

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ SCHAFFER

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ SCHAFFER

**Zagotavljanje mikrobiološke zaščite z janeževo in
levulinsko kislino v kozmetičnem izdelku**

Cosmetic preservation with p-anisic and levulinic acid

Ljubljana, 2014

Raziskave so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani ter v podjetju Favon d.o.o.

Mentorica: izr. prof. Mojca Lunder

Somentor: dr. Luka Wechterbach

Zahvaljujem se svoji mentorici izr. prof. dr. Mojci Lunder, ki mi je bila vedno v pomoč in mi dajala napotke. Ves čas izdelave diplomske naloge mi je nudila strokovno pomoč.

Posebna zahvala gre somentorju dr. Luki Wechersbachu za pomoč od samega začetka izdelave diplomske naloge.

Rad bi se zahvalil tudi podjetju Favon d.o.o. , ki mi je zagotovil materiale, ki sem jih potreboval za testiranje.

Prav tako se zahvaljujem svoji družini, ki mi je omogočila študij in me pri tem spodbujala.

Rad bi se tudi zahvalil svojim prijateljem in puncim za spodbudne besede.

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod vodstvom mentorice izr. prof. Dr. Mojce Lunder in somentorja dr. Luke Wechtersbacha

Kazalo

Povzetek	VI
Abstract	VII
Seznam okrajšav.....	VIII
1. Uvod.....	1
1.1 Konzervansi v kozmetiki.....	1
1.2 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)	2
1.3 Vrste konzervansov in njihovo delovanje	3
1.3.1 Konzerviranje z encimskim sistemom.....	4
1.3.2 Konzerviranje z zniževanjem aktivnosti vode, a_w	4
1.3.3 Konzerviranje z monoestri visoke čistote.....	4
1.3.4 Naravni konzervansi.....	5
1.3.5 Janeževa in levulinska kislina	6
1.4 Kozmetična formulacija	7
2. Namen dela.....	8
3. Materiali in metode	9
3.1 Materiali	9
3.1.1 Kozmetična formulacija	9
3.1.2 Sestava gojišč	12
3.1.3 Sestava Eugon LT 100	13
3.1.4 Sestava diluenta.....	13
3.1.5 Sestava LB agaroze	14
3.2 Metode.....	14
3.2.1 Testiranje učinkovitosti nevtralizacije konzervansa.....	15
3.2.2 Testiranje učinkovitosti konzervansa v Balzamu za noge.....	16
4. Rezultati	18
4.1 Testiranje učinkovitosti nevtralizacije konzervansa.....	18
4.2 Testiranje učinkovitosti konzervansa v Balzamu za noge.....	20
5. Razprava.....	24

6. Zaključek.....	26
7. Viri	27
8. Priloga	29

Enačbe

Enačba 1: Enačba prikazuje zmanjšanje logaritemske vrednosti	15
--	----

Kazalo tabel

Tabela I: Sestava Balzama za noge	9
Tabela II : Mikrobiološki sevi uporabljeni v raziskavi	11
Tabela III: Ocenjevalni kriterij po ISO standardu	14
Tabela IV: Koncentracija, ki smo jo inokulirali v izdelek ter predpisana koncentracija inokuluma	16
Tabela V: Povprečno število kolonij, ki so zrasle pri testu učinkovitosti nevtralizatorja za <i>C. Albicans</i> ter <i>E. coli</i>	18
Tabela VI: Logaritem zmanjšanja R_x	21
Tabela VII: Povprečno število kolonij v izdelku <i>A. brasiliensis</i> po 7, 14 in 33 dneh	29
Tabela VIII: Rezultati štetja kolonij <i>C. albicans</i>	29
Tabela IX: Rezultati štetja kolonij <i>E. coli</i>	29
Tabela X: Rezultati štetja kolonij <i>P. aeurginosa</i>	30
Tabela XI: Rezultati štetja kolonij <i>S. aureus</i>	30

Kazalo slik

Slika 1: Simbol »po odprtju uporabno do«	2
Slika 2: Simbol »minimalni rok trajanja«	2
Slika 3: Prva strukturna formula predstavlja janeževo kislino, druga pa levulinsko kislino.....	6
Slika 4: Balzam za noge [®]	7
Slika 5: Postopek izdelave Balzama za noge	11
Slika 6: Postopek testiranja učinkovitosti konzervansa.....	17
Slika 7: Testno gojišče, kontrolno gojišče in inokulum kontrola <i>C. Albicans</i> na SDA gojišču	19
Slika 8: Testno gojišče, kontrolno gojišče in inokulum kontrola <i>A. Brasiliensis</i> na SDA gojišču.....	19
Slika 9: pH vrednost mešanice kreme in nevtralizatorja	20
Slika 10: Kontaminacija na gojišču TSA. Kolonije mikroorganizmov, ki so zrasle na gojišču, se niso ločile od kolonij inokuliranega mikroorganizma.	20

Slika 11: Sprednja in zadnja stran gojišča <i>A. brasiliensis</i>	21
Slika 12: Gojišče <i>E. coli</i> po 14 dneh	22
Slika 13: Gojišče <i>C. Albicans</i> po 14 dneh	23

Povzetek

Konzervansi so glavne sestavine, ki skrbijo, da se izdelek med uporabo mikrobiološko ne pokvari. V današnjem času se je povpraševanje za kozmetične izdelke naravnega izvora zelo povečalo, zato proizvajalci iščejo nove sestavine, ki bi zamenjale klasične, sintetične sestavine. Gre za to, da smo se začeli bolj zavedati odgovornosti do okolja in samih sebe. Potrošniki želijo naravne sestavine, saj je dejstvo, da se naravne sestavine pogosto povezuje z zdravo kožo. Še posebej so kritični do konzervansov, ker so pogosto glavni krivec za alergije, kožna obolenja in ostale zdravstvene težave. Zato kozmetična industrija išče alternativne načine, kako izdelke mikrobiološko zaščititi. V podjetju Favu d.o.o. se je zaradi mikrobiološke kontaminacije pokvarila celotna serija izdelka Balzam za noge, zato so se odločili poiskati sestavino, ki bi bila učinkovita, varna in naravna. Na podlagi znanstvene in strokovne literature so se odločili uporabiti mešanico janeževe in levulinske kisline ter glicerilkaprilata. Gre za sestavine, ki niso na seznamu dovoljenih konzervansov, ker ne gre za konzervanse, ampak za dišave, ki imajo protimikrobno delovanje. To omogoča tudi, da se na izdelku navede trditev, da je brez konzervansov.

Levulinska in janeževa kislina sta se najprej začeli uporabljati v prehrabeni industriji kot inhibitorja rasti mikroorganizmov. Naš namen je bil dokazati, da sta kislini učinkoviti tudi kot konzervansa v izdelku Balzam za noge firme Favu d.o.o. Testirali smo po ISO 11930 standardu. Test temelji na obremenitvi končnega produkta z inokulumom določenega števila mikroorganizmov. Produkt inkubiramo pri točno določenih pogojih. Po 7, 14 in 28 dneh vzamemo vzorec okuženega produkta in ga prenesemo na gojišče. V zadnji stopnji preizkusa preštujemo kolonije, ki so zrasle na gojiščih, in pregledamo, ali izdelek ustreza zahtevam ISO standarda. Izdelek je ustrezno mikrobiološko zaščiten, če je ustrezno zmanjšanje, oziroma ni znatnega povečanja števila mikroorganizmov. Dokazali smo, da je Balzam za noge z uporabo levulinske in janeževe kisline mikrobiološko zaščiten. Zaradi pozitivnih rezultatov testa so se pri Favu odločili prenehati uporabljati klasične konzervanse ter jih nadomestili s kombinacijo levulinske in janeževe kisline ter glicerilkaprilata.

Ključne besede: *Janeževa kislina, levulinska kislina, naravni konzervansi, ISO 11930, mikrobiološka zaščita kozmetike, glicerilkaprilat*

Abstract

Preservatives are the main ingredients which ensure that the product does not go bad during the usage. Nowadays the demand for cosmetic products of natural origin has increased, which has made the manufacturers look for new ingredients to replace the established, synthetic ingredients. People have started to realize the responsibility we have towards the environment and towards ourselves. Consumers of cosmetic industry demand natural products, because natural ingredients are commonly associated with healthy skin. People are especially critical towards preservatives since they are the main cause for allergies, skin disorders and other health problems. These are the reasons for the search of alternative ways to microbiologically preserve the products. In Favn Ltd. the whole series of the product “*Balzam za noge*” has gone bad because of microbiological contamination, so they decided to find alternative ingredient(s) which would be effective, safe and natural. Due to scientific and professional literature sources they have decided to use a combination of anisic and levulinic acid and glyceryl caprylate. Those ingredients cannot be found on the list of permitted preservatives because they are not classified as preservatives by EU directive but as fragrances with antimicrobial functions. This gives the manufacturer option to claim the product is preservative free.

Levulinic and anisic acid were first used in food industry as growth inhibitors for microorganisms. In my research I will try to prove their efficiency as preservatives in Favn's product “*Balzam za noge*”. I tested the product according to ISO 11930 standard. The test is based on stressing the finished product with the inoculum of exact number of microorganisms. Product is then incubated in specific conditions. After 7, 14, and 28 days the sample of the inoculated product is taken out and smeared on the specific medium. In the final stage of the test, the colonies that have grown on the medium are counted. After the count we have to check if the product meets the criteria of ISO standard. The product is adequately microbiologically protected if there is significant decrease or alternatively no increase in the number of microorganisms. We have shown that “*Balzam za noge*” meets the ISO standard, meaning the anisic and levulinic acids give enough microbiological protection. Due to the favorable test results Favn Ltd. decided to stop using the conventional preservatives and is now replacing them with a combination of levulinic acid, anisic acid and glyceryl caprylate.

Keywords: *Anisic acid, levulinic acid, natural preservatives, ISO 11930, microbiological protection of cosmetics, glycerly caprylate*

Seznam okrajšav

ISO – mednarodna organizacija za standardizacijo (International standard organization)

GMP – dobra proizvodna praksa (good manufacturing practise)

DNA – deoksinukleinska kislina

CFU – število enot, ki tvorijo kolonije

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

N_{vn} – Viabilnost inokuluma brez formulacije

N_{vf} – Viabilnost inokuluma ob prisotnosti formulacije

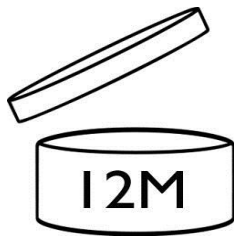
N_v – Viabilnost inokula

1. Uvod

1.1 Konzervansi v kozmetiki

Konzervansi so snovi, ki so izključno ali v glavnem namenjeni zaviranju razvoja mikroorganizmov v kozmetičnem izdelku (1). Uporabljajo se tudi v prehrambeni industriji, da podaljšajo rok uporabnosti. V prehrambeni industriji se konzervansi označujejo z E številom, npr. E200 je sorbinska kislina (2). V Uredbi o kozmetičnih izdelkih (št. 1223/2009) je v prilogi V navedenih 58 dovoljenih konzervansov, ki jih lahko uporabljamo v kozmetičnih izdelkih (1) ter njihove maksimalne dovoljene koncentracije. Konzervansi morajo ščititi kozmetične izdelke in biti varni za ljudi (1). V zvezi z zagotavljanjem mikrobiološke zaščite proizvodom se uporablja nekaj izrazov, ki jih je treba razložiti. Konzervansi so materiali, ki zavirajo rast mikroorganizmov (ali uničijo le-te), ki bi spremenili naš proizvod ali pa proizvedli škodljive snovi za uporabnika. Antiseptik je snov, ki uniči ali zavira rast mikroorganizmov, ko ga apliciramo na tkivo. Primer tega je vodikov peroksid. Dezinfekcijska sredstva ali razkužila uničijo mikroorganizme, ki proizvajajo bolezni na neživih predmetih. Primer je etanol. Izraz germicid je splošno uporabljan za vse produkte, ki uničijo vse vrste mikroorganizmov. Za razliko od razkužil in antiseptikov, ki morajo delovati hitro, mora konzervans delovati enakomerno in učinkovito na širok spekter mikroorganizmov skozi daljše časovno obdobje (3). Kljub temu da kozmetični izdelki vsebujejo konzervanse, to ne pomeni, da lahko nadomestijo ukrepe dobre proizvodne prakse (GMP). Dobra proizvodna praksa je skupek pravil, smernic in nasvetov in kot taka zagotavlja, da izdelava kozmetičnih izdelkov poteka pod varnimi, kakovostnimi procesi, ki preprečujejo kontaminacijo izdelka. To pomeni, da dodajanje konzervansov ne more in ne sme nadomestiti GMP (4).

Konzervansi podaljšujejo uporabnost kozmetičnim izdelkom. Na proizvodu se lahko pojavita dva simbola, simbol »po odprtju uporabno do« in simbol »minimalni rok trajanja«. Prvi simbol pomeni, da ima kozmetični izdelek minimalni rok trajanja več kot 30 mesecev (Slika 1). Ob simbolu je navedeno časovno obdobje varne uporabe izdelka po odprtju, izraženo v mesecih in/ali letih. Minimalni rok trajanja (Slika 2) na embalaži kozmetičnega izdelka pomeni datum, do katerega kozmetični izdelek, shranjen pod ustreznimi pogoji, ohrani svojo prvotno funkcijo in ostane varen za uporabnika (5).



Slika 1: Simbol »po odprtju uporabno do«



Slika 2: Simbol »minimalni rok trajanja«

1.2 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)

Leta 2009 smo dobili novo Uredbo o kozmetičnih izdelkih (št. 1223/2009). Ta je v veljavo stopila 11.7.2013. V njej je navedeno, da mora imeti vsak kozmetični izdelek na tržišču poročilo o njegovi varnosti. V varnostni list kozmetičnega izdelka spada tudi mikrobiološka kakovost. Vsaka snov mora imeti mikrobiološke specifikacije. Uredba prav tako zahteva, da proizvajalec poda rezultate izzivnega testa učinkovitosti konzerviranja (1). Proizvajalec je postavljen pred izziv, koliko konzervansa mora dodati v svoj izdelek. Tu si pomagamo z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). Gre za najnižjo koncentracijo konzervansa, ki inhibira rast mikroorganizmov, a jih ne ubije. MIC določamo z razredčevanjem koncentracije konzervansa - to raztopino dodamo na gojišče, ki je okuženo z znanim številom in vrsto mikroorganizma. Treba se je zavedati, da koncentracija, ki je enaka MIC, še ne zagotavlja zaščite končnega izdelka, saj so v končnem izdelku še druge spojine, ki lahko zavirajo delovanje konzervansa. Ne sme se zgoditi, da bi proizvajalec dodal premalo konzervansa, ker bi se lahko mikroorganizmi preveč namnožili (6). Sedmi člen, v Uredbi o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih, določa še sprejemljivo koncentracijo mikroorganizmov, ki jo izdelek lahko še vsebuje (7). Kozmetični proizvodi v 0,1 g ali v 0,1 ml vzorca ne smejo vsebovati naslednjih mikroorganizmov:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *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 mikroorganizmov iz

prejšnjega odstavka. 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 vzorcu kozmetičnega izdelka, ki je namenjen za nego otrok, mlajših od treh let, ali za uporabo na koži v območju oči in na sluznicah, skupno število živih aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ne sme biti večje kot 100 (7).

1.3 Vrste konzervansov in njihovo delovanje

Glede na kemizem delimo konzervanse na (8) :

- Kisline in njihove soli (sorbinska kislina, benzojska kislina)
- Alkohole (etanol, propilen glikol)
- Tvorilce formaldehida (formaldehid, imidazolidinil urea)
- Derivate gvanidina (kloroheksidin, kloroheksidin diglukonat)
- Organske živosrebrove spojine
- Kvarterne amonijeve spojine (benzalkonijev klorid, behentrimonijev klorid)
- Fenol in njegove derivate (estri in soli parahidrobenzojske kisline, triklosan)

Konzervansi delujejo na celično steno tako, da povzročijo izločanje celične vsebine, spremenijo obliko stene ali pa celo lizo celic. Spremenijo tudi permeabilnost celične membrane, saj se vgradijo na površino le-te. V citoplazmi vplivajo na izražanje genov, na sintezo proteinov v ribosomih in koagulirajo protoplazmo (8).

Želja vsakega proizvajalca je imeti idealen konzervans. Idealen konzervans mora imeti širok spekter delovanja. To pomeni, da zavira/ubije vse vrste mikroorganizmov, kot so glive, plesni, gram pozitivne in gram negativne bakterije. Vendar v praksi navadno tisti konzervansi, ki so učinkoviti proti bakterijam, niso učinkoviti proti glivam in plesnim ter obratno (8). To je glavni razlog, da idealen konzervans ne obstaja. Le-ta bi moral biti učinkovit pri nizkih koncentracijah. S tem se zmanjša možnost, da pri uporabi izdelka pride do iritacij. Ker se mikroorganizmi razvijajo v vodni fazi izdelka, mora biti konzervans topen v vodi in netopen v olju, saj je tako bolj učinkovit. Ne glede na to, katerim temperaturnim in pH pogojem je konzervans podvržen, mora biti stabilen ves čas. Vendar večina organskih snovi ni stabilna, če je podvržena povišanim temperaturam ali ekstremnim pH vrednostim. Konzervans kozmetičnemu izdelku ne sme dodati nobene barve ali vonja ter mora biti kompatibilen z vsemi sestavinami v izdelku. V zadnjem času se zelo poudarja, da so konzervansi nevarni za zdravje uporabnika, zato je nujno, da je

konzervans varen za uporabo. Konzervans bi moral biti z ekonomskega vidika relativno poceni. (8).

Tradicionalni konzervansi so pod vse večjim drobnogledom različnih skupin iz industrije in nevladnih organizacij, zato proizvajalci iščejo druge načine, kako ustrezno mikrobiološko zaščititi svoje izdelke. Velikokrat so izdelki zaradi tega narejeni prehitro ter se tako ne vidi, ali je alternativna mikrobiološka zaščita na dolgi rok res tako učinkovita in varna kot tradicionalni konzervansi (8). Moramo se zavedati, da vsaka spojina, ki je naravna, ni tudi varna pri vsaki koncentraciji. Zato je potrebno vsako novo spojino testirati, če je varna in učinkovita. K netradicionalni mikrobiološki zaščiti spada konzerviranje z encimskim sistemom, konzerviranje z zniževanjem aktivnosti vode, konzerviranje z monoestri visoke čistote ter naravni konzervansi. Vsak sistem je v nadaljevanju opisan bolj podrobno.

1.3.1 Konzerviranje z encimskim sistemom

Encimski sistem je ne-tradicionalni sistem, ki zagotavlja mikrobiološko zaščito. Gre za dvokomponenten sistem, ki deluje kot konzervans le v primeru, ko sta komponenti zmešani skupaj, posamezno pa ne izkazujeta protimikrobnih lastnosti. Komponenti potem napadata encime v mikroorganizmih, to pa ustavi njihove celične procese. Gre za laktoperoksidazo in glukozno oksidazo. Sistema ne smemo segrevati nad 40 stopinj, saj lahko pride do denaturacije encimov (8).

1.3.2 Konzerviranje z zniževanjem aktivnosti vode, a_w

Vemo, da je voda glavni krivec za rast mikroorganizmov v izdelkih. Aktivnost vode je definirana kot razmerje med delnim tlakom vodne pare nad živilom pri določeni temperaturi in delnim tlakom vodne pare nad čisto vodo pri isti temperaturi. Z določanjem aktivnosti vode ocenimo količino proste vode v snovi, ki je odgovorna za presnovo mikroorganizmov. Če zmanjšamo njeno aktivnost pod tisto, ki jo mikroorganizmi potrebujejo za rast, dobimo nov način mikrobiološke zaščite brez uporabe klasičnih konzervansov. Glicerol, glicerilpoliakrilat in etoksidiglikol zmanjšujejo aktivnost vode in na ta način zagotavljajo mikrobiološko zaščito (8).

1.3.3 Konzerviranje z monoestri visoke čistote

Naslednji predstavniki neklasičnih konzervansov so monoestri visoke čistote. Jon Kabara je odkril, da mono-nasičeni maščobni glicerolni estri visoke čistote delujejo protimikrobno (8).

Med te estre spadajo glicerillaurat, glicerilkaprilat in propilenglikolkaprilat. Izkazujejo slabšo protimikrobno zaščito kot klasični konzervansi. Zaradi njihove hidrofilne in hidrofobne strukture jih uporabljamo tudi kot emulgatorje. Fosfolipidi izkazujejo širok spekter zaščite pred grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami kot tudi najbolj pogostimi plesnimi in glivami. Primer tega je kokamidopropil propilenglikoldimonium klorid fosfat, ki ima tudi penilne, protivnetne in čistilne sposobnosti.

1.3.4 Naravni konzervansi

Zahteva po naravnih konzervansih ni bila še nikoli večja in še vedno raste. Če vprašate potrošnika, bi moral biti idealen konzervans naraven, vendar se zatakne že pri prvi točki. Konzervans mora imeti širok spekter delovanja. Večina naravnih konzervansov pa izkazuje zelo ozek spekter delovanja. Zelo malo je naravnih konzervansov, ki bi izkazovali zaščito proti sevom bakterije *Pseudomonas*, ki povzroča največ težav proizvajalcem in predstavlja največjo skrb za zdravje potrošnika (8). Veliko ljudi se ne zaveda, da spojine, ki so sicer klasični konzervansi, najdemo tudi v naravi, vendar zaradi stroškov in varovanja narave, spojine raje pripravljamo sintezno. Mikrobiološko zaščito zagotavlja mešanica janeževe in levulinske kisline. Levulinsko kislino že dalj časa uporabljajo v prehrambeni industriji za dekontaminacijo mesa (9).

Raziskovalci so pod drobnogled vzeli ekstrakte rastline *Ionicera Japonica* v kombinaciji z glicerilkaprilatom, janeževo in levulinsko kislino ter etanolom (10). Testirali so sedem izdelkov po kriterijih Evropske farmakopeje. Ugotovili so, da so vsi sistemi pokazali izjemno protimikrobno zaščito proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam v kislem okolju (pH=5,5). Izkazali pa so manjšo zaščito proti plesnim. Največji problem jim je delal *A. niger*. Ugotovili, da dodatek 0,1 % m/m janeževe ali 0,3 % m/m levulinske bistveno izboljša zaščito proti plesnim, vendar dodatek kislin vpliva na samo stabilnost izdelka. Zato so delež levulinske kisline zmanjšali na 0,1 % m/m in tako dosegli mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilen izdelek (10). Dokazali so, da je dodatek multifunkcionalnih sestavin, kot so glicerilkaprilat, levulinska kislina in janeževa kislina ali etanol, koristen za zaščito izdelka. Avtor je v določenih izdelkih uporabil etanol, kot spojino, ki ojača delovanje konzervansa. Dokazal pa je tudi, da eterična olja okrepijo delovanje konzervansa, zato priporoča uporabo le-teh. Naravne konzervanse delimo na:

- Naravne arome

Veliko dišav in arom izkazuje protimikrobno delovanje, vendar šele v visokih koncentracijah. Nikoli ne uporabljajo samo arome, ker bi lahko prišlo do kontaktnih dermatitisov in alergij (11). Primer naravnih arom s protimikrobnim učinkom so citral, linalol, eugenol, geraniol, timol in farnezol. Največ teh spojin najdemo v olju cimeta, limone, rožmarina, sivke, evkalipta in kumine (8).

- Naravni ekstrakti

Sem štejemo neem olje, usninsko kislino, ekstrakt grenivkinih pečk, eterično olje rožmarina ter olje čajevca (8). Za vse te naravne ekstrakte je značilno, da je potrebno za željen protimikrobni učinek v izdelek dodati velike količine ekstrakta, to pa lahko pripelje do morebitnih zdravstvenih težav.

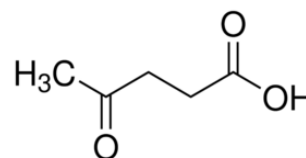
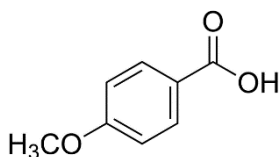
1.3.5 Janeževa in levulinska kislina

- Janeževa kislina

Gre za p-janeževo kislino ali 4-metoksi benzojsko kislino (12). To kislino v naravi navadno najdemo v janežu. Izgleda kot beli kristali, ki so netopni v vodi ter zelo topni v alkoholih. Janeževa kislina ima antiseptične lastnosti. Domači janež ali *Pimpinella anisum* ima sladkast okus, ki malo spominja na mentol. Navadno jo pridobivamo z oksidacijo anentola ali p-metoksi acetofenona.

- Levulinska kislina

Ali 4-oksopentanojnska kislina je organska spojina. Gre za brezbarvno trdnino, ki je topna v vodi in etanolu. Pridobivamo jo z razgradnjo celuloze (13). V kozmetični industriji se levulinska kislina normalno uporablja kot dišava in sredstvo za nego kože (14).



Slika 3: Prva strukturna formula predstavlja janeževo kislino, druga pa levulinsko kislino

1.4 Kozmetična formulacija

Kozmetični izdelek, ki ga bomo testirali je Favnov izdelek Balzam za noge[®]. Gre za emulzijo tipa olje v vodi (O/V), njena tekstura je lahka, zato se tudi hitro vpije v kožo. Izdelek je svetlo rjave barve in ima značilen vonj mentola in divjega kostanja, v ozadju pa se zazna še vonj eteričnega olja limonske trave. Slika 4 prikazuje izdelek.



Slika 4: Balzam za noge[®]

Izdelek je pakiran v 100 ml laminatno večplastno tubo. Vsebuje dve aktivni učinkovini, escin in ekstrakt divjega kostanja. Zaradi tega se krema uporablja za lajšanje otekline sklepov, ima protivnetno delovanje, izboljša periferno prekrvavitev, krepi stene žil in kapilar ter kožo, zaradi lipidnih komponent, neguje in jo nahrani (15).

- Ekstrakt divjega kostanja.

Pridobijo ga iz semen divjega kostanja, katerega latinsko ime je *Aesculum hippocastanum*. Glavna sestavina ekstrakta je escin, ki ima protivnetno, antiedemično in vazoprotektivno delovanje. Učinke so prikazali v študiji na vneti podganji nogi. Vnetje so sprožili z različnimi vnetnimi dejavniki. Dokazali so tudi, da ima učinek na kapilare in sicer povečano rezistenco ter zmanjšano permeabilnost (16). Učinek pripisujejo mešanici saponinov, kjer najdemo tudi eskulin. Zaradi slednjega je lahko alkoholni ekstrakt divjega kostanja strupen, saj povzroča glavobol, vrtoglavico ter srbenje. Divji kostanj vsebuje od 8 do 28 % escina (16). Krema vsebuje skupno skoraj 2 % escina, zato ima zelo močno aktivno delovanje. Priloga 2 prikazuje rezultat mikrobiološke analize, ki je bila opravljena na izvlečku divjega kostanja. Gre za naraven ekstrakt, zato je potrebno opraviti analizo in potrditi, da je ekstrakt ustrezne čistote. Kljub temu, da je število enot, ki tvorijo kolonije (CFU) znotraj parametrov, je le-to visoko. Zato se je potrebno zavedati, da je že ob izdelavi v izdelku večje število mikroorganizmov.

Izdelek vsebuje tudi pet različnih eteričnih olj, ki na različne načine pripomorejo k dodatnemu delovanju kreme. Ena izmed vlog eteričnih olj je, da okrepi delovanje konzervansa. Od petih uporabljenih eteričnih olj ima po literaturi najmočnejše protimikrobno delovanje eterično olje ciprese (17). V mešanici konzervansa je tudi glicerilkaprilat, ki je površinsko aktivna snov in se zaradi tega vključi v membrano mikroorganizma in jo destabilizira. Posledično se struktura membrane poruši.

2. Namen dela

Diplomsko delo je nastalo v sodelovanju s podjetjem Favni d.o.o. Zaradi mikrobioloških razlogov se jim je pokvarila celotna serija izdelkov Balzam za noge. Odločili so se poiskati nove konzervanse, ki so učinkoviti in hkrati naravni. Naš cilj je dokazati:

- da je mešanica p-janeževe kisline, levulinske kisline in glicerilkaprilata primerna za mikrobiološko konzerviranje izdelka Balzam za noge
- da mešanica p-janeževe kisline, levulinske kisline in glicerilkaprilata v obdobju 28 dni zavira rast *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus*
- da p-janeževa kislina, levulinska kislina in glicerilkaprilat ne spremenijo organoleptičnih lastnosti (barva, vonj) emulzije

3. Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kozmetična formulacija

Da smo si zagotovili svež vzorec, smo Balzam za noge pripravili en dan pred začetkom testiranja. Sestava izdelka je prikazana v tabeli I.

Tabela I: Sestava Balzama za noge

Surovina	% surovine	INCI
Prečiščena voda	60,96	Aqua
Konzervans	2,88	*
Citronska kislina	0,10	Citric acid
Glicerol	0,96	Glycerin
Ksantan	0,14	Xanthan gum
Prečiščena voda	2,88	Aqua
Ekstrakt divjega kostanja	0,96	Aesculus Hippocastanum Seed Extract
Escin	0,96	Escin
Vitamin E	0,14	Vitamin E acetate
Radimuls	3,84	Glyceryl stearate citrate
Cutina GMS	1,92	Glycerly monostearate
Karitejevo maslo	9,60	Shea butter
Mandljevo olje	6,72	Simmondsia Chinensis Seed Oil
Lanette O	4,80	Cetearly alcohol
Glicerolkaprilat	0,96	Glycerly caprylate
Eterično olje bosvelije	0,19	Boswelia carterii oil
Eterično olje limonske trave	0,09	Cymbopogon citratus oil
Eterično olje ciprese	0,43	Cupressus sampervirens oil
Eterično olje zelenke	0,29	Gaultheria procumbens (wintergreen) leaf oil
Eterično olje mete	0,08	Peppermint oil

Vitamin E	0,14	Vitamin E acetate
Mentol	0,96	Menthol
	Skupaj 100%	

*Glej spodaj priprava konzervansa

Naredili smo 500 g kreme. Najprej smo morali izdelati mešanico konzervansa, šele potem smo lahko začeli z izdelavo izdelka.

3.1.1.1 Priprava konzervansa

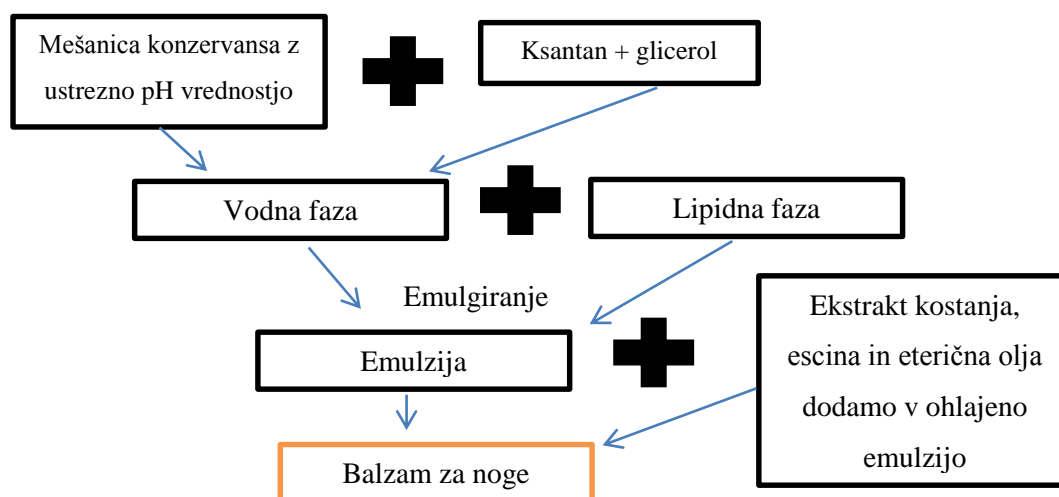
Fitinska kislina	2 %	Sigma Aldrich
Janeževa kislina	10 %	Sigma Aldrich
Glicerol	50 %	Petrol
Levulinska kislina	10 %	Sigma Aldrich
Natrijev hidroksid	7 %	Sigma Aldrich
Prečiščena voda	21 %	

Najprej smo dodali janeževo kislino v glicerol. Potem smo fitinsko in levulinsko kislino raztopili v vodi. Če bi dodali janeževo kislino v vodo, se ne bi raztopila zaradi neustreznega pH-ja, janeževa kislina je namreč dobro topna v vodi le v disociirani obliki nad svojo disociacijsko konstanto $pK_a = 4,47$. Zato smo v vodo dodali NaOH in nato še anizinsko kislino, raztopljeno v glicerolu. pH vrednost mešanice konzervansa je bila 8,5. Ob dodatku v kremo smo pH vrednost znižali na 5,5.

3.1.1.2 Izdelava testnega vzorca

Mešanico konzervansa smo raztopili v vodi ter pH znižali z 10 % citronsko kislino. Čašo smo prenesli na magnetno mešalo z grelnikom, da se je mešanica konstantno mešala. pH vrednost smo naravnali na 5,5. Potem smo zatehtali ksantan in mu dodali glicerol, da se je ves ksantan omočil. Tej mešanici smo dodali vodo. V čašo smo zatehtali lipidne komponente, vitamin E, Radiamuls, Cutina GMS, karitejevo maslo, mandljevo olje, Lanette O in glicerolkaprilat, ter jih dali na vodno kopel, da so se vse raztalile. Stopljene maščobe smo pazljivo zlili v vodno fazo ter emulgirali s turbo mešalom. V drugo čašo smo previdno zatehtali ekstrakt kostanja in escin.

Ekstraktu smo dodali vodo ter jo segreli na 70 °C. Emulziji smo ga dodali, ko se je le ta ohladila na 40 °C. Vsa eterična olja, vitamin E in mentol smo zatehtali skupaj ter jih premešali s turbo mešalom. Dodali smo jih v že stabilno kremo pri 35 °C. Na sliki 5 je za lažjo predstavbo celotnega postopka narisani grafični prikaz.



Slika 5: Postopek izdelave Balzama za noge

ISO standard 11930 za oceno mikrobiološke zaščite kozmetičnih izdelkov predpisuje točno določene seve mikroorganizmov. Vsi uporabljeni sevi so prikazani v tabeli II (18).

Mikroorganizmi	Bioball™ sev	Ekvivalenten ATCC® sev
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NCPF 2275	16404
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3179	10231
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	6538
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	8739

Tabela II : Mikrobiološki sevi uporabljeni v raziskavi

Uporabili bomo seve mikroorganizmov, ki smo jih kupili pri Biomerieux™, zaradi njihove praktične oblike, v kateri pridejo. Dobili smo jih v Bioball™ obliki, kjer so sevi v obliki kroglice. Gre za liofilizirano obliko, ki se ob dodatku rehidracijskega pufru takoj raztopi in je pripravljena za uporabo (19). Mikroorganizmi podjetja Bioball™ imajo konsistentno število CFU iz serije v serijo ter točno določeno število CFU v primerjavi s klasično pripravo sevov mikroorganizmov. Za različne mikroorganizme smo uporabili različna gojišča. Bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* so rasle na gojišču TSA (triptični soja agar). *C. albicans* smo inkubirali na gojišču SDA (saboraudovo gojišče z

dekstrozo). Ker ima gojišče SDA pH vrednost 5,6, zavira rast bakterij in je selektivno za glive. Plesen *A. brasiliensis* smo gojili na gojišču PDA (krompirjevem dekstroznem agarju). Vsa gojišča smo kupili že sterilna in pripravljena za uporabo pri podjetju Biomerieux™.

3.1.2 Sestava gojišč

- Triptični soja agar (TSA)

Peptone	15 g
Natrijev klorid	5 g
Agar	15 g
Prečiščena voda	do 1000 ml

- Saboraudovo gojišče z dekstrozo (SDA)

Dekstroza	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Prečiščena voda	do 1000 ml

- Krompirjev dekstrozni agar (PDA)

Poparek krompirja	200 g
Dekstroza	20 g
Agar	20 g
Prečiščena voda	do 1000 ml

Pri testu smo potrebovali tudi nevtralizator, ki prepreči delovanje konzervansa med izzivnim testom. ISO standard predpisuje uporabo Eugona LT 100. Gre za medij, ki vsebuje sestavine za nevtralizacijo protimikrobnih sestavin (konzervans) ter porazdelitveni agent, triton X 100, ki deluje tako, da sprosti mikroorganizme iz filma v kozmetičnem izdelku. Glavni sestavini, ki

preprečita delovanje konzervansov, sta jajčni lecitin in polisorbitat 80. Tudi Eugon LT 100 smo kupili pri podjetju Biomerieux™. Ker Eugon deluje le v pH območju 7+ /- 0,2, smo morali preveriti, ali pH ustreza predpisu.

3.1.3 Sestava Eugon LT 100

Pankreasni hidrolizat kazeina	15 g
Natrijev klorid	4 g
Papaični razgrad sojine moke	5 g
L-cistein	0,7 g
Natrijev sulfit	0,2 g
Glukoza	5,5 g
Jajčni lecitin	1 g
Polisorbat 80	5 g
Triton X100	1 g
Prečiščena voda	do 1000 ml

Za redčenje do ustreznih koncentracij mikroorganizmov, smo uporabili diluent.

3.1.4 Sestava diluenta

Natrijev klorid	8,5 g
Pankreasni hidrolizat kazeina	1 g
Prečiščena voda	1000 ml

Komponente smo raztopili v vodi med mešanjem in gretjem. Ko se je vse raztopilo, smo dali sterilizirati v avtoklav pri 121 °C za 15 min. Diluent smo nato hranili pri sobni temperaturi (22,5+/-2,5 °C).

Ker smo kupili že vnaprej pripravljena trdna gojišča v petrijevkah, smo morali spremeniti način nanosa inokuliranega vzorca. Uporabili smo LB agarozo, v katero smo dodali vzorec, ter jo potem zlili na trdno gojišče.

3.1.5 Sestava LB agaroze

Volumen LB medij	40ml
Volumen MgCl ₂ (1M)	197 μl
Količina Agarosa	0,28g

Odpipetirali smo 1M MgCl₂ ter agarozo ter ju raztopili v LB mediju s pomočjo magnetnega mešala. Avtoklavirali smo pri 121 °C in 1 baru nadtlaka. Pred uporabo smo vsebino segreti v mikrovalovni pečici do te mere, da je vsebina postala tekoča. Potem smo prelili v 15 ml vsebnik, ki smo ga inkubirali na termo-bloku pri temperaturi 50 °C, zato da ne bi nastale grudice v LB agarozii.

3.2 Metode

Izdelek smo testirali po ISO 11930 standardu. V kremo se inokulira znano število mikroorganizmov ter se po določenih časovnih točkah opazuje, ali krema ustreza predpisanemu standardu. Standard predpisuje zahtevano število mikroorganizmov, ki jih moramo nacepiti. Mikroorganizmi, ki smo jih uporabili, so že predhodno razredčeni na to število. ISO standard vsebuje tabelo, ki prikazuje ocenjevalni kriterij za preizkus učinkovitosti konzervansa. Tabela III prikazuje ta kriterij. Enačba 1 prikazuje formulo za izračun.

Tabela III: Ocenjevalni kriterij po ISO standardu

Zmanjšane logaritemske vrednosti ^a								
$R_x = \log N_0 - \log N_x$								
Mikroorganizmi	Bakterije			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Inkubacijski čas	7dni	14dni	28dni	7dni	14dni	28dni	14dni	28dni
Kriterij A	≥ 3	≥ 3 in NP ^b	≥ 3 in NP	≥ 1	≥ 1 in NP	≥ 1 in NP	≥ 0 ^c	≥ 1
Kriterij B	Ni podatka	≥ 3	≥ 3	Ni podatka	≥ 1	≥ 1 in NP	≥ 0	≥ 0 in NP
<p>a V tem testu je sprejeto območje odstopanja 0,5 log</p> <p>b NP: ni povečanja v štetju od prejšnjega štetja</p> <p>c $R_x=0$ ko je $\log N_0=\log N_x$</p>								

Enačba 1: Enačba prikazuje zmanjšanje logaritemske vrednosti

$$R_x = \log N_0 - \log N_n$$

3.2.1 Testiranje učinkovitosti nevtralizacije konzervansa

Nevtralizator mora preprečiti protimikrobno delovanje konzervansa, ne da bi pri tem sam zaviral rast mikroorganizmov. Učinkovitost nevtralizatorja smo preizkusili na *E.coli* ter *C. albicans*. Najprej je bilo potrebno pripraviti ustrezne redčitve inokuluma, saj smo potrebovali 10^3 CFU/ ml. Postopek preverjanja je za oba mikroorganizma popolnoma enak . V stekleno vialo smo odpipetirali 1 ml rehidracijske tekočine, da se je Bioball raztopil. Sedaj smo imeli v stekleni viali 10^8 CFU/ ml *C. albicans*. Pripravili smo redčitveno vrsto, od 10^8 do 10^4 CFU/ ml v diluentu. S ponovnim 10 kratnim redčenjem smo pripravili 4 ml raztopine inokuluma s koncentracijo 10^3 CFU/ml. En gram izdelka smo preneseli v 9 ml nevtralizatorja (Eugon LT 100) ter močno pomešal. Tako pripravljen testni vsebnik smo pustili pri sobni temperaturi 30 minut. Za kontrolo smo dodali v 9 ml nevtralizatorja 1 ml diluenta. Potem smo testni in kontrolni vsebnik inokulirali z 1 ml inokuluma. Končni volumen v obeh vsebnikih je bil 11 ml. Za kontrolo viabilnosti inokuluma smo dodali 1 ml inokuluma in 10 ml diluenta. Zaradi zahteve predpisa smo 0,5 ml vsebine vsakega vsebnika nanесли na 2 trdni gojišči in izračunal povprečno število kolonij.

ISO standard predpisuje nanos 1 ml iz vsakega vsebnika na ustrezno gojišče, vendar smo s predhodnim eksperimentom ugotovili, da 1 ml predstavlja preveliko količino, da bi jo gojišče lahko sprejelo. Zato smo se odločili volumen zmanjšati na 0,5 ml in zraven uporabiti še LB agarozo. Iz vsakega vsebnika smo vzeli 0,5 ml vsebine in dodali k 3 ml LB agaroze, segrete na 50°C . Vse skupaj smo zlili na ustrezno gojišče. Mikrobiološko štetje se izvaja v dveh paralelah, to pomeni, da se za kontrolo uporabi dve gojišči, za testno dva in za inokulum kontrolo dva.

Da se je LB agarosa porazdelila po trdnem gojišču, smo hitro nagibali gojišče. Gojišče z *E. coli* smo inkubirali pri $32,5^\circ\text{C}$ 48 ur, gojišče s *C. albicans* pa pri sobni temperaturi ($22,5^\circ\text{C}$) 5 dni.

3.2.2 Testiranje učinkovitosti konzervansa v Balzamu za noge

V stekleno vialo z ustreznim mikroorganizmom smo dodali 1,1 ml rehidracijske raztopine. Koncentracija mikroorganizmov v stekleni viali je bila 10^8 CFU/ ml. Iz tabele IV je razvidno, da je predpisana koncentracija za *A. brasiliensis* in *C. albicans* nižja, kot pri bakterijah. Zato smo naredili dodatno desetkratno redčitev. V 50 ml vsebnik smo natehtali 19,82 g izdelka. V vsebnik smo prenesli 200 μ l raztopine mikroorganizma. Zaradi zelo velike viskoznosti izdelka smo s sterilno stekleno palčko mešali 2 minuti, da se je inokulum homogeno vmešal v izdelek. Koncentracija mikroorganizmov v izdelku je bila 10^6 CFU/ ml.

V tabeli IV so prikazane okvirne koncentracije, ki jih predpisuje ISO standard ter koncentracije, ki smo jih inokulirali v izdelek.

Tabela IV: Koncentracija, ki smo jo inokulirali v izdelek ter predpisana koncentracija inokuluma

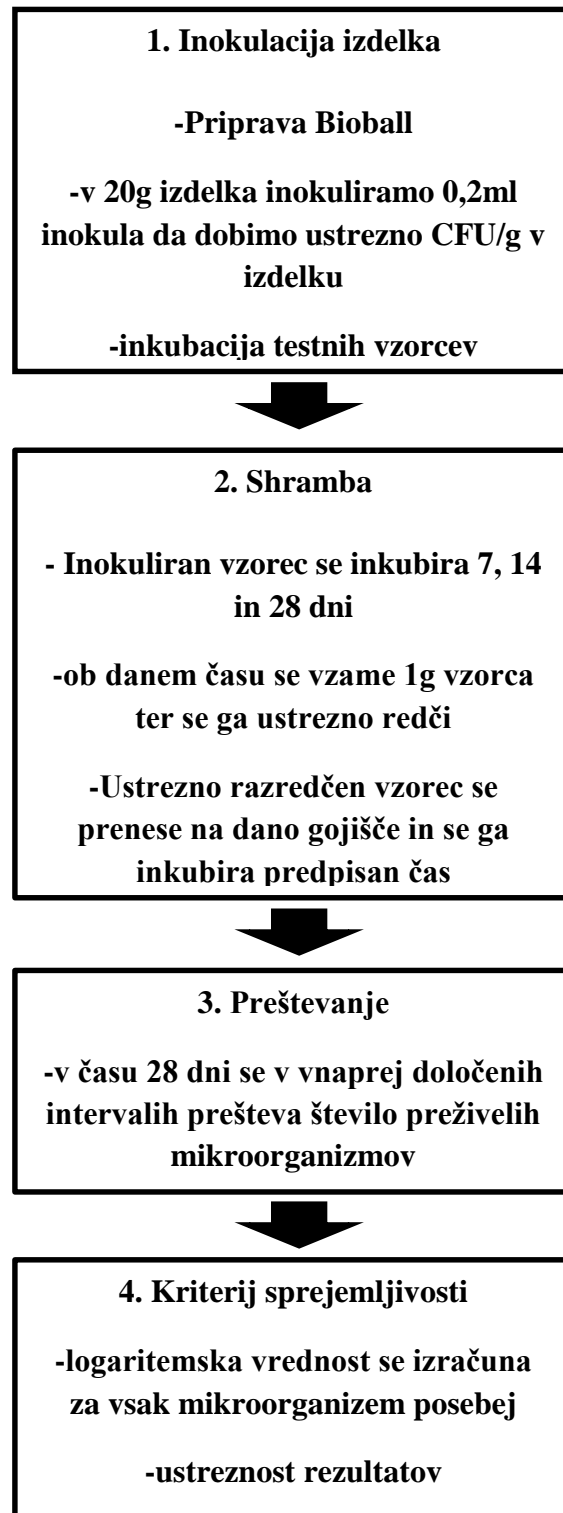
Mikroorganizem	Inokulirana koncentracija CFU/ ml	Predpisana koncentracija CFU/ML
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	$5,5 * 10^5$	Od 10^4 do 10^5
<i>Candida albicans</i>	$5,5 * 10^5$	Od 10^4 do 10^5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,1 * 10^6$	Od 10^5 do 10^6
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,1 * 10^6$	Od 10^5 do 10^6
<i>Escherichia coli</i>	$1,1 * 10^6$	Od 10^5 do 10^6

Kot predpisuje ISO standard, smo po 7 (T_7), 14 (T_{14}) in 28 dneh (T_{28}) vzeli 1 g inokuliranega produkta, ga ustrezno redčili in s pomočjo LB agaroze nanegli na gojišče ter ga inkubirali pri $22,5 \pm 2,5$ °C 48 ur.

En gram inokuliranega izdelka smo prenesli v 9 ml nevtralizatorja, dobro premešali in inkubirali 30 min. Preverili smo ali pH kreme ustreza ISO predpisu, tako da smo pH papirček pomočili v raztopino, kjer smo imeli kremo in nevtralizator.

Pripravili smo 1,4 ml volumen redčitev: 10^1 , 10^2 , 10^3 in 10^4 v diluentu. Ustrezno smo označili trdna gojišča ter pripravili LB agarozo, v katero smo vnesli 500 μ l redčenega vzorca. Vse skupaj smo dobro premešali in hitro nanegli na ustrezno gojišče, da se niso delali mehurčki ter grudice. Vsako redčitev smo nanegli na gojišče v dveh paralelah.

Za *A.brasiliensis* smo gojišče pred uporabo segreti v vodni kopeli pri 100 °C ter ga nato inkubirali pri 44-47°C. Redčenega vzorca nismo nanašali na trdno gojišče s pomočjo LB agaroze, temveč smo ga nanegli v sterilne petrijevke, čezenj pa zlili segreto PDA gojišče. Počakali smo 10 minut, da se je gojišče strdilo, potem pa smo inkubirali 3 dni pri 22,5 °C. Slika 6 prikazuje celoten postopek dela.



Slika 6: Postopek testiranja učinkovitosti konzervansa

4. Rezultati

4.1 Testiranje učinkovitosti nevtralizacije konzervansa

Po ISO predpisu je test učinkovitosti nevtralizacije konzervansa uspešen, če je povprečno število kolonij v kontroli N_{vn} (viabilnost inokuluma brez formulacije- kontrola) in kontroli N_v (viabilnost inokuluma- inokulum kontrola) približno enako ter če je število mikroorganizmov N_{vf} (viabilnost inokuluma ob prisotnosti formulacije-test) vsaj 50 % vrednosti N_{vn} . Če N_{vn} ni blizu N_v , potem se šteje, da je nevtralizator toksičen za mikroorganizme in je potrebno izbrati drug nevtralizator. V tabeli V so prikazani rezultati testa učinkovitosti nevtralizatorja za *C. albicans*.

Tabela V: Povprečno število kolonij, ki so zrasle pri testu učinkovitosti nevtralizatorja za *C. Albicans* ter *E. coli*

Povprečno število kolonij (cfu)	<i>C. albicans</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Viabilnost inokuluma ob prisotnosti formulacije, N_{vf}	37	$N_{vf}>17,5$	30	$N_{vf}>19,75$
Viabilnost inokuluma brez formulacije, N_{vn}	35		39,5	
Viabilnost inokuluma, N_v	34,5		25,5	

Na trdnem gojišču SDA so zrasle majhne bele kolonije (Slika 7), ki so bile vse približno enake velikosti. Testno gojišče, ki je bilo takoj po vlitju vsebine motno obarvano zaradi rjave barve kreme, je bilo po 5 dneh spet bolj prozorne barve. Kot nam predpisuje ISO standard, smo za ustreznost nevtralizatorja pogledali 2 parametra. Prvi parameter zahteva, da mora biti število kolonij na kontrolnem gojišču približno enako številu kolonij na gojišču z inokulum kontrolo. Vidimo, da je N_v -34,5 in N_{vn} - 35, tako da so naši rezultati skladni z ISO standardom. N_{vf} vrednost je 37, kar je več kot 50% vrednosti N_{vn} . Prav tako ustreza drugemu parametru, ki zahteva, da je N_{vf} vsaj 50 % vrednosti N_{vn} . Dokazali smo, da nevtralizator ni toksičen za glive, saj vrednosti, ki smo jih dobili, ne odstopajo od zahtev, ki so zapisane v ISO standardu. Na Sliki 7 vidimo kolonije *C. albicans*.



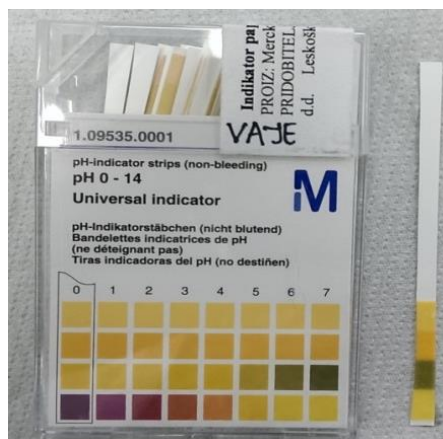
Slika 7: Testno gojišče, kontrolno gojišče in inokulum kontrola *C. Albicans* na SDA gojišču

Na trdnem gojišču TSA sta zrasli dve velikosti kolonij. Razlog za to je, da se morda mikroorganizmi niso dobro raztopili v diluentu. Povprečno število kolonij N_{vn} (39,5) in N_v (25,5) sta si podobna, zato prvi del pogoja ustreza ISO standardu. Povprečno število kolonij ne odstopa za več kot 50 %. Tudi povprečno število kolonij N_{vf} je večje $0,5 \times N_{vn}$. Vidimo, da tudi drugi del pogoja ustreza ISO standardu. Na sliki 8 vidimo kolonije *E. coli*.



Slika 8: Testno gojišče, kontrolno gojišče in inokulum kontrola *A. Brasiliensis* na SDA gojišču

S pH papirčki smo preverili pH vrednost mešanice kreme in nevtralizatorja. pH vrednost je bila 7, kar ustreza predpisu ISO standarda. Na sliki 9 je prikazan pH papirček poleg pH skale.

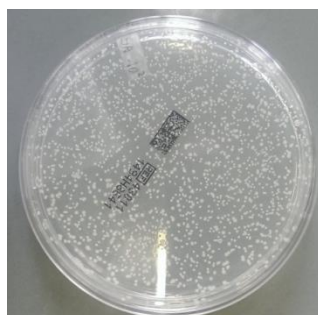


Slika 9: pH vrednost mešanice kreme in nevtralizatorja

Rezultat: Nevtralizator, Eugon LT 100, ki smo ga uporabili, učinkovito nevtralizira protimikrobno delovanje pripravka in ne zavira rasti mikroorganizmov (*C. albicans* in *E. coli*).

4.2 Testiranje učinkovitosti konzervansa v Balzamu za noge

Rezultate, ki smo jih dobili, smo primerjali s tabelo III v uvodu . Prešteli smo kolonije, ki so zrasle na gojiščih ter izračunali R_x . Pri določanju števila mikroorganizmov *A. brasiliensis*, *S. aureus* in *P. auerginosa* v testiranem izdelku po 28 dneh, smo nevede uporabili bakteriološko kontaminiran diluent. Števila zato nismo mogli ustrezno določiti in smo dodali novo časovno točko po 33 dneh. Slika 10 prikazuje kontaminacijo na gojišču TSA.



Slika 10: Kontaminacija na gojišču TSA. Kolonije mikroorganizmov, ki so zrasle na gojišču, se niso ločile od kolonij inokuliranega mikroorganizma.

Bakterije in glivo smo inkubirali 2 dni pri 32,5° C, plesen pa smo inkubirali 3 dni pri sobni temperaturi. Rezultati so prikazani kot logaritem zmanjšanja števila mikroorganizmov v testiranem izdelku (Tabela VI).

Povprečno število posameznih mikroorganizmov na trdnem gojišču in preračunano povprečno število mikroorganizmov v testiranem izdelku je podano v prilogi 1.

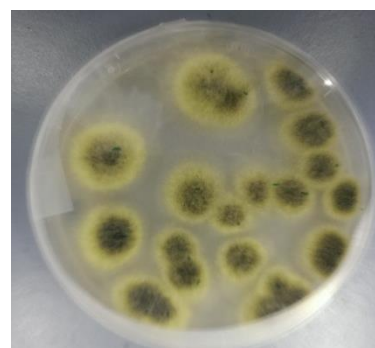
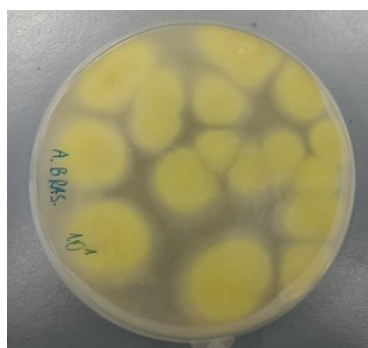
Tabela VI: Logaritem zmanjšanja R_x

	Logaritem zmanjšanja (R _x)		
	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
<i>Escherichia coli</i>	>4,7	1,35	3,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	3,7	>3,7*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,8	>3,7	>3,7*
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	3,2	3,3	>3,6*
<i>Candida albicans</i>	3,4*	3,1	3,7

*R₃₃

- *A. brasiliensis*

Kot vidimo na sliki 11 so na PDA gojiščih zrasli miceliji, ki so bili z ene strani rumeni, z druge pa črni. Krema ustreza zahtevam, ki jih predpisuje ISO standard, saj je vrednost R_x višja od predpisane. Največ kolonij je zraslo na gojišču z 10-kratno redčitvijo, kjer imamo največ prisotnega konzervansa. Pri kremi, kjer je bila inokulirana *A. brasiliensis*, smo po 14 dnevih videli spremembo v njeni konsistenci oziroma strukturi, postala je bolj tekoča. Ni pa prišlo do nobene spremembe v barvi ali vonju. Pogledali smo lastnosti konzervansa proti katerim mikroorganizmom je najbolj učinkovit in smo ugotovili, da je proti plesnim zaščita najslabša, zato se priporoča pazljivost glede plesni (20).



Slika 11: Sprednja in zadnja stran gojišča *A. brasiliensis*

- *P. aeruginosa*

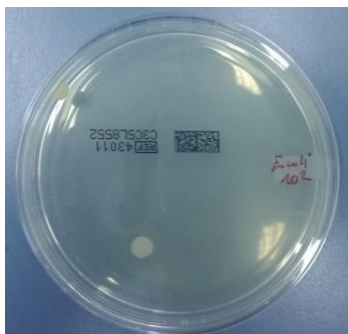
P. aeruginosa je rasla na gojišču TSA kot majhne bele kolonije s premerom 2 mm. Izbrani konzervans uspešno zaščiti izdelek pred *P. Aeruginosa*. Konsistenca kreme je ostala nespremenjena. Tudi barva in vonj sta ostala enaka kot na začetku.

- *S. aureus*

Kolonije *S. Aureus* so vidne kot bele pikice premera 1mm. Iz tabele VI je razvidno, da je število mikroorganizmov padlo za največ velikostnih razredov pri *S. aureus*. R_7 vrednost je bistveno nad vrednostjo, ki jo zahteva ISO standard. Po 14 in 33 dneh ni zrasla niti ena kolonija. Iz sledečih rezultatov lahko zaključimo, da krema ustreza standardu glede *S. aureus*. Po koncu testiranja krema ni spremenila barve vonja ali konsistence.

- *E. coli*

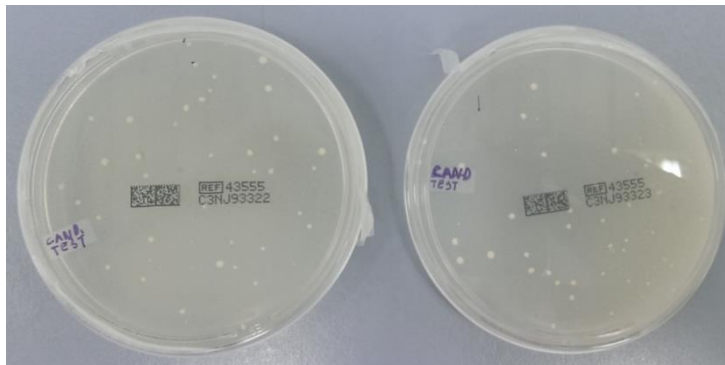
Kot vidimo na sliki 12 so zrasle kolonije bele barve, premera približno 3-5mm. Vrednost R_7 odstopa od zahtevane vrednosti, 3, za več kot 0,5 logaritemske vrednosti. Kljub temu da od zahtevane vrednosti odstopa, je vrednost veliko višja kot 3, kar nakazuje na zelo dobro protimikrobno zaščito. Najbolj odstopa vrednost R_{14} , kar nakazuje na to, da je med sedmim in štirinajstim dnem prišlo do povečanja števila bakterij, ki pa je nato ponovno upadlo in v točki T_{28} ustreza predpisu. R_{14} od 3 odstopa za 1,65, kar je več kot predpisuje standard. Vendar je spremljanje zaviranja rasti bakterije *E. coli* za topikalne pripravke manj relevantno kot za peroralne pripravke (18). Krema izkazuje dobro zaščito proti *E.coli*. Organoleptične lastnosti kreme se skozi celoten test niso spremenile.



Slika 12: Gojišče *E. coli* po 14 dneh

- *C. albicans*

Na SDA gojišču, kjer smo imeli *C. Albicans*, so zrasle bele kolonije premera 1 mm. Tako kot pri *E. Coli* pri prvi časovni točki ni zrasla nobena kolonija, kar pomeni, da je po sedmih dneh število mikroorganizmov močno upadlo. Vse ostale vrednosti R_x so ostale znotraj zahtevanih parametrov. Krema je ostala nespremenjena. Slika 13 prikazuje zrasle kolonije *C. albicans*.



Slika 13: Gojišče *C. albicans* po 14 dneh

5. Razprava

Trend naravne kozmetike nas odmika od sintetičnih sestavin, ne glede na to ali gre za dobre ali slabe sestavine. Zaradi potrošnikov se je večina proizvajalcev kozmetičnih izdelkov pospešeno začela ukvarjati z odkrivanjem novih naravnih sestavin. Največji razcvet v tem iskanju so doživele aktivne sestavine in konzervansi. Slednji so največkrat krivci za različne alergije in kožne bolezni (12). Parabeni so bili najbolj na medijskem udaru, vendar veliko ljudi ne ve, da metilparaben najdemo v borovnicah in nič manj ljudi zaradi tega ne je borovnic (17). Idealen kozmetičen izdelek za potrošnika bi bil brez konzervansov ter rokom uporabnosti najmanj 2 leti. Vendar to ne gre, saj je potrebno imeti konzervans, ki zavira rast mikroorganizmov. Zato so se proizvajalci odločili poiskati naravne konzervanse. Kljub temu da gre za naravne spojine, moramo vedeti, da so tudi naravne spojine povzročitelji alergij, fototoksičnosti in drugih obolenj. Najpogosteje so to sestavine eteričnih olj. Dandanes poznamo veliko konzervansov, ki spadajo v kategorijo naravnih spojin, in sicer so to janeževa kislina, eterično olje čajevca, eterično olje rožmarina, neem olje, ekstrakt grenivkinh pečk in mnoge druge. Naravni konzervansi imajo velikokrat tudi vlogo dišave, rubefacienta, adstringenta ter protivnetno delovanje. Zato so za mnoge bolj smiselna izbira. Proizvajalci se poslužujejo tudi neklasičnih načinov zaščite svojih izdelkov pred mikroorganizmi. Gre za konzerviranje z encimskimi sistemi, z zniževanjem aktivnosti vode ter z monoestri visoke čistoče (9). Ali gre za učinkovit pristop na dolgi rok, je pre zgodaj reči. Vse neklasične ali naravne konzervanse je potrebno testirati ali so dovolj učinkoviti, da izdelek zaščitijo pred mikroorganizmi ter da so varni. Na voljo je več različnih smernic, npr. ISO standard, Schülke Köko test, SCCS smernice za testiranje kozmetičnih sestavin ter Evropska farmakopeja. Pri podjetju Favni so izdelali Balzam za noge, ki je bil zaščiten z Euxylom 100 in Euxylom K9010. Gre za konzervansa, ki imata biocidno delovanje. Kljub učinkovitima konzervansoma se je celotna serija izdelkov pokvarila. Tuba, v kateri je bil izdelek, se je napihnila in izdelek je imel neprijeten vonj. Zato so se odločili poiskati zamenjavo. Odločili so se za uporabo p-janeževe kisline, levulinske kisline in glicerilkaprilata. Učinkovitost izbranega konzervirnega sistema smo testirali po ISO standardu 11930, saj je potrebno po novi uredbi o kozmetičnih izdelkih vsakemu izdelku priskrbeti oceno varnosti, kamor spada tudi mikrobiološka kakovost in izzivnega preizkusa učinkovitosti konzerviranja. Že v začetku smo se soočili s težavo, kako zaradi velike viskoznosti izdelka homogeno vmešati mikroorganizme v kremo. Izdelek smo, po vnosu inokula, mešali s stekleno palčko 10 minut, da bi se vse homogeno razmešalo. Po 28 dneh testiranja so se mi kontaminirala gojišča, kar smo tudi dokazali. Kontaminiran je bil

diluent, zato smo morali narediti novo mešanico. Rezultati, ki smo jih dobili, so pokazali učinkovitost izbranega sistema konzerviranja. Pri *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* in *A. brasiliensis*. je koncentracija mikroorganizmov v testiranem izdelku padala pod mejo detekcije v časovni točki. Pri *C. albicans* po 7 dneh, pri *S. Aureus* po 33 dneh, pri *P. Aeruginosa* po 14 in 33 dneh ter pri *A. Brasiliensis* po 33 dneh. To pomeni, da v teh časovnih točkah ni zrasla nobena kolonija. Kljub temu da smo uporabili najmanjše redčitve mikroorganizmov, ki smo jih nanegli na gojišče, kar kaže na učinkovitost konzervansa. Pri ostalih, kjer pa so zrasle kolonije, so bile R_x vrednosti vedno višje od predpisane. Posebej moram omeniti rezultate *E. Coli*, saj je po 14 dneh rezultat R_x nižji od predpisane. Kljub temu da je vrednost za 1,65 nižji od predpisane, to ne igra signifikantne vloge, saj je bakterija *E. coli* bolj pomembna pri testiranju izdelkov za peroralno uporabo. Pri *A. brasiliensis* smo po koncu testiranja opazili spremembo v konsistenci kreme. Postala je bolj tekoča kot pred začetkom testiranja. Po koncu testiranja na *S. aureus* se konsistenca in barva kreme nista spremenili. Tudi pri *P. aureginosa* se organoleptične lastnosti niso spremenile. Pri *C. albicans* smo dobili bistveno višje R_x vrednosti od predpisanih. Vse vrednosti R_x so bile za minimalno 2 enoti višje od predpisane 1. Dokazali smo, da je z novim konzervansom izdelek ustrezno mikrobiološko zaščiten proti glavnim mikroorganizmom, ki kvarijo kozmetične izdelke. Kar pa se tiče finančnega vidika, je konzervans ugodnejši od prejšnjega.

6. Zaključek

Trend naravnega je prisoten vsepovsod, tudi v kozmetični industriji. Da bi bili proizvajalci v koraku s časom, so se odločili slediti temu trendu, zato iščejo nove spojine, ki bodo nadomestile že uveljavljene klasične sintetične spojine. Ali je to pravilna odločitev ali ne, bo pokazal čas, saj trenutno še ne vidimo dolgoročnega učinka naravnih spojin na naše telo in okolje. Ne glede na razplet, moramo imeti vedno v mislih varnost, saj se velikokrat zgodi, da se nove spojine ne testira ustrezno. Dokazali smo, da mešanica levulinske in janeževe kisline ter glicerilkaprilata izkazuje ustrezno protimikrobno zaščito. Krema po koncu testiranja ni spremenila svojih organoleptičnih lastnosti, razen pri inokulu z *A. Brasiliensis*, kjer je struktura postala bolj tekoča. Dokazali smo tudi, da mešanica konzervansa v obdobju 28 dni zavira rast *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Aspergillus Brasiliensis*. Ker smo dokazali učinkovitost mešanice konzervansa, bodo v podjetju Favni klasični konzervansi, Euxyl 100 in Euxyl K9010, v svojih izdelkih nadomestili z mešanico levulinske in janeževe kisline ter glicerilkaprilata.

7. Viri

1. Uredba o kozmetičnih izdelkih. 2009. *Uradni list Evropske unije*, 2, 1223: 342
2. <http://www.food-info.net/uk/e/e200-300.htm> Datum dostopa: 21.3.2014
3. http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives_for_Cosmetics/281/ Datum dostopa: 22.3.2014
4. <http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/UCM358287.pdf> Datum dostopa: 3.6.2014
5. http://www.uk.gov.si/fileadmin/uk.gov.si/pageuploads/pdf/pomen_simbola_knjiga_loncek_in_pescena_ura.pdf Datum dostopa: 5.6.2014
6. A. Salvador, A. Chisvert (2011). *Analysis of cosmetic products*. Elsevier: 212
7. Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih, 2013. *Uradni list Republike Slovenije*, 7, 61: 7310
8. D. C. Steinberg, Preservatives for cosmetics, *Allured Pub Corp*, 2012, 14-172
9. Carpenter C.E., Smith J.V., Broadbent J.R. (2011). Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat science* ; 88: 256-60
10. Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C (2010). New alternatives to cosmetics preservation. *Journal of cosmetic science*; 61: 107-23
11. M. Lisjak (2013), Uporabna dermatologija : Kožne bolezni in tumorji v vsakdanji praksi, *CHIARA*:59
12. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7478> Datum dostopa: 21.6.2014
13. Weingarten R, Huber G.W (2012). Production of levulinic acid from cellulose from hydrothermal decomposition combined with aqueous phase dehydration with a solid acid catalyst. *Energy & environmental science*; 5: 7559-7574
14. http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/703537/LEVULINIC_ACID/ Datum dostopa: 28.8.2014
15. <http://www.favn.si/nega-nog/balzam-za-noge-divji-kostanj> Datum dostopa: 3.3.2014
16. J. Bruneton (1999), Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants, *Intercept limited*: 695
17. Zhang J, Rahman A. A, Jain S. (2012): Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from *Cupressus sempervirens*. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*:2 1–6

18. ISO 11930: Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. 2012: 23
19. <http://www.biomerieux-industry.com/biopharma/bioball-2> Datum dostopa: 5.3.2014
20. http://www.kinetiktech.com/brochures/pdf/straetmans/Straetmans_Product_Catalogue.pdf : stran 28, Datum dostopa: 21.3.2014

8. Priloga

Priloga 1: Prikazuje število kolonij, ki so zrasle na gojiščih skozi časovne točke

Povprečno število kolonij	10 ¹ redčitev	10 ² redčitev	10 ³ redčitev	Ocenjena koncentracija mikroorganizmov (CFU/ml)
Po 7 dneh	36	3,5	1	360
Po 14 dneh	22,5	4,5	2	300
Po 33 dneh	14	1	0	150

Tabela VII: Povprečno število kolonij v izdelku *A. brasiliensis* po 7, 14 in 33 dneh

Povprečno število kolonij	10 ² redčitev	10 ³ redčitev	10 ⁴ redčitev	Ocenjena koncentracija mikroorganizmov (CFU/ml)
Po 7 dneh	0	0	0	< 200
Po 14 dneh	1	2,5	/	400
Po 28 dneh	1	2,5	/	100

Tabela VIII: Rezultati štetja kolonij *C. albicans*

Povprečno število kolonij	10 ² redčitev	10 ³ redčitev	10 ⁴ redčitev	Ocenjena koncentracija mikroorganizmov (CFU/ml)
Po 7 dneh	2	0	0	< 20
Po 14 dneh	28,5	24,5	/	49000
Po 28 dneh	4	5	/	800

Tabela IX: Rezultati štetja kolonij *E. coli*

Povprečno število kolonij	10 ² redčitev	10 ³ redčitev	Ocenjena koncentracija mikroorganizmov (CFU/ml)
Po 7 dneh	1	2,5	100
Po 14 dneh	1	1	200
Po 33 dneh	0	0	< 200


Tabela X: Rezultati štetja kolonij *P. aeruginosa*

Povprečno število kolonij	10 ² redčitev	10 ³ redčitev	Ocenjena koncentracija mikroorganizmov (CFU/ml)
Po 7 dneh	8	8	1600
Po 14 dneh	0	0	< 200
Po 33 dneh	0	0	< 200

Tabela XI: Rezultati štetja kolonij *S. aureus*

Priloga 2: Certifikat analize ekstrakta escina

B-120-S



SABINSA EUROPE GmbH
 • Pharmaceuticals • Phytochemicals
 • Fine Chemicals • Herbal Extracts
 • Cosmeceuticals • Specialty Chemicals

CERTIFICATE OF ANALYSIS

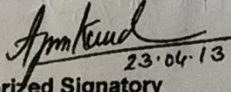
Product Name : **Venocin 20% (Horsechestnut Extract 20%)**
 Lot No. : C121269
 Quantity : 25Kgs
 Date of Manufacture : July 2012
 Date of Expiry : June 2017

Plant/ Part Used : *Aesculus hippocastanum*/Seeds
 Description : Pale brown powder with characteristic odour.
 Identification by TLC : Complies.
 Loss on drying : 0.34 % (Limit: Not more than 5 %)
 Solubility :
 - Water solubles : 97.11 % (Limit: Not less than 50 %)
 - Alcohol solubles : 56.54 % (Limit: Not less than 40 %)
 Residue on Ignition : 0.92 % (Limit: Not more than 20 %)
 Heavy Metals :
 Lead : 10 ppm (Limit: Not more than 20 ppm)
 Arsenic : <0.2 ppm (Limit: Not more than 3 ppm)
 Cadmium : 0.33 ppm (Limit: Not more than 1 ppm)
 Mercury : <0.2 ppm (Limit: Not more than 1 ppm)
 Residual solvents : <0.02 ppm (Limit: Not more than 0.1 ppm)
 : Complies (Limit: To comply as per EU Directive 2009/32/EC)
 Tapped Bulk density : 0.63 g/ml (Limit: Between 0.5 g/ml and 1 g/ml)
 Loose Bulk density : 0.35 g/ml (Limit: Between 0.3 g/ml and 0.7g/ml)
 Sieve Test (Passes through) :
 - 20 Mesh : 100 % (Limit: Not less than 95 %)
 - 40 Mesh : 99.09 % (Limit: Not less than 80 %)
 - 80 Mesh : 88.06 % (Limit: Not less than 40 %)
 Assay by UV :
 - Triterpene glycosides as Escin : 20.83 % (Limit: Not less than 20 % on dried basis)

Microbiological Profiles

Total Microbial Count : 25'0 cfu/g (Limit: Not more than 5000 cfu/g)
 Total Yeast & Mould Count : <10 cfu/g (Limit: Not more than 100 cfu/g)
E.coli : Absent/10g (Limit: To be absent/10g)
Salmonella : Absent/10g (Limit: To be absent/10g)
Staphylococcus aureus : Absent/10g (Limit: To be absent/10g)
Pseudomonas aeruginosa : Absent/10g (Limit: To be absent/10g)
 Enterobacteriaceae : Absent/10g (Limit: To be absent/10g)

*Since it is a herbal product, there is likely to be minor colour variation because of the geographical and seasonal variations of the material

for Sabinsa Europe GmbH

 23.04.13
 Authorized Signatory

Page 1/1

Sabinsa Europe GmbH
 Monzstr. 4
 D-63225 Langen – Germany
 HRB 42553

Tel.: + 49 (6103) 270 11 - 11
 Fax : +49 (6103) 270 11 - 27
 email: sabinsa.europe@sabinsa.com

Ref.: SECA_C121269_0850 Date: 18/02/13