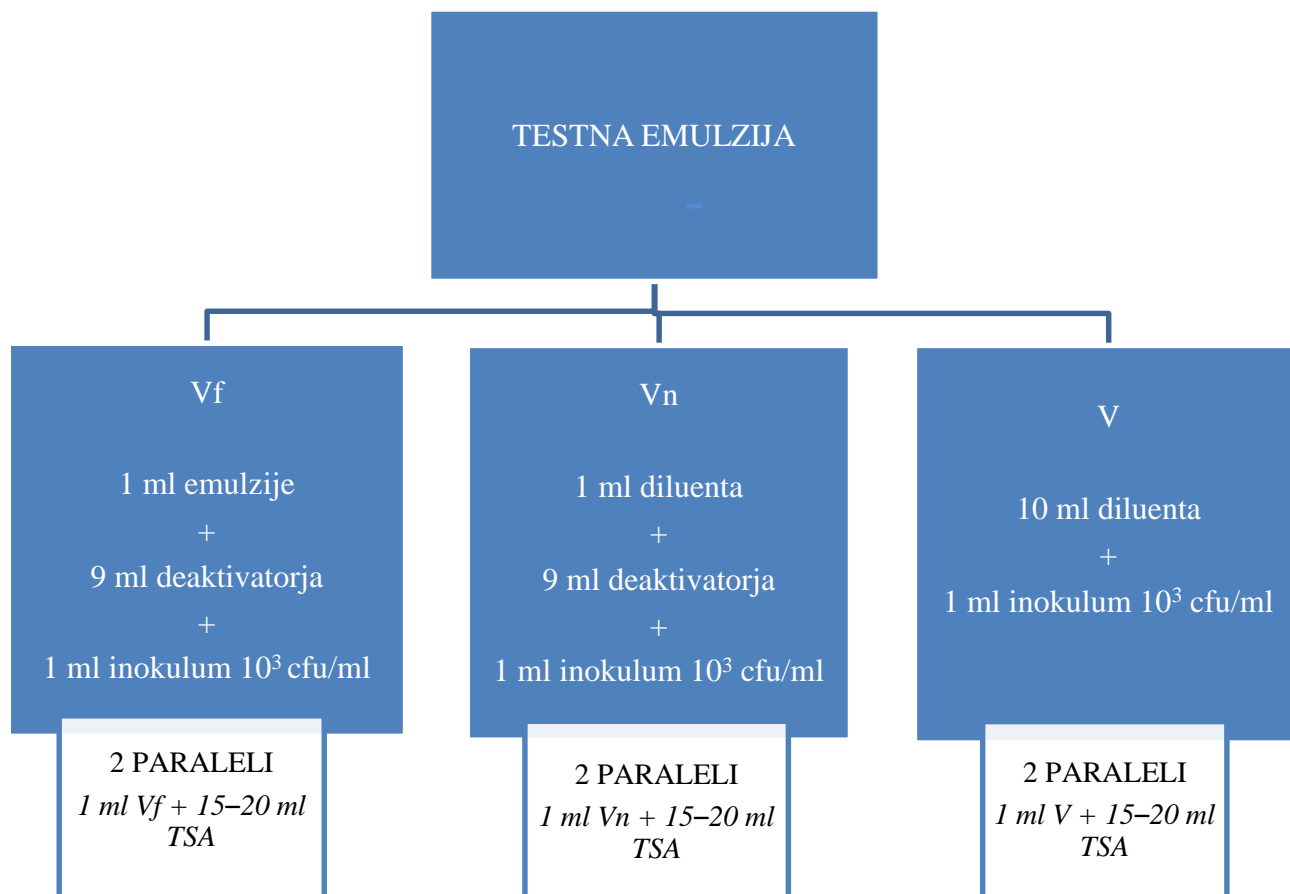
### 3.2.1 TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA

Pred pričetkom izvedbe izzivnega preskusa učinkovitosti konzerviranja izbranih sestavin naravnega izvora smo s preprostim testom ovrednotili učinkovitosti deaktivatorja. Njegova vloga je deaktivacija protimikrobne aktivnosti testirane formulacije, pri čemer ne sme vplivati na rast testnega mikroorganizma, v našem primeru bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

Test učinkovitosti deaktivatorja smo izvedli pred pričetkom izzivnega preizkusa, saj smo morali ovrednotiti ustreznost deaktivatorja. Za test smo uporabili le emulzije z večjo koncentracijo testiranih sestavin ter pozitivno in negativno kontrolo. 1 g vzorčnih formulacij smo natehtali v 15 mL centrifugirke in jih dispergirali v 9 mL medija za deaktivacijo. Testne formulacije smo pustili v kontaktu z medijem za deaktivacijo 30 min  $\pm$  15 min. Vzorcem (oznaka  $N_{Vf}$ ) smo nato dodali po 1 mL inokuluma do končne koncentracije  $1,1 \times 10^2$  CFU/mL. Pripravili smo tudi kontrolo inokuluma (oznaka  $N_V$ ), tako da smo 1 mL inokuluma dispergirali v 10 mL diluenta. Naredili smo tudi kontrolo toksičnosti medija za deaktivacijo do uporabljenega testnega mikroorganizma (oznaka  $N_{Vn}$ ), za katero smo 1 mL diluenta dispergirali v 9 mL medija za deaktivacijo in dodali 1 mL inokuluma. Od vseh vzorcev smo po predpisanem obdobju inokulacije odvzeli 1 mL, prenesli na sterilne petrijevke in dodali segreto agarno gojišče SDA. Vsak test smo naredili v dveh paralelah. Pred uporabo smo gojišče SDA ohladili na 48–45 °C. Ko se je gojišče na petrijevkah strdilo, smo ga inkubirali na 32,5 °C  $\pm$  2,5 °C od 48 do 72 ur in ročno prešteli kolonije mikroorganizmov. S primerjavo vrednosti  $N_V$  in  $N_{Vn}$  se bomo prepričali, da medij za deaktivacijo ni toksičen za izbrani mikroorganizem. Ustreznost medija za deaktivacijo pa bomo določili tako, da bomo



vrednosti  $N_{Vf}$  primerjali s polovično vrednostjo  $N_{Vn}$ . Na spodnji sliki 3 je za lažje razumevanje izvedbe test slikovno predstavljen.



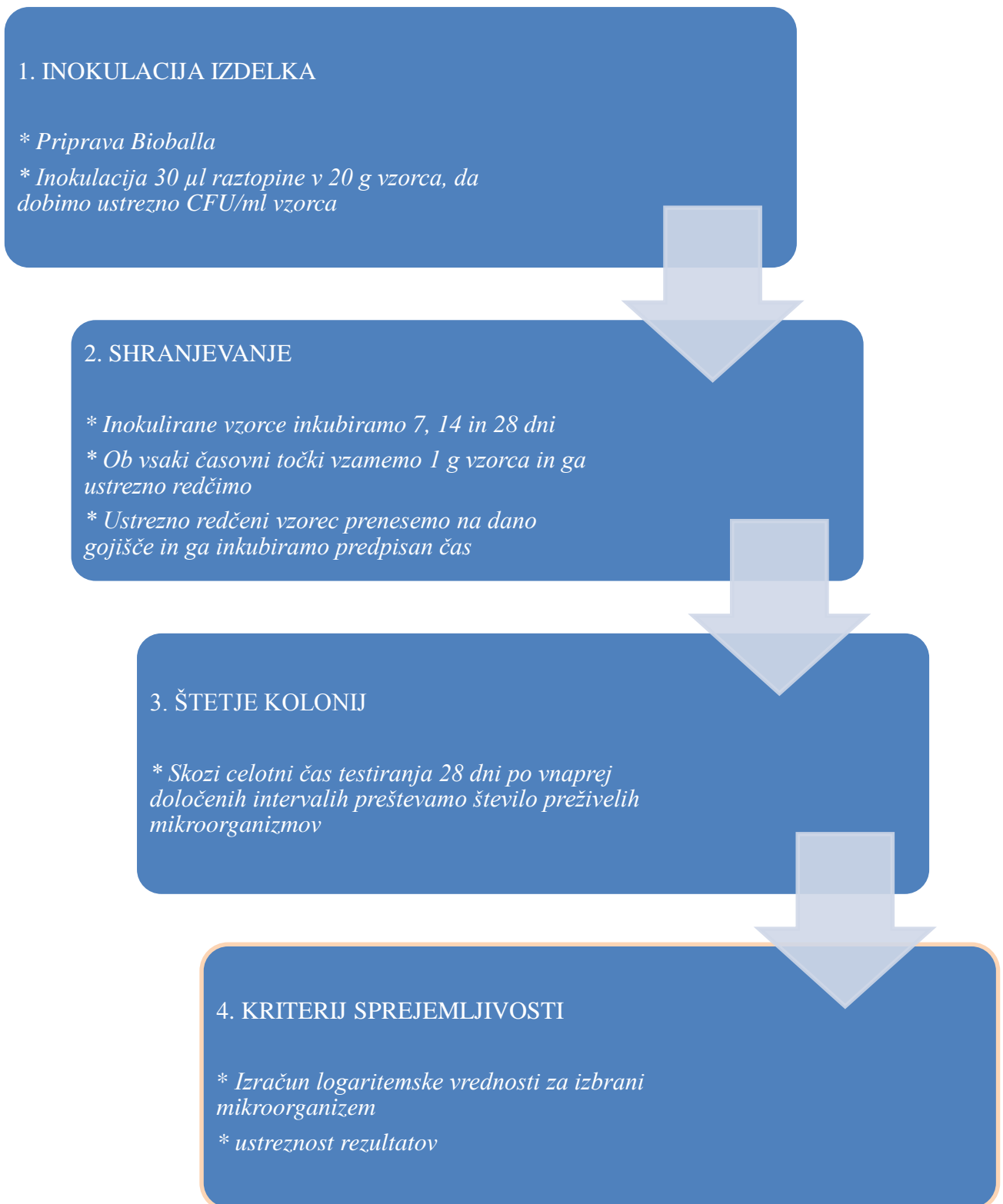
**Slika 3:** Postopek izvedbe testa učinkovitosti deaktivatorja

### 3.2.2 IZZIVNI PRESKUS

V stekleno vialo s kroglico Bioballa™ smo dodali 1,1 ml rehidracijske tekočine (Biomerioux). Koncentracija mikroorganizma v viali je bila  $10^8$  cfu/ml. Predpisana koncentracija bakterij v 20 g kozmetičnega izdelka, ki jo določa ISO-standard, znaša od  $10^7$  do  $10^8$  cfu/ml. V 50 ml sterilne centrifugirke smo natehtali 20 g vsake emulzije in v vsako previdno dodali 30  $\mu$ l raztopine Bioballa™. Tako smo dosegli končno koncentracijo mikroorganizma  $1,5 \times 10^5$  cfu/ml. Da se je inokulum homogeno vmešal v emulzijo, smo si pri mešanju najprej pomagali s sterilnimi ezami, nato pa smo vsak vzorec še premešali na stresalniku. Vzorce smo ves čas izvedbe izzivnega preizkusa shranjevali na sobni temperaturi okoli 25 °C.

Na začetku vsake časovne točke smo pripravili ustrezno količino diluenta, deaktivatorja in gojišča. Pripravili in označili smo 15 ml centrifugirke, 1,5 ml mikrocentrifugirke ter petrijevke. Celoten postopek je potekal v komori z laminarnim pretokom zraka pri antiseptičnih pogojih.

Ob vsakem predpisanem časovnem intervalu, 7 dni (T7), 14 dni (T14) in 28 dni (T28), smo iz okuženih formulacij vzeli 1 g formulacije in jo prenesli v 15 ml centrifugirko. V vsako centrifugirko smo dodali 9 ml deaktivatorja, dobro homogenizirali ter pustili  $30 \pm 15$  min na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo pripravili ustrezne redčitve. Volumen posamezne redčitve je bil 1,5 ml, faktor redčenja je bil 10. Za vsako redčitev smo pripravili 2 paraleli. V prvi časovni točki T7 smo za vse emulzije pripravili redčitve  $10^1$ ,  $10^2$  in  $10^3$  v diluentu. V vsaki časovni točki smo, glede na rezultate v prejšnji časovni točki, določili redčitve, ki so zagotovile optimalne rezultate. Za lažjo predstavbo izvedbe samega testa je leta spodaj slikovno prikazan na sliki 4.



**Slika 4:** Prikaz izvedbe izzivnega preskusa učinkovitosti izbranih sestavin naravnega izvora po ISO-standardu

## 4 REZULTATI

### 4.1 TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA

ISO-standard določa, da je test učinkovitosti deaktivatorja uspešen, kadar je povprečno število kolonij v  $N_v$  (viabilnost inokuluma) približno enako povprečnemu številu kolonij v  $N_{v_n}$  (viabilnost inokuluma brez formulacije) in če je povprečno število mikroorganizmov v  $N_{v_f}$  (viabilnost inokuluma s formulacijo) vsaj 50 % vrednosti  $N_{v_n}$ . Če ti kriteriji niso izpolnjeni, je potrebno izbrati drug deaktivator, saj je ta toksičen za mikroorganizme ali pa ne deaktivira delovanja konzervansa v kozmetičnem izdelku. V preglednici 5 so prikazani rezultati testa učinkovitosti deaktivatorja.

**Preglednica 5:** Povprečno število kolonij bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki so zrastle pri testu učinkovitosti deaktivatorja

| Emulzije   | Koncentracija (%) | $N_{v_n}$ | $N_v$ | $N_{v_f}$ |               |
|--|-------------------|-----------|-------|-----------|---------------|
| <i>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (2 : 1)</i> | 0,4               | 35,5      | 25,5  | 39,5      | $V_f > 17,75$ |
| <i>Dehidroocetna kislina</i>                           | 0,3               | 42        | 34,5  | 34,5      | $V_f > 21$    |
| <i>Levulinska kislina</i>                              | 0,25              | 34,5      | 27,5  | 60        | $V_f > 17,25$ |
| <i>Sorbinska kislina</i>                               | 0,3               | 46        | 35,5  | 44,5      | $V_f > 23$    |
| <i>Gliceril kaprilat</i>                               | 0,5               | 33,5      | 31    | 50,5      | $V_f > 16,75$ |
| <i>Janeževa kislina</i>                                | 0,15              | 41        | 31    | 45        | $V_f > 20,5$  |
| <i>Ekstrakt fermentacije L. Kimichii</i>               | 1,5               | 35,5      | 41    | 46        | $V_f > 17,75$ |
| <i>Benzojska kislina</i>                               | 0,25              | 41,5      | 30    | 54,5      | $V_f > 20,75$ |
| <i>Fenoksietanol</i>                                   | 0,5               | 46        | 31    | 43        | $V_f > 23$    |
| <i>Etanol 70 %</i>                                     | 17                | 31,5      | 34    | 45,5      | $V_f > 15,75$ |
| <i>Ekstrakt grenivke</i>                               | 0,5               | 34        | 31,5  | 57        | $V_f > 17$    |
| <i>Salicilna kislina</i>                               | 0,25              | 31        | 32    | 52        | $V_f > 15,5$  |

|  |     |    |      |    |         |
|--|-----|----|------|----|---------|
| <i>Emulzija brez konzervansa</i>             | /   | 40 | 25,5 | 52 | Vf > 20 |
| <i>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</i> | 0,1 | 32 | 35   | 48 | Vf > 16 |

Po kriteriju, določenem v ISO-standardu, smo morali preveriti 2 parametra za določitev ustreznosti deaktivatorja. Najprej smo preverili, ali sta povprečni vrednosti  $N_{Vn}$  in  $N_V$  pri vsaki emulziji približno enaki. Glede na rezultate v prvem in drugem stolpcu preglednice 5 lahko rečemo, da je prvi parameter, ki ga določa standard, ustrezen. Da bo kriterij v celoti izpolnjen, moramo preveriti še drugi parameter, ki ga določa standard. Zadnji stolpec v preglednici 5 prikazuje, da so vse dobljene vrednosti  $N_{Vf}$  vsaj 50 % vrednosti  $N_{Vn}$ . Iz teh ugotovitev lahko zaključimo, da izbrani deaktivator zadošča kriterijem ISO-standarda in tako učinkovito inhibira delovanje konzervansa, hkrati pa ne zavira rasti testnega mikroorganizma.

#### 4.2 IZZIVNI PRESKUS

*Pseudomonas aeruginosa* je rasla na gojišču TSA kot majhne bele kolonije s premerom 2 mm. V vsaki časovni točki smo po končani 2-dnevni inkubaciji na  $32,5 \pm 2,5$  °C prešteli kolonije. Povprečno število posameznih mikroorganizmov na gojišču v posamezni časovni točki je podano v prilogi 1. Iz teh podatkov smo nato izračunali  $R_x$ , ki predstavlja logaritem zmanjšanja števila mikroorganizmov v testiranih izdelkih v določeni časovni točki. Dobljene rezultate, ki so navedeni v preglednici 6, smo nato primerjali s preglednico 3 in na podlagi izračuna ugotovili, ali je konzervans učinkovit ali ne.

Preglednica 6: Logaritem zmanjšanja Rx

|  |                 | N7<br>(cfu/g) | R7  | N14<br>(cfu/g) | R14 | N28<br>(cfu/g) | R28 | ISO-<br>standard |
|--|-----------------|---------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|------------------|
| <b>Konzervans</b>  | <b>Konc.(%)</b> |               |     |                |     |                |     |                  |
| <i>Dehidroocetna<br/>kislina in benzil<br/>alkohol (2 : 1)</i> | 0,4             | 15            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,2             | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Dehidroocetna<br/>kislina</i>                               | 0,3             | 20            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,15            | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Levulinska<br/>kislina</i>                                  | 0,25            | 15            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,2             | 15            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Sorbinska kislina</i>                                       | 0,3             | 5             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,15            | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Gliceril kaprilat</i>                                       | 0,5             | 15            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,3             | 5             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Janeževa kislina</i>  | 0,15            | 20            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,05            | 60            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Ekstrakt<br/>fermentacije L.<br/>Kimichii</i>               | 1,5             | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 1               | 1235          | ≥3  | 1050000        | <0  | 570000         | <0  | ne<br>ustreza    |
| <i>Benzojska kislina</i>                                       | 0,25            | 0             | 2,1 | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,13            | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
| <i>Fenoksietanol</i>   | 0,5             | 0             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 0,25            | 420500        | <0  | 770000         | <0  | 350000         | <0  | ne<br>ustreza    |
| <i>Etanol 70 %</i>   | 17              | 5             | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |
|  | 14              | 35            | ≥3  | 0              | ≥3  | 0              | ≥3  | ustreza          |

|  |      |        |          |         |          |         |          |            |
|--|------|--------|----------|---------|----------|---------|----------|------------|
| <i>Ekstrakt grenivkinih pečk</i>             | 0,5  | 5      | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | ustreza    |
|  | 0,1  | 10     | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | ustreza    |
| <i>Salicilna kislina</i>                     | 0,25 | 5      | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | ustreza    |
|  | 0,13 | 135    | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | 0       | $\geq 3$ | ustreza    |
| <i>Emulzija brez konzervansa</i>             | /    | 979500 | <0       | 4590000 | <0       | 1260000 | <0       | ne ustreza |
| <i>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</i> | 0,1  | 717000 | <0       | 670000  | <0       | 525000  | <0       | ne ustreza |

Konzervansi, ki so skozi celotnih 28 dni testiranja tako v najnižji kot v najvišji koncentraciji zagotavljali ustrezno mikrobiološko zaščito proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, so zmes dehidroocetne kisline in benzil alkohola (razmerje 2 : 1), dehidroocetna, levulinska, sorbinska, janeževa, salicilna in benzojska kislina, gliceril kaprilat, etanol in ekstrakt grenivkinih pečk. Ekstrakta pri fermentaciji *L. Kimichii* in fenoksietanola pa sta izdelek ustrezno zaščitila le v višji koncentraciji. V času T7 je na posameznem gojišču zraslo 1–20 kolonij. V času T14 in T28 na gojišču ni zrastle nobena kolonija. Prav tako se skozi celotno obdobje izvajanja testa niso spremenile organoleptične lastnosti formulacije – konsistenca, vonj in barva, kar kaže na ustrezno zaščito pred bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* v uporabljenih koncentracijah izbranih sestavin naravnega izvora.

Konzervansi, ki proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* ne ščitijo kozmetičnega izdelka, so ekstrakt fermentacije *L. Kimichii* in fenoksietanol v nižji koncentraciji, emulzija brez dodanega konzervansa, emulzija in zmes metil- in propil parabena v razmerju 2 : 1. V časovni točki T7 je na gojiščih prišlo do velike razrasti kolonij. Na gojiščih s prisotnim konzervansom ekstrakta fermentacije *L. Kimichii* je zrastle povprečno 123,5 kolonij, pri ostalih pa so kolonije prerastle gojišče in tako jih ni bilo možno prešteti, saj so se zlivale ena v drugo. Tako smo v časovnih točkah T14 in T28 na gojišče inokulirali dodatno redčene ( $10^4$  in  $10^5$ ) kozmetične izdelke. Izdelek s konzervansom ekstrakt fermentacije *L. Kimichii* smo dodatno redčili na  $10^4$  in na gojišče nanegli vse 4 redčitve. Pri ostalih dveh konzervansih, pri katerih so kolonije v časovni točki T7 prerastle celotno gojišče, pa smo izvajanje testa

nadaljevali le v redčitvah  $10^4$  in  $10^5$ . Z dodatnim redčenjem kozmetičnih izdelkov smo dosegli to, da smo lahko določili število kolonij, ki so zrastle v časovnih točkah T14 in T28, s tem pa smo lahko nato določili učinkovitost konzerviranja formulacije. Ugotovili smo, da konzervansi ekstrakt fermentacije *L. Kimichii* (koncentracija 1 %), fenoksietanol (koncentracija 0,25 %) in zmes metil- in propilparabena (koncentracija 0,1 %) ne zagotavljajo ustrezne mikrobiološke zaščite formulacije pred bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*. Prav tako so se formulaciji spremenile organoleptične lastnosti – bolj tekoča konsistenca, sprememba vonja, na površini formulacije pa se je razrastla plesen, kar kaže na okužbo formulacije z mikroorganizmi in neustrezno učinkovitost izbrane protimikrobne učinkovine v uporabljeni koncentraciji.



## 5 RAZPRAVA

Zanimanje potrošnikov za naravno kozmetiko se je v zadnjih letih močno povečalo. Pred trendom uporabe naravne kozmetike so po njej posegali le potrošniki, ki so imeli zdravstvene težave s kožo – preobčutljivostne reakcije, dermatitise. Z razvojem ozaveščenosti uporabnikov o uporabi biološko neoporečnih prehrabnih izdelkov se je povečalo tudi povpraševanje in uporaba naravne kozmetike. Po trendih, ki jim potrošniki sledijo, pa se morajo orientirati tudi proizvajalci naravne kozmetike, ki so s trendom naravne kozmetike usmerili svoje moči k iskanju novih sestavin in virov narave, da bi izboljšali delovanje kozmetičnih izdelkov. Tako so največ pozornosti usmerili v iskanje alternativ za sintetične aktivne sestavine in konzervanse. V zadnjih letih so bili skozi različne raziskave in članke, ki so bili objavljeni v medijih, na udaru parabeni, katerim so potrošniki zaradi medijev nadedli negativen pečat. A mnogo posameznikom je neznano, da metilparaben najdemo v naravi – borovnice, korenje, kumare in oljke ga sintetizirajo za obrambo pred mikroorganizmi. Prav tako se p-hidroksibenzojska kislina pojavlja kot metabolit katehinov pri ljudeh, ki uživajo zeleni čaj. O parabenih tako potekajo burne razprave, raziskave pa nakazujejo na to, da so lahko problematični estri p-hidroksibenzojske kisline z alkoholi, daljšimi od treh ogljikovih atomov (npr. butil-, izobutil-, pentil- in heksilparaben) (1). Mediji so v očeh potrošnikov tako ustvarili »strah« pred uporabo, saj naj bi bili toksični za človeški organizem, v katerem naj bi se kopičili in povzročali smrtna bolezenska stanja, kot je npr. rak, kljub temu da je dokazano, da so parabeni v dovoljenih koncentracijah (0,4 % kot posamezni ester ali 0,8 % v kombinaciji oziroma 0,14 % posamezno in v zmesih za butil- in propilparaben) varni za uporabo in da se pri peroralni aplikaciji hitro absorbirajo, metabolizirajo in izločijo z urinom. Za potrošnike bi bil idealen tisti kozmetični izdelek, ki bi bil brez konzervansa in z rokom uporabe najmanj 2 leti, a žal izdelek, ki vsebuje vodo, nujno potrebuje konzervans, saj v nasprotnem primeru pride do razrasti nevarnih mikroorganizmov in tako ne moremo zagotoviti varne uporabe izdelka za človekovo zdravje. Alternativo za sintetične konzervanse so tako proizvajalci pričeli iskati v naravnih sestavinah s protimikrobnim delovanjem. Pri tem se je potrebno zavedati, da nam narava ponuja tudi veliko strupenih snovi in da naravno ni vedno tudi varno. Naravne sestavine lahko vsebujejo spojine, ki so za zdravje potrošnika zelo nevarne in povzročajo alergije, fototoksičnost, mutagenost in druga obolenja. Te spojine so največkrat prisotne v eteričnih oljih. Dandanes poznamo veliko naravnih sestavin s protimikrobnim delovanjem, ki so že v uporabi – neem-ovo olje, ekstrakt

rožmarina, eterično olje čajevca, ekstrakt grenivkinih pešk, janeževa kislina in mnoge druge. Poleg zaščite kozmetičnega izdelka pred mikrobiološko kontaminacijo imajo naravne sestavine tudi mnogo drugih pozitivnih učinkov na kožo. V kozmetičnem izdelku imajo lahko še vlogo aktivne sestavine, dišave, adstringenta, antioksidanta, protivnetno delovanje in druge. Poleg odkrivanja novih sestavin naravnega izvora s protimikrobnim delovanjem se proizvajalci poslužujejo tudi drugih metod, s katerimi povečajo zaščito kozmetičnega izdelka pred razrastom mikroorganizmov. Gre za konzerviranje z encimskim sistemom, z zniževanjem aktivnosti vode in z monoestri srednje-dolgoverižnih maščobnih kislin visoke čistosti. Zaenkrat je o učinkovitosti naravnih sestavin s protimikrobnim delovanjem in novih metod še prezgodaj govoriti, saj je potrebno izvesti še veliko testov učinkovitosti, da bomo lahko zagotovo trdili, da so učinkoviti in varni za uporabo. Pri tem lahko izpostavimo konzerviranje z zniževanjem aktivnosti vode, ki je že znana in dokazano učinkovita metoda, ki poleg konzerviranja izdelka zagotavlja tudi uporabo konzervansa v nižji koncentraciji. Za testiranje le-tega imamo na voljo več smernic, npr. ISO-standard, SCCS-smernice za testiranje kozmetičnih sestavin, Schülke KoKo test, Evropska farmakopeja ter druge (USP 35, ASEAN ACM MAL 08, CTFA M-3 in CTFA M-4). Nova uredba o kozmetičnih izdelkih določa, da mora imeti vsak izdelek pridobljeno oceno varnosti, ki mora vsebovati tudi potrdilo o mikrobiološki kakovosti in izzivni preskus testiranja učinkovitosti.

Za izvedbo izzivnega preskusa učinkovitosti, s katerim preverjamo učinkovitost zaščite kozmetičnih izdelkov pred bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* z izbranimi protimikrobnimi sestavinami, smo izbrali 11 sestavin naravnega izvora, ki smo jih testirali po standardu ISO 11930. Izbrane sestavine naravnega izvora so zmes dehidroocetne kisline in benzil alkohola v razmerju 1 : 10, dehidroocetna kislina, levulinska kislina, sorbinska kislina, gliceril kaprilat, janeževa kislina, ekstrakt fermentacije *L. Kimichii*, benzojska kislina, fenoksietanol, etanol, ekstrakt grenivkinih pešk, salicilna kislina in zmes metil- in propilparabena v razmerju 2 : 1. Zmes metil- in propilparabena je imela vlogo pozitivne kontrole, kot negativno kontrolo pa smo imeli emulzijo brez dodanega konzervansa. V enostavno emulzijo tipa O/V smo vsak konzervans dodali v minimalni in srednji dovoljeni koncentraciji ter tako dobili emulzije, ki so predstavljale osnovo za izvajanje testa. Na podlagi pridobljenih informacij o koncentraciji posamezne protimikrobne sestavine, ki je dovoljena za uporabo v topikalni formulaciji, ki se ne izpira, smo izbrali koncentracije konzervansov, katerih učinkovitost za zaščito kozmetičnega izdelka pred bakterijo

*Pseudomonas aeruginosa* bomo vrednotili. Želeli smo namreč učinkovit konzervans, ki bi uspešno zaviral rast bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. V naslednjem koraku smo emulzije kontaminirali z raztopino bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Nato smo emulzijo nekaj minut mešali s stekleno palčko, da smo raztopino bakterije dobro vmešali v emulzijo. V 28-ih dneh testiranja učinkovitosti so se za učinkovite v obeh koncentracijah izkazali konzervansi dehidroocetna kislina in benzil alkohol, dehidroocetna kislina, levulinska kislina, sorbinska kislina, gliceril kaprilat, janeževa kislina, benzojska kislina, etanol, ekstrakt grenivkinih pešk in salicilna kislina. Skozi celotno obdobje testiranja so učinkovito zavirali razrast bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, prav tako so se ohranile prvotne organoleptične lastnosti emulzije. Samo v visoki koncentraciji sta izdelek ščitila pred mikroorganizmi ekstrakt fermentacije *L. Kimichii* in fenoksietanol. Neučinkovitost proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* pa so po sedmih dneh izkazali konzervansi v nizki koncentraciji, in sicer ekstrakt fermentacije *L. Kimichii* (1 %), fenoksietanol (0,25 %) in zmes metil- in propilparabena (0,1 %). V prvi časovni točki so kolonije preraste celotno gojišče in tako smo okvirno ocenili število kolonij, ki so zrastle na gojišču. Zaradi tega smo v časovni točki T14 in T28 naredili 2 dodatni redčitvi ( $10^4$  in  $10^5$ ). Tako smo lahko določili število nastalih kolonij. Na koncu testiranja smo ugotovili, da omenjeni konzervansi ne ščitijo kozmetičnega izdelka skozi obdobje testiranja, prav tako pa so se spremenile organoleptične lastnosti emulzije. Do neučinkovitosti zmesi metil- in propilparabena (razmerje 2 : 1), je privedla naša napaka med samim postopkom, saj parabeni predstavljajo »standard« za konzervanse. Možne napake med postopkom so nepravilno razmerje metil- in propilparabena v zmesi konzervansa, napaka pri odmerjanju konzervansa v emulzijo, kontaminacija emulzije ali prenizka koncentracija konzervansa. Najverjetnejši razlog za neučinkovitost zmesi metil- in propilparabena v razmerju 2 : 1 je prenizka koncentracija, saj so v kozmetičnih izdelkih metilparaben dovoljen v koncentraciji 0,4 %, v kolikor gre za posamezni ester in v koncentraciji 0,8 %, v primeru zmesi, propilparaben pa je tako posamezno kot v zmesi dovoljen v koncentraciji 0,14%. V naš kozmetični izdelek bi tako za učinkovito zaščito, bilo potrebno dodati 0,4% metilparabena in 0,14 % propilparabena, kar skupno znaša 0,54% ter 5,4 x več, kot smo za izvedbo testa uporabili mi.

Za končno potrditev, da so izbrane sestavine naravnega izvora primerne za konzerviranje kozmetičnih izdelkov, bi bilo potrebno izzivni preizkus opraviti še za *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in *Aspergillus brasiliensis*.

## 6 ZAKLJUČEK

Vračanje nazaj k naravi močno izstopa na vseh področjih in tako so tudi proizvajalci kozmetičnih sestavin odločili, da sledijo temu trendu in v naravnih sestavinah iščejo alternative klasičnim sinteznim sestavinam, ki so že uveljavljene. Pri odkrivanju in uporabi novih sestavin moramo vedno imeti v mislih varnost, ki je najpomembnejša za nas uporabnike. Velikokrat se namreč zgodi, da se sestavine ne testira ustrezno in tako se postavlja pod vprašaj tudi, kakšen bo dolgoročni učinek naravnih spojin na naše telo in samo okolje. Dokazali smo, da nekatere naravne spojine, ki jih že uporabljamo v kozmetičnih izdelkih in katerih primarna funkcija ni zaviranje razvoja mikroorganizmov, izkazujejo tudi ustrezno zaščito proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, tako v minimalni kot srednji priporočeni koncentraciji. Te sestavine so zmes dehidroocetne kisline in benzil alkohola (razmerje 2 : 1), dehidroocetna kislina, levulinska kislina, sorbinska kislina, gliceril kaprilat, janeževa kislina, benzojska kislina, etanol ekstrakt grenivkinih pečk, salicilna kislina. Ekstrakt pri fermentaciji *L. Kimichii* in fenoksietanol sta bila učinkovita le v srednji priporočeni koncentraciji. Neustrezni sta bili minimalni priporočeni koncentraciji, saj v obdobju 28 dni nista zavirali rasti bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Negativna (brez dodanega konzervansa) in pozitivna kontrola (zmes metil- in propilparabena v razmerju 2 : 1) prav tako nista zaščitili emulzije. Presenečenje izzivnega preiskusa je bila neustrezna zaščita mešanice metil- in propilparabena (razmerje 2 : 1), saj parabeni predstavljajo univerzalen in učinkovit konzervans, ki zavira rast vseh mikroorganizmov. V kasnejših raziskavah se je izkazalo, da je bila koncentracija zmesi 0,1 % v izdelku prenizka za ustrezno zaščito formulacije pred razrastjo bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7 LITERATURA

1. D. Janeš, N. Kočevar Glavač: Sodobna kozmetika, Sestavine naravnega izvora, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015, 6–323
2. [http://www.coe.int/t/e/social\\_cohesion/soc-sp/natcosE.pdf](http://www.coe.int/t/e/social_cohesion/soc-sp/natcosE.pdf)
3. [http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/e/guideline\\_natural\\_cosmetics.htm](http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/e/guideline_natural_cosmetics.htm)
4. Q. Chen (2009): Evaluate the effectiveness of natural cosmetic product compared to chemical-based products. International Journal of Chemistry, Australia 2009
5. Uradni list Evropske unije: Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih.
6. [http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives\\_for\\_Cosmetics/281/](http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives_for_Cosmetics/281/)
7. [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/gmp/en/](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/gmp/en/)
8. Urad Republike Slovenije za kemikalije: Vsebina in načini označevanja kozmetičnih proizvodov
9. Uradni list Republike Slovenije, št. 61/2013: Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih
10. L. Björck, C. G. Rosen, V. Marshall, B. Reiter: Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System in milk against pseudomonas and other gram-negative bacteria. Applied Microbiology 1975, 199–204
11. D.C: Steinberg, Preservatives for cosmetics, Allured Pub Corp, 2012, 14–172
12. A. Varvaresou, S. Papageorgiou, E. Tsirivas, E. Protopapa, H. Kintziou, V. Kefala, C. Demetzos (2008): Self-preserving cosmetics, International Journal of Cosmetic Science, 2009, 31, 163–175
13. Dr. Straetmans, Multifunctional additives, Dermosoft GMCY (specifikacija proizvajalca)
14. Dr. Straetmans, Multifunctional additives, Dermosoft 688 (specifikacija proizvajalca)
15. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), Opinion on Benzoic Acid and Sodium Benzoate
16. Sharon Laboratories, Preservatives for focused protection, Phenoxyethanol (specifikacija proizvajalca)
17. Lonza, Geogard 221 Preservative
18. Active micro technologies, Leucidal liquid (specifikacija proizvajalca)

19. Eastman, Sorbic Acid and Potassium Sorbate as cosmetic preservatives (specifikacija proizvajalca)
20. A. Varvaresou, S. Papageorgiou, E. Tsirivas, E. Protopapa, H. Kintziou, V. Kefala, C. Demetzos: Self-preserving cosmetics. 2099
21. Opinion of the Scientific Committee of Cosmetic Products and Non – Food Products intended for consumers (SCCNFP), Salicylic Acid
22. [http://skinfoedia.com/Dehydroacetic\\_acid](http://skinfoedia.com/Dehydroacetic_acid)
23. Siegert W. ISO 11930 A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW Journal, 2012, 138: 44–53
24. L. Wiehlmann, G. Wagner, N. Cramer, B. Siebert, P. Gudowius, G. Morales, T. Köhler, C. van Delden, C. Weinel, P. Slickers, B. Tümmler (2007): Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*
25. <http://www.biomerieux-industry.com/biopharma/bioball-2>
26. [http://www.brazilbeautynews.com/IMG/pdf/oj\\_jol\\_2014\\_282\\_r\\_0002\\_en\\_txt.pdf](http://www.brazilbeautynews.com/IMG/pdf/oj_jol_2014_282_r_0002_en_txt.pdf)

## 8 PRILOGE

### 8.1 PRILOGA 1: TEST UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA

V preglednici 7 je napisano število zrastleh kolonij mikroorganizmov na posameznih petrijevkah in povprečna vrednost števila kolonij za posamezen vzorec.

**Preglednica 7:** Rezultati testa delovanja deaktivatorja

| <i>Konzervans</i>                                      | $N_{Vn}$        |                 |             | $N_V$           |                 |             | $N_{Vr}$        |                 |             |
|--|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
|  | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | $N^b$       | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | $N^b$       | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | $N^b$       |
| <b>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (2 : 1)</b> | 27              | 44              | <b>35,5</b> | 30              | 21              | <b>25,5</b> | 47              | 32              | <b>39,5</b> |
| <b>Dehidroocetna kislina</b>                           | 54              | 30              | <b>42</b>   | 38              | 31              | <b>34,5</b> | 30              | 39              | <b>34,5</b> |
| <b>Levulinska kislina</b>                              | 38              | 31              | <b>34,5</b> | 27              | 28              | <b>27,5</b> | 55              | 65              | <b>60</b>   |
| <b>Sorbinska kislina</b>                               | 43              | 49              | <b>46</b>   | 39              | 32              | <b>35,5</b> | 54              | 35              | <b>44,5</b> |
| <b>Gliceril kaprilat</b>                               | 35              | 32              | <b>33,5</b> | 27              | 35              | <b>31</b>   | 45              | 56              | <b>50,5</b> |
| <b>Janeževa kislina</b>                                | 46              | 36              | <b>41</b>   | 28              | 34              | <b>31</b>   | 41              | 49              | <b>45</b>   |
| <b>Ekstrakt fermentacije <i>L. Kimichii</i></b>        | 37              | 34              | <b>35,5</b> | 43              | 39              | <b>41</b>   | 52              | 40              | <b>46</b>   |
| <b>Benzojska kislina</b>                               | 38              | 45              | <b>41,5</b> | 32              | 28              | <b>30</b>   | 53              | 56              | <b>54,5</b> |
| <b>Fenoksietanol</b>                                   | 47              | 45              | <b>46</b>   | 34              | 28              | <b>31</b>   | 50              | 36              | <b>43</b>   |
| <b>Etanol 70 %</b>                                     | 24              | 39              | <b>31,5</b> | 36              | 32              | <b>34</b>   | 42              | 49              | <b>45,5</b> |
| <b>Ekstrakt grenivkinih pečk</b>                       | 43              | 25              | <b>34</b>   | 31              | 32              | <b>31,5</b> | 56              | 58              | <b>57</b>   |
| <b>Salicilna kislina</b>                               | 35              | 27              | <b>31</b>   | 29              | 35              | <b>32</b>   | 38              | 66              | <b>52</b>   |
| <b>Emulzija brez konzervansa</b>                       | 37              | 43              | <b>40</b>   | 23              | 28              | <b>25,5</b> | 49              | 55              | <b>52</b>   |
| <b>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</b>           | 33              | 31              | <b>32</b>   | 34              | 36              | <b>35</b>   | 52              | 44              | <b>48</b>   |

<sup>a</sup> število kolonij na posamezni petrijevki

<sup>b</sup> povprečna vrednost števila zrastleh kolonij

## 8.2 PRILOGA 2: IZZIVNI PRESKUS

V preglednicah 8, 9 in 10 so prikazani rezultati izzivnega preskusa v posameznih časovnih točkah (7 dni, 14 dni in 28 dni).

**Preglednica 8:** Rezultati izzivnega preskusa 7 dni po inokulaciji

| <i>Konzervansi in koncentracija</i>                    |      | 10x redčitev    |                 |                | 100x redčitev   |                 |                | 1000x redčitev  |                 |                |
|--|------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
|  |      | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> |
| <b>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (2 : 1)</b> | 0,4  | 1               | 2               | 1,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,2  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Dehidroocetna kislina</b>                           | 0,3  | 2               | 2               | 2              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,15 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Levulinska kislina</b>                              | 0,25 | 1               | 2               | 1,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,2  | 0               | 3               | 1,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Sorbinska kislina</b>                               | 0,3  | 0               | 1               | 0,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,15 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Gliceril kaprilat</b>                               | 0,5  | 3               | 0               | 1,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,3  | 0               | 1               | 0,5            | 0               | 0               | 0              | 1               | 0               | 0,5            |
| <b>Janeževa kislina</b>                                | 0,15 | 0               | 4               | 2              | 0               | 1               | 0,5            | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,05 | 11              | 1               | 6              | 1               | 0               | 0,5            | 0               | 0               | 0              |
| <b>Ekstrakt fermentacije <i>L. Kimichii</i></b>        | 1,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 1    | 124             | 123             | 123,5          | 12              | 49              | 30,5           | 5               | 5               | 5              |
| <b>Benzojska kislina</b>                               | 0,25 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 1               | 0               | 0,5            |
|  | 0,13 | 0               | 0               | 0              | 0               | 1               | 0,5            | 0               | 0               | 0              |
| <b>Fenoksietanol</b>                                   | 0,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,25 | TMTC            | TMTC            | TMTC           | TMTC            | TMTC            | TMTC           | 553             | 288             | 420,5          |
| <b>Etanol 70 %</b>                                     | 17   | 1               | 0               | 0,5            | 0               | 0               | 0              | 1               | 0               | 0,5            |
|  | 14   | 4               | 3               | 3,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Ekstrakt grenivkinih pečk</b>                       | 0,5  | 0               | 1               | 0,5            | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,1  | 2               | 0               | 1              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
| <b>Salicilna kislina</b>                               | 0,25 | 7               | 3               | 5              | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              |
|  | 0,13 | 19              | 8               | 13,5           | 4               | 4               | 4              | 0               | 2               | 1              |



|  |     |      |      |      |      |      |      |      |     |       |
|--|-----|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------|
| <b>Emulzija brez konzervansa</b>             | /   | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | 1436 | 523 | 979,5 |
| <b>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</b> | 0,1 | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | TMTC | 726  | 708 | 717   |

<sup>a</sup> število kolonij na posamezni petrijevki

<sup>b</sup> povprečna vrednost števila zrastlih kolonij

**Preglednica 9:** Rezultati izzivnega preskusa 14 dni po inokulaciji

| <i>Konzervansi in koncentracija</i>                    |      | <b>10x redčitev</b>   |                       |                      | <b>100x redčitev</b>  |                       |                      | <b>1000x redčitev</b> |                       |                      |
|--|------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|  |      | <b>1.<sup>a</sup></b> | <b>2.<sup>a</sup></b> | <b>N<sup>b</sup></b> | <b>1.<sup>a</sup></b> | <b>2.<sup>a</sup></b> | <b>N<sup>b</sup></b> | <b>1.<sup>a</sup></b> | <b>2.<sup>a</sup></b> | <b>N<sup>b</sup></b> |
| <b>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (2 : 1)</b> | 0,4  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,2  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Dehidroocetna kislina</b>                           | 0,3  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,15 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Levulinska kislina</b>                              | 0,25 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,2  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Sorbinska kislina</b>                               | 0,3  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,15 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Gliceril kaprilat</b>                               | 0,5  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,3  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Janeževa kislina</b>                                | 0,15 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,05 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Ekstrakt fermentacije <i>L. Kimichii</i></b>        | 1,5  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 1    | 322*                  | 378*                  | 350*                 | 145**                 | 68**                  | 105**                | /                     | /                     | /                    |
| <b>Benzojska kislina</b>                               | 0,25 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,13 | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
| <b>Fenoksietanol</b>                                   | 0,5  | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,25 | /                     | /                     | /                    | 82**                  | 71**                  | 77**                 | 16***                 | 13***                 | 15***                |
| <b>Etanol 70 %</b>                                     | 17   | 0                     | 0                     | 0                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 14   | 1                     | 0                     | 1                    | 0                     | 0                     | 0                    | /                     | /                     | /                    |
|  | 0,5  | 1                     | 0                     | 1                    | 1                     | 0                     | 1                    | /                     | /                     | /                    |

|  |      |   |   |   |       |       |       |        |        |        |
|--|------|---|---|---|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| <b>Ekstrakt<br/>grenivkinih<br/>pečk</b>             | 0,1  | 1 | 0 | 1 | 0     | 0     | 0     | /      | /      | /      |
| <b>Salicilna kislina</b>                             | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0     | 0     | 0     | /      | /      | /      |
|  | 0,13 | 0 | 0 | 0 | 0     | 0     | 0     | /      | /      | /      |
| <b>Emulzija brez<br/>konzervansa</b>                 | /    | / | / | 0 | 187** | 211** | 199** | 65**** | 41**** | 52**** |
| <b>Zmes metil- in<br/>propilparabena<br/>(2 : 1)</b> | 0,1  | / | / | / | 43**  | 91**  | 67**  | 28**** | 14**** | 21**** |

<sup>a</sup> število kolonij na posamezni petrijevki

<sup>b</sup> povprečna vrednost števila zrastlih kolonij

\*rezultati 1000x redčitve

\*\*rezultati 10.000x redčitve

\*\*\*rezultati 100.000x redčitve

**Preglednica 10:** Rezultati izzivnega preskusa 28 dni po inokulaciji

| <i>Konzervansi in koncentracija</i>                    |      | 10x redčitev    |                 |                | 100x redčitev   |                 |                | 1000x redčitev  |                 |                |
|--|------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
|  |      | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> | 1. <sup>a</sup> | 2. <sup>a</sup> | N <sup>b</sup> |
| <b>Dehidroocetna kislina in benzil alkohol (2 : 1)</b> | 0,4  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,2  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Dehidroocetna kislina</b>                           | 0,3  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,15 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Levulinska kislina</b>                              | 0,25 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,2  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Sorbinska kislina</b>                               | 0,3  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,15 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Gliceril kaprilat</b>                               | 0,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,3  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Janeževa kislina</b>                                | 0,15 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,05 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Ekstrakt fermentacije <i>L. Kimichii</i></b>        | 1,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 1    | 309*            | 444*            | 376,5*         | 48**            | 66**            | 57**           | /               | /               | /              |
| <b>Benzojska kislina</b>                               | 0,25 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,13 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Fenoksietanol</b>                                   | 0,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,25 | /               | /               | /              | 48**            | 22**            | 35**           | 5***            | 5***            | 5***           |
| <b>Etanol 70 %</b>                                     | 17   | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 14   | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Ekstrakt grenivkinih pečk</b>                       | 0,5  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,1  | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Salicilna kislina</b>                               | 0,25 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
|  | 0,13 | 0               | 0               | 0              | 0               | 0               | 0              | /               | /               | /              |
| <b>Emulzija brez konzervansa</b>                       | /    | /               | /               | /              | 138**           | 114**           | 126**          | 17***           | 15***           | 16***          |

|  |     |   |   |   |      |      |        |      |       |        |
|--|-----|---|---|---|------|------|--------|------|-------|--------|
| <b>Zmes metil- in propilparabena (2 : 1)</b> | 0,1 | / | / | / | 47** | 58** | 52,5** | 5*** | 17*** | 8,5*** |
|--|-----|---|---|---|------|------|--------|------|-------|--------|

<sup>a</sup> število kolonij na posamezni petrijevki

<sup>b</sup> povprečna vrednost števila zrastlih kolonij

\*rezultati 1000x redčitve

\*\*rezultati 10.000x redčitve

\*\*\*rezultati 100.000x redčitve