

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA FERKOLJ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA FERKOLJ

TEST IZZIVANJA UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA RAZLIČNIH
SESTAVIN NARAVNEGA IZVORA V DERMALNI FORMULACIJI Z
UPORABO BAKTERIJE ESCHERICHIA COLI

PRESERVATION CHALLENGE TEST OF VARIOUS INGREDIENTS OF
NATURAL ORIGIN IN A TOPICAL FORMULATION USING BACTERIA
ESCHERICHIA COLI

Ljubljana, 2015

Raziskave smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Mentor: doc. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Zahvalila bi se svoji mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač za vso pomoč, prilagodljivost in podporo v času izdelave diplomske naloge. Posebna zahvala ji gre tudi za trud, ki ga je vložila, da se je diploma na koncu odvijala po načrtih.

Prav tako bi se zahvalila izr. prof. dr. Mojci Lunder, ki mi je omogočila laboratorijski del diplome. Vedno je bila na voljo s strokovnim znanjem, nasveti in napotki ter podporo tudi v dnevih, ko se je delo v laboratoriju zavleklo do večera.

Zahvalila bi se svoji družini, fantu in prijateljem, ki so ves čas študija verjeli vame, me podpirali in v težkih trenutkih vedno našli spodbudno besedo.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
KAZALO SLIK	4
KAZALO PREGLEDNIC	4
KAZALO FORMUL	4
KAZALO ENAČB	5
KAZALO PRILOG	5
POVZETEK.....	6
KLJUČNE BESEDE.....	8
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1. UVOD	9
1.1. POMEN MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI IZDELKOV	9
1.2. ZAKONSKE DOLOČITVE KONZERVIRANJA.....	10
1.3. IZZIVNI PREIZKUS IN PREDPISI.....	11
1.4. ZAHTEV ZA KONZERVANS	12
1.5. NEŽELENI UČINKI NAJPOGOSTEJE UPORABLJANIH KONZERVANSOV	13
1.6. NARAVNA KOZMETIKA IN KONZERVIRANJE	14
1.7. MEHANIZEM DELOVANJA TESTIRANIH SPOJIN	17
1.7.1. ORGANSKE KISLINE	17
1.7.2. ALKOHOLI.....	19
1.7.3. PEPTIDI	21
2. NAMEN DELA.....	22
3. MATERIALI IN METODE.....	22
3.1. VLAŽILNA EMULZIJA	22
3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJ TESTIRANIH SPOJIN.....	23
3.3. PRIPRAVA EMULZIJ.....	25
3.4. ORGANIZEM.....	25
3.5. REAGENTI.....	26
3.6. PRIPRAVA INOKULUMA.....	28
3.7. ŠTETJE KOLONIJ	28
3.8. IZZIVNI PREIZKUS	28
3.9. PREIZKUS UČINKOVITOSTI NEVTRALIZATORJA.....	28

3.10. IZVEDBA IZZIVNEGA PREIZKUSA	29
4. REZULTATI	31
5. RAZPRAVA.....	36
6. SKLEP	38
7. VIRI.....	39
8. PRILOGE	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Simbol peščene ure	10
Slika 2: Simbol odprte posodice	10
Slika 3: Prikaz preizkusa nevtralizatorja v miselnem vzorcu	29
Slika 4: Postopek izzivnega preizkusa v miselnem vzorcu	30
Slika 5: Preizkus nevtralizatorja	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Formulacija vlažilne emulzije o/v 100 g.....	22
Preglednica II: Testne sestavine z INCI poimenovanjem in proizvajalec.....	23
Preglednica III: Preizkus učinkovitosti nevtralizatorja	32
Preglednica IV: Kriterij za ocenjevanje uspešnosti izzivnega preizkusa.	33
Preglednica V: Rezultati izzivnega preizkusa	34

KAZALO FORMUL

Formula 1: Strukturna formula glicerilkaprilata	17
Formula 2: Strukturna formula dehidroocetne kisline	18
Formula 3: Strukturna formula benzojske kisline	18
Formula 4: Strukturna formula sorbinske kisline	18
Formula 5: Strukturna formula salicilne kisline	18
Formula 6: Strukturna formula levulinske kisline.....	19
Formula 7: Strukturna formula janeževe kisline	19
Formula 8: Strukturna formula fenoksietanola.....	20

Formula 9: <i>Strukturna formula benzil alkohola</i>	20
Formula 10: <i>Strukturna formula etanola</i>	20
Formula 11: <i>Strukturna formula propilparabena</i>	21
Formula 12: <i>Strukturna formula metilparabena</i>	21

KAZALO ENAČB

Enačba 1: <i>Enačba za izračun logaritemskega zmanjšanja števila bakterij</i>	33
--	----

KAZALO PRILOG

Priloga 1: <i>Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T_7</i>	42
Priloga 2: <i>Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T_{21}</i>	43
Priloga 3: <i>Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T_{28}</i>	44

POVZETEK

S trendom ekološke ozaveščenosti in s tem uporabe izdelkov naravne kozmetike se odkrivajo nova vodila kozmetičnega trga. Do sedaj so na kozmetičnem področju mikrobiološke neoporečnosti uporabljali preizkušene sintezne konzervanse, s trendom naravne kozmetike in ekološkega osveščanja kupcev pa njihova priljubljenost upada. Ta trend vodi k uporabi naravnih konzervansov, ki zlasti med uporabniki veljajo za zdravju manj škodljive v primerjavi s sintezni. V diplomski nalogi smo želeli raziskati, kako učinkovite so izbrane snovi naravnega izvora v vlogi konzervansov vlažilne emulzije. Vse sestavine emulzije razen fenoksietanola lahko po vseevropskem standardu naravne kozmetike NATRUE označujemo kot naravne spojine in jih lahko uporabljamo v naravni kozmetiki. Vendar imajo naravne protimikrobne sestavine v primerjavi s sintezni tudi vrsto slabosti. Najbolj izpostavljena slabost je možnost draženja kože, z vidika snovanja kozmetičnega izdelka pa zagotovo organoleptične lastnosti, interakcije z drugimi sestavinami in slabša obstojnost. V sklopu diplomske naloge smo pripravili vlažilne emulzije tipa olje v vodi, v katere smo vgradili naslednje testne snovi: Cosgard, Dermosoft GMCY, Grenifit, Leucidal Liquid Sf, dehidroocetna kislina, salicilna kislina, sorbinska kislina, benzojska kislina, Dermosoft® 688, levulinska kislina, etanol in fenoksietanol. Vsako spojino smo testirali v dveh koncentracijah in sicer v najnižji učinkoviti koncentraciji, kot priporoča proizvajalec, ter v koncentraciji, ki je polovica največje priporočene. Z izzivnim preizkusom učinkovitosti konzerviranja smo ovrednotili, v kakšni meri testne spojine zaščitijo izdelano emulzijo ob masovni kontaminaciji z bakterijo *Escherichia coli*. Preizkus smo izvedli po smernicah Mednarodne organizacije za standardiziranje (ISO) 11930, ki velja za mikrobiološko vrednotenje kozmetičnih izdelkov in ga priznava Evropska farmakopeja. Po kriterijih ISO 11930 je formulacija protibakterijsko ustrezno zaščitena, ko je zmanjšanje števila bakterij za 3 logaritemske enote. Tem zahtevam je ustrezala večina testnih spojin. Preizkusa niso opravile Dermosoft® 688 do koncentracije 0,15 %, fenoksietanol do koncentracije 0,5 % in mešanica konzervansov Cosgard do koncentracije 0,2 %. Vse ostale testne koncentracije

spojine so preizkus uspešno opravile. S tem smo dokazali učinkovitost protibakterijskega delovanja. Za ugotovitev, ali so spojine primerne za vlogo konzervansa, pa je potrebno opraviti nadaljnje preizkuse z mikroorganizmi, ki jih določa standard ISO 11930.

KLJUČNE BESEDE

Izzivni preizkus, ISO 11930, naravni konzervansi, *Escherichia coli*

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC – Ameriška zbirka tipskih mikrobnih kultur (ang. 'American Type Culture Collection')

Cfu – enote, ki tvorijo kolonijo (ang. 'Colony-forming units')

COSMOS – mednarodna neprofitna organizacija za ekološko in naravno kozmetiko (ang. 'Cosmetics organic and natural standard')

EC 1223/2009 – kozmetična direktiva EC 1223/2009 76/768/EEC

INCI – Mednarodno poimenovanje spojin kozmetičnih proizvodov (ang. 'The International Nomenclature of Cosmetic Ingredients')

ISO – Mednarodna organizacija za standardiziranje (ang. 'International Organization for Standardization')

LAF – laminarni pretok zraka (ang. 'laminar air flow')

MIC – najmanjša mikrobo zavirajoča koncentracija (ang. 'minimal inhibitory concentration')

MQM – upravljanje mikrobiološke kakovosti (ang. 'microbiological quality managemnet')

NATRUE – mednarodno združenje za naravno in organsko kozmetiko (ang. 'the International Natural and Organic Cosmetics Association')

Ph.Eur. – Evropska farmakopeja (ang. 'European Pharmacopoeia')

T₇ – sedmi dan izzivnega preizkusa

T₂₁ – enaindvajseti dan izzivnega preizkusa

T₂₈ – osemindvajseti dan izzivnega preizkusa

TSA-D – triptični soja agar (ang. 'Trypcase Soy Agar')

1. UVOD

1.1. POMEN MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI IZDELKOV

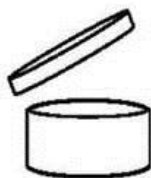
Kozmetični izdelki so lahko zelo dobro gojišče za razvoj mikroorganizmov, saj navadno v svoji sestavi vsebujejo vodo, ki je najpomembnejši dejavnik za razrast mikroorganizmov (1). Ostali dejavniki kot npr. prisotnost mineralov, vitaminov, olj, vodotopnih polimerov, kisika, pH blizu fiziološkega in sobna temperatura prav tako tvorijo ugodno življenjsko okolje (2). Koža je prva in glavna zaščita telesa pred zunanjim okoljem. Svojo zaščitno vlogo opravlja z mehansko prepreko, z nekoliko kisló floro, kjer prebivajo simbiotski mikroorganizmi in s svojo posebno strukturo. S kozmetičnimi izdelki ohranjamo in izboljšujemo stanje kože, zato je pomembno, da mikroflore kože ne uničujemo. Ker kozmetične sestavine ne smejo prehajati skozi kožo in so namenjene negi zunanje plasti kože, je določeno število nepatogenih mikroorganizmov v izdelku dovoljeno. Koncentracije so zakonsko določene in za večji del negovalnih izdelkov, torej tistih, ki niso namenjeni otrokom ali uporabi okoli oči (kategorija 2), je mejna koncentracija aerobnih mezofilnih bakterij 5×10^2 cfu/ml, zagotoviti pa moramo odsotnost predpisanih patogenih ali oportunistično patogenih bakterij v 0,1 g izdelka (1). Posledice prevelike razrasti mikroorganizmov v izdelku, še posebno v začetni fazi, niso vedno vidne. Kljub temu lahko njihovi toksini in drugi metaboliti škodujejo zdravju uporabnika, pri kontaminaciji izdelka s patogenimi bakterijami so možne resne okužbe. Kozmetični izdelek, v katerem so se prekomerno razrasli mikroorganizmi, je pokvarjen in povsem neuporaben. Poleg škodljivosti za uporabnika se mu lahko spremenijo tudi barva, vonj, okus, viskoznost, pokvari se struktura ipd. S časoma lahko vidimo celo vidne kolonije bakterij in plesni. Zato je zelo pomembno, da zagotovimo učinkovito protimikrobno zaščito kozmetičnega izdelka, ki bo uporabnika varovala ves čas njegove uporabe (2).

1.2. ZAKONSKE DOLOČITVE KONZERVIRANJA

Protimikrobno zaščito kozmetičnih izdelkov največkrat dosežemo z dodatkom enega ali več konzervansov od skupno 57 dovoljenih, ki so navedeni v prilogi VI kozmetične direktive 76/768/EEC. V prilogi najdemo vse omejitve in zahteve pri uporabi konzervansov ter mnenja evropskega Znanstvenega odbora za varstvo potrošnikov, na katerih temeljijo tudi odobritve novih konzervansov. V EU za vsak kozmetični izdelek zahtevamo poročilo o varnosti, kjer morajo biti mikrobiološke specifikacije tako za surovine kot tudi končne izdelke, sem spada tudi izzivni preizkus. Poleg mikrobioloških raziskav proizvajalec izvede tudi fizikalno-kemijske raziskave stabilnosti na končnem kozmetičnem izdelku, na podlagi katerih določi minimalni rok trajanja kozmetičnega izdelka. Zakonodaja loči izdelke na tiste, ki so uporabni 30 mesecev ali manj in tiste, ki so uporabni več kot 30 mesecev. Proizvajalec mora to ustrezno označiti s simbolom ali z napisom, kot prikazujeta sliki 1 in 2. Za varnost potrošnikov morajo biti informacije o izdelku navedene jasno in na ovojnini izdelka (3).



Slika 1: Simbol peščene ure označuje minimalni rok trajanja za izdelke, ki so stabilni manj kot 30 mesecev. Lahko je naveden tudi napis »Uporabno najmanj do konca«, poleg obeh označb pa mora biti datum.



Slika 2: Simbol odprte posodice označuje čas uporabnosti po odprtju in sicer za izdelke, ki so stabilni več kot 30 mesecev. Ob simbolu je navedeno časovno obdobje v mesecih in/ali letih.

Za zagotovitev ustrezne protimikrobne zaščite je potreben tudi nadzor med proizvodnjo izdelkov, imenovan MQM (upravljanje mikrobiološke kakovosti). Začne se že s kakovostjo vhodnih surovin, načrtovanjem higienskega pakiranja, vzdrževanjem higiene med proizvodnjo in uporabo učinkovitega sistema konzerviranja. Z uredbo o kozmetičnih izdelkih (EC 1223/2009), ki je stopila v veljavo leta 2013, so se pojavila strožja pravila za zagotavljanje protimikrobne stabilnosti. V primeru, ko je formulacija nagnjena h kontaminaciji, moramo v sklopu poročila o varnosti izdelka izvesti izzivni preizkus, s katerim dokažemo mikrobiološko stabilnost kozmetičnega izdelka (1).

1.3. IZZIVNI PREIZKUS IN PREDPISI

Napotkov za izvedbo izzivnega preizkusa v sami uredbi ni. Za kozmetične izdelke obstaja več različic preizkusa, na primer preizkus ISO 11930, izzivni preizkus protimikrobne zaščite Zveze držav Jugovzhodne Azije, izzivni preizkus »schülke KoKo test«, nahajajo pa se tudi v smernicah Znanstvenega odbora za varstvo potrošnikov in Združenja proizvajalcev kozmetičnih izdelkov, izdelkov za osebno nego in dišav (ang. *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*), v Farmakopeji Združenih držav in Evropski farmakopeji (Ph. Eur.). Slednji sta strožji in namenjeni predvsem farmacevtskim izdelkom. Zahteve za izvedbo izzivnega preizkusa in interpretacija rezultatov se od organizacije do organizacije razlikujejo. Za evropski trg farmacevtskih izdelkov postavlja merila Ph. Eur., v kateri je za kozmetične izdelke priporočen standard ISO 11930. Namenjen je oceni protimikrobne zaščite kozmetičnih izdelkov (ang. *Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*), ki jo definira kot »zmožnost izdelka, da uspešno prenese kontaminacijo, ki bi lahko predstavljala nevarnost za uporabnika (4).« Standard ISO vsebuje postopek za izvedbo preizkusa in interpretacijo rezultatov, medtem ko Ph. Eur. poleg metode vključuje še zahteve in priporočila za ohranitev formulacije, zaščitno pakiranje in napotke za izdelavo z dobro proizvodnjo prakso.

Pri izzivnem preizkusu formulacijo obremenimo s predpisano količino predpisanega testnega mikroorganizma in ob določenih časovnih intervalih vrednotimo učinkovitost

protimikrobne zaščite. Če dobljeni rezultati izpolnjujejo predpisane kriterije, je izdelek z mikrobiološkega stališča varen za uporabo. Mikroorganizmi, ki jih določa Ph. Eur., so *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* in *Aspergillus brasiliensis*, izdelek pa vrednotimo v prvotnem vsebniku ves čas njegove uporabe in v normalnih razmerah shranjevanja. Pri peroralnih pripravkih ISO k testnim mikroorganizmom dodaja še bakterijo *Escherichia coli*, ki smo jo v diplomi uporabili tudi mi. Za razliko od predpisa Ph. Eur. vrednotimo 20 g vzorca končne formulacije (5). Protimikrobna zaščita je odvisna od mnogih dejavnikov. Iz tega razloga protimikrobno zaščito novega izdelka preverjamo z izzivnim preizkusom šele v končni obliki formulacije. Lahko pa izzivni preizkus dodatno uporabljamo med razvojem in izdelavo izdelka, vendar ne sme biti nadomestilo za dobro proizvodnjo prakso ali del standardne kontrole (6).

1.4. ZAHTEVE ZA KONZERVANS

Glavni dejavnik mikrobiološke pokvarljivosti je prosta oz. aktivna oblika vode, ki ni vezana na sestavine in je na voljo za rast mikroorganizmov. Količin le-te pa ni mogoče zanesljivo določiti le teoretično, zato ne moremo jamčiti za mikrobiološko neoporečnost brez preizkusa (3). Bakterije pri fiziološkem pH dobro uspevajo, z znižanjem na koži primeren pH 5,5 pa za določen spekter mikroorganizmov postanejo razmere prekisle. Kisel pH tako zmanjša kontaminacijo, obenem pa lahko močno vpliva na delovanje konzervansov (7). Kozmetični izdelki vsebujejo mnogo sestavin, tako se lahko pojavijo interakcije s sestavinami formulacije ali z ovojnino, ki imajo na delovanje konzervansa bodisi singeristični bodisi antagonistični učinek. Od konzervansa se torej pričakuje, da je varen za uporabnika, stabilne strukture in kompatibilen z ostalimi sestavinami, da deluje ves čas uporabe izdelka v majhnih koncentracijah in na širok spekter mikroorganizmov, ne vpliva na organoleptične lastnosti izdelka, topen pa naj bi bil v olju in v vodi, poceni in enostaven za vgrajevanje. Do danes takega konzervansa še ne poznamo (3). Po mnenju avtorice Nancy Jeffries tak konzervans niti ne obstaja, zato z razvojem iščemo sisteme, ki vsebujejo nove kombinacije dovoljenih konzervansov in spojin. Eden od vzrokov za uporabo že obstoječih konzervansov je dejstvo, da uradno priznanje nove spojine kot

konzervansa zahteva veliko dragih raziskav, ki si jih marsikatero podjetje ne more privoščiti (8). Zato se zatekamo h kombiniranju dveh ali več spojin hkrati. Tak način ima tudi več prednosti. Koncentracije posameznih konzervansov lahko zmanjšamo, s tem se zmanjšajo možnosti za nastanek preobčutljivostnih reakcij in reakcij z ostalimi komponentami formulacije (9). Med njimi lahko pride do aditivnega ali sinergističnega učinka, ki izboljša učinkovitost pri manjših koncentracijah. Na ta način se lahko zelo približamo idealnemu sistemu za konzerviranje (8). Aditivni učinek nastane, ko deluje na bakterije hkrati več spojin z različnimi mehanizmi delovanja. Druga prednost kombiniranja je manjša možnost razvoja bakterijske tolerance na konzervans, obenem pa lahko zajamemo večji spekter mikroorganizmov (9). Tak primer je komercialno dostopna zmes benzilalkohola in dehidroocetne kisline, ki smo ju ločeno in kot zmes uporabili tudi v naši raziskavi. Prvi deluje proti po Gramu pozitivnim bakterijam, drugi pa je učinkovit fungicid, ki nekoliko slabše deluje proti kvasovkam (3). Kot smo že omenili v prejšnjem odstavku, je lahko prednost sinergizem dveh konzervansov. Primer takega sistema so parabeni. Metilparaben je sam manj učinkovit od kombinacije s propilparabenom ali fenoksietanolom pri enaki skupni koncentraciji, prav tako je večja učinkovitost parabenov ob prisotnosti sotpila propilen glikola (10). To je verjetno na račun boljše topnosti parabena v vodi ob prisotnosti sotpila. Po podatkih D. C. Steinberga sam propilen glikol tudi izkazuje protimikrobne lastnosti, saj zmanjša koncentracijo aktivne vode v formulaciji (3). K protimikrobni zaščiti izdelka lahko veliko pripomore vsebnik kozmetičnega izdelka. Za največjo protimikrobno zaščito mora biti zasnovan tako, da vsebina ob uporabi ne pride v stik s kožo in z zrakom, kar prepreči kontaminacijo (11).

1.5. NEŽELENI UČINKI NAJPOGOSTEJE UPORABLJANIH KONZERVANSOV

Parabeni, donorji formaldehida ter metilkloroizotiazolinon so zelo pogosto uporabljeni konzervansi v kozmetični industriji. Delujejo na vse skupine patogenih mikroorganizmov, so kemijsko stabilni in delujejo v širokem območju pH. So tudi učinkovitejši od npr. fenoksietanola, benzojske in sorbinske kisline, ki so tudi kvalificirani kot konzervansi in

katere smo prav tako testirali v izzivnem preizkusu. Razvoj alergijskega kontaktnega dermatitisa je predvsem odvisen od koncentracije snovi, prav tako je koncentracijsko pogojena toksičnost. Med testiranimi spojinami je na listi alergenov spojina benzil alkohol. Parabeni na zdravi koži ne povzročajo draženja. V zelo redkih primerih so vzrok alergijskega dermatitisa (12). Kljub temu sta oba, metilparaben in propilparaben, alergena. Povečujeta namreč izločanje histamina, kar povečuje celično posredovano imunost (13). Zaskrbljenost okoli varnosti teh sinteznih konzervansov vodi proizvajalce v iskanje novih rešitev. Ekološka zavest vodi v smer naravnih nadomestkov, ki se smatrajo za zdravju neškodljive oziroma manj škodljive od sinteznih konzervansov.

1.6. NARAVNA KOZMETIKA IN KONZERVIRANJE

Neželeni učinki sinteznih konzervansov, odpornost bakterij in ekološka ozaveščenost vodita k uporabi okolju prijazne in naravne kozmetike. Na podlagi alternativne oblike konzerviranja so nastale priljubljene marketinške trditve »brez konzervansov«, na trg pa so prišle zmesi naravnih spojin, ki jih lahko uporabimo namesto klasičnih konzervansov. Vendar uporaba takih zmesi še ne pomeni, da so varne ali okolju prijazne (3). V izzivnem preizkusu smo testirali 2 zmesi, in sicer Geogard 221 in Leucidal.

Sestava sinteznih konzervansov je znana in zato jo lažje nadzorujemo, medtem ko pri naravnih izvlečkih največkrat ne moremo določiti vseh komponent in načina delovanja. To otežuje načrtovanje spojin in nadzor nad končnimi učinki v izdelku, vendar pa ravno te kombinacije omogočajo edinstvene lastnosti izvlečkov, ki so v medicini in kozmetiki tako cenjene. Kakovost naravnih sestavin ni zakonsko določena v uredbah, ampak je zagotovljena s certifikati, ki postavljajo kriterije kakovosti za naravno in ekološko kozmetiko. Ena od takih organizacij je NATRUE, na evropski ravni pa deluje tudi COSMOS (14).

Protimikrobno zaščito lahko dosežemo tudi brez dodatkov sinteznih konzervansov. Izdelki so lahko do določene stopnje samokonzervirajoči, vendar morajo biti hkrati varni za

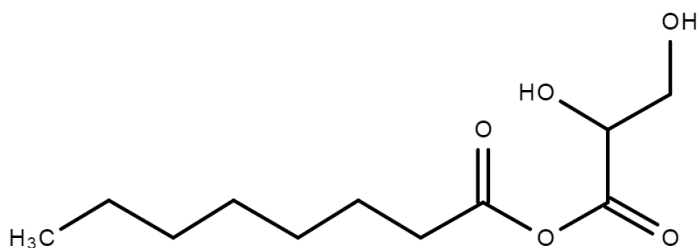
uporabnika. Primeri tako imenovanega samokonzerviranja so uporaba velikih deležev sladkorja ali glicerola, etanola, soli, medu, dehidracije idr. S to metodo se izognemo toksičnosti in preobčutljivostnim reakcijam konzervansov, vendar večje koncentracije omenjenih spojin nemalokrat povzročijo draženje kože. Velja, da 20-odstotna vsebnost etanola predstavlja zadostno protimikrobno zaščito izdelka (15), vendar lahko povzroči draženje in izsuševanje kože. Poznamo še nekaj drugih netradicionalnih načinov konzerviranja, in sicer uporabo encimskih sistemov, znižanje aktivne vode s higroskopskimi snovmi (3), v zadnjem času so naredili tudi raziskave o učinkovitosti naravnih izvlečkov v vlogi protimikrobne zaščite. Čeprav izvlečki niso registrirani kot konzervansi v prilogi V kozmetične direktive 76/768/EEC, poročajo o njihovi učinkoviti protimikrobni zaščiti izdelkov (16). V to skupino alternativnih konzervansov spadajo eterična olja, dišave in drugi izolirani rastlinski izvlečki, katerih prvotni namen je varovanje rastline pred napadi škodljivcev.

Moramo se zavedati, da imajo nekatere sestavine naravne kozmetike v primerjavi s sinteznimi tudi pomembne slabosti. So manj stabilne, določena količina mikroorganizmov je prisotna že v surovinah in veliko bolj so dovzetne za razkroj, kar nam pove že beseda »biorazgradljivo«. Stroški izolacije so velikokrat dragi, zato nekatere spojine, ki se nahajajo v naravi, kljub temu pripravljamo s sintezo (3). Navadno so naravne dišave v kozmetiki le v zelo majhnih koncentracijah. Tudi če sicer izkazujejo protimikrobno učinkovitost, jih je premalo, da bi dosegli protimikrobni učinek. Lahko pa izkazujejo sinergističen učinek v kombinaciji s sinteznimi konzervansi, npr. parabeni (16). Poleg tega je veliko naravnih spojin na listi alergenov. Za konzerviranje izdelkov niso najbolj primerni, ker velikokrat vsebujejo nenasičene spojine, ki zlahka oksidirajo. Pri tem se spremeni njihova sestava, sprožijo pa lahko spremembo ostalih sestavin v izdelku (15). V kozmetiki pa jih po drugi strani cenimo zaradi vrste ugodnih negovalnih in dišavnih lastnosti. Navadno so prijetnega vonja, ki pa je lahko pri koncentraciji, ki je potrebna za protimikrobno zaščito izdelka, precej močnejši in v izdelku moti (7). V naši raziskavi smo v vlogi konzervansa preizkusili dve dišavi, janeževo in levulinsko kislino (17). Janeževa

kislina (4-metoksibenzojska kislina) je v kozmetični direktivi 76/768/EEC dovoljena za uporabo pri prikrivanju neprijetnega vonja ali okusa izdelkov. Mi smo testirali patentirani konzervans pod imenom Dermosoft® 688, ki temelji na janeževi kislini (18). Levulinska kislina (4-oksopentanojska kislina) se uporablja v vlogi dišave in sestavine za vzpostavljanje in vzdrževanje fiziološke funkcije kože. Naslednji naravni izvleček, ki smo ga ovrednotili z izzivnim preizkusom, je izvleček semen grenivke (*Citrus × paradisi Macfad.*) v obliki kapljic; pomožni snovi sta prečiščena voda in glicerol. Primeren je za čiščenje in nego telesa. Na strani proizvajalca najdemo, da so delujoče snovi polifenoli v obliki kvarternih amonijevih spojin in bioflavonoidi, ki naj bi ščitili telo pred škodljivimi vplivi mikroorganizmov (19). Formulacija z glicerolom in vodo potrjeno izkazuje antioksidativne lastnosti in v večji meri kot formulacija z glicerolom in etanolom (20). Podobno raziskavo so izvedli leta 2002 na izdelku z izvlečkom semen grenivke, izvlečkom ploda in glicerola, kjer so bile aktivne učinkovine fenoli prav tako v obliki kvarternih amonijevih soli. Rezultati so pokazali zelo dobro protibakterijsko delovanje tako na po Gramu pozitivnih kot negativnih bakterij (21). Vseeno pa D. C. Steinberg v svojem delu ne priznava protimikrobnega delovanja samega izvlečka semen grenivke. Opira se na dejstvo, da se produkti z izvlečki semen grenivke, uporabljeni v raziskavah, navadno izkažejo za raztopine drugih protimikrobnih snovi (3).

Z izzivnim preizkusom smo preverili tudi monoester glicerola in oktanojske (kaprilne) kisline, glicerilkaprilat, ki je po direktivi klasificiran kot vlažilo in emulgator in izvira iz rastlinskih trigliceridov. Proizvajalec zagotavlja, da glicerilkaprilat v njegovem patentiranem izdelku izkazuje vlažilne in negovalne lastnosti, prikriva neprijeten vonj izdelkov in je protibakterijsko učinkovit (22). Izzivni preizkus po merilih Evropske farmakopeje, ki so ga izvedli z 1-odstotnim glicerilkaprilatom, je zaviral delovanje le ene vrste bakterij, zato preizkusa ni opravil (23). Podatki, ki so jih uporabili v drugi raziskavi leta 2010, pa zagotavljajo, da zelo učinkovito zavira razrast bakterij in kvasovk, manj pa plesni. Zaradi oblike in delovanja kot površinsko aktivna snov lahko poruši strukturo celične membrane in na ta način uniči mikroorganizem (17). Čeprav glicerilkaprilat velja

za varno in neagresivno spojino, ki ne draži kože, so poročali o primeru kontaktnega dermatitisa (24).



Formula 1: *Strukturna formula glicerilkaprilata*

1.7. MEHANIZEM DELOVANJA TESTIRANIH SPOJIN

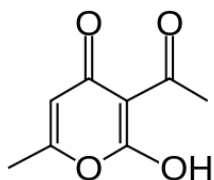
Mehanizmi delovanja konzervansov so različni, največkrat gre za denaturacijo celičnih proteinov ali vpliv na celično membrano. Delimo jih na alkohole, derivate gvanidina, organske živosrebrove spojine, kvarterne amonijeve spojine, aromatske spojine, kisline in njihove soli, tvorilce formaldehida in druge. (25).

1.7.1. ORGANSKE KISLINE

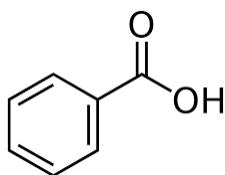
Pri izzivnem preizkusu smo največ spojin izbrali iz skupine organskih kislin, ki se nahajajo v rastlinah. Poleg dehidroocetne kisline pogosto uporabljamo še sorbinsko, benzojsko in salicilno kislino. Organske kisline, ki smo jih uporabili v izzivnem preizkusu, imajo poleg vloge konzervansa še druge funkcije. Benzojsko kislino uporabljamo kot stabilizator pH, sestavino za povečanje prostornine in prikrivanje vonja. Salicilna kislina je keratolitik, uporabljamo jo za odstranjevanje otiščancev, bradavic, pri aknah, prhljaju, seboroičnem dermatitisu in psoriazi. Sorbinsko, benzojsko in salicilno kislino uporabljamo tudi v živilski industriji.

V splošnem imajo kisline kot konzervansi precej omejitev. Delujejo učinkoviteje proti glivam kakor bakterijam, so slabo topne v vodi, pogoj delovanja organskih kislin pa je

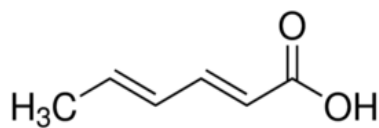
protonirana oblika kisline, ki je pri pH nižjem od pKa kisline. Nad to mejo se tvorijo soli kislin, ki pa navadno nimajo protimikrobnih lastnosti, so pa veliko bolj topne v vodi. Učinkovitost v takih primerih dosežemo z dodatkom drugih konzervansov. Pri pH okoli 5, kakršen je v naših emulzijah, je največji delež protonirane oblike pri dehidroocetni kislini, pri sorbinski in benzojski kislini je v aktivni obliki manj kot 40 % molekul, pri salicilni pa le še 1 % (3). Levulinsko in janeževo kislino najdemo v vrtnem janežu (*Pimpinella anisum* L.) (17) in nista navedeni med dovoljenimi konzervansi v prilogi V kozmetične direktive 76/768/EEC.



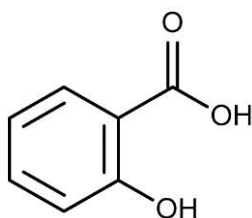
Formula 2: *Strukturna formula dehidroocetne kisline*



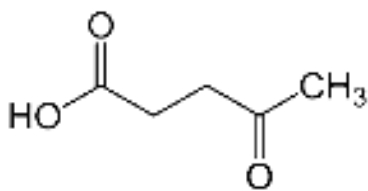
Formula 3: *Strukturna formula benzojske kisline*



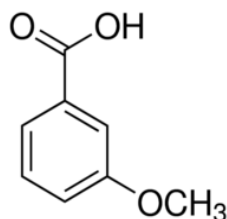
Formula 4: *Strukturna formula sorbinske kisline*



Formula 5: *Strukturna formula salicilne kisline*



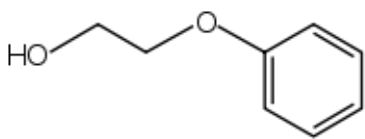
Formula 6: *Strukturna formula levulinske kisline*



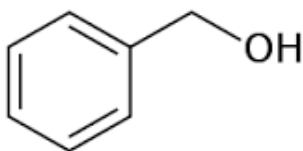
Formula 7: *Strukturna formula janeževe kisline*

1.7.2. ALKOHOLI

Tarčni mikroorganizem alkoholov so bakterije. So stabilnejši pri različnih pH v primerjavi s kislinskimi konzervansi, v glavnem pa delujejo protimikrobno zaradi hidroksilne skupine. Predstavniki konzervansov iz skupine alkoholov so parabeni, benzilalkohol, etilalkohol, najpogosteje uporabljan pa je fenoksietanol, katerega učinkovitost smo tudi preverili z izzivnim preizkusom. Hidroksilne skupine so polarne, zato so dobro topne v vodi in delujejo v širokem pH območju. Fenoksietanol je po direktivi določen kot konzervans in dovoljen v koncentraciji do 1 %. Po kemijski strukturi je monoeter etilenglikola in fenola. Učinek se z nižanjem koncentracije ne zmanjšuje premo sorazmerno s koncentracijo, ampak eksponentno. Zato ima manjši odmerek veliko manjšo učinkovitost (15). Poleg konzerviranja ima vlogo topila, zaradi specifičnega cvetnega vonja pa tudi kot dišava (26). Čeprav je pri samostojni uporabi tako kot organske kisline manj učinkovit, izkazuje velik sinergističen učinek v kombinaciji s sinteznimi konzervansi, npr. diazolidinil ureo, metilkloroizotiazolinon. Našteti sintezni konzervansi v večjih koncentracijah povzročajo preobčutljivostne reakcije. Pri kombinaciji s fenoksietanolom, ki ne izkazuje podobnih neželenih učinkov, pa lahko za učinkovito zaščito koncentracijo sinteznih konzervansov znižamo pod najmanjšo mikrobo zavirajočo koncentracijo (MIC) (27).

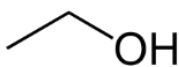


Formula 8: *Strukturna formula fenoksietanola*



Formula 9: *Strukturna formula benzil alkohola*

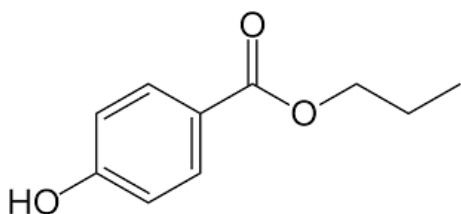
Etanol je najpogosteje uporabljan alkohol v farmacevtskih izdelkih in kozmetiki. Uporabljamo ga kot topilo, saj se meša z vodo in s številnimi organskimi spojinami, deluje pa tudi kot dezinficiens. Po organoleptičnih lastnostih je bistra, brezbarvna in vnetljiva tekočina.



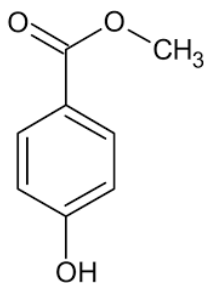
Formula 10: *Strukturna formula etanola*

Parabeni, estri parahidroksi benzojske kisline, so od leta 1977 pa do danes najpogosteje uporabljeni konzervansi v kozmetiki, saj so kar v 35 % vseh kozmetičnih izdelkov. Uporabljamo jih tudi v prehranski industriji (12). So sintezni širokospektralni konzervansi, z delovanjem v območju pH od 4 do 8. Z daljšo alkilno verigo se povečuje učinkovitost in hkrati zmanjšuje topnost v vodi, zato moramo za protimikrobno učinkovitost doseči ravnotežje. Delujejo zlasti na plesni in kvasovke, pri katerih povzročijo prepustnost celičnih membran in motijo transport snovi (7). Primarna vloga je konzerviranje, propilparaben uporabljamo tudi kot dišavo (28). Parabeni za uporabo v industriji so navadno sinteznega izvora, vendar jih najdemo tudi v naravi, kjer ima vlogo protimikrobne zaščite. Metilparaben so našli v borovnicah (9), robidah, malinah in v hrošču *Dysticus marginalis* (29). Dovoljena koncentracija posameznega parabena je 0,4 %. Če pa

uporabljamo zmes parabenov, ki je tudi bistveno bolj učinkovita, je največja koncentracija 0,8 % (3). V emulzijah smo kot pozitivno kontrolo uporabili uveljavljeno zmes metil- in propilparabena v 0,1-odstotni koncentraciji in razmerju 7 : 3 (30). Metil- in propilparaben sta brez vonja, nahajata se v obliki prahu in belih kristalčkov.



Formula 11: *Strukturna formula propilparabena*



Formula 12: *Strukturna formula metilparabena*

1.7.3. PEPTIDI

Peptid je krajši polimer aminokislin, vezanih s peptidno vezjo in je sestavni del proteinov. Večina naravnih procesov v telesu poteče preko interakcij biološko aktivnih peptidov z ostalimi molekulami v telesu. Bioaktivni protimikrobni peptidi spadajo med najpomembnejše elemente prirojenega imunskega sistema vseh živih organizmov (31). Številne protimikrobne peptide so izolirali iz žuželk, dvoživk, sesalcev, rastlin in bakterij. Prednost pred protimikrobno zaščito izdelkov s klasičnimi sintezni konzervansi je v manjših stranskih učinkih, hitreje uničijo bakterije in ne pride do nastanka odpornosti bakterij (32). V vlogi konzervansa smo testirali protimikrobni peptid mlečnokislinske bakterije *Leuconostoc kimchii*, ki jo v Koreji uporabljajo za fermentacijo zelja. Pri fermentaciji bakterija ustvari kislo okolje ter izloča protimikrobni peptid, s katerim se bori

proti ostalim mikroorganizmom. Predhodno opravljen izzivni preizkus je pokazal, da protimikrobni peptid v MIC uspešno zavira rast tako bakterij kot plesni. Poročajo tudi, da poleg protimikrobnega delovanja izkazuje tudi negovalne in vlažilne lastnosti že v 1-odstotnem deležu (33).

2. NAMEN DELA

Ljudje smo vedno bolj ekološko zavedni in želimo razbremeniti okolje z uporabo okolju prijaznih sestavin in postopkov. Pri negi telesa se zato vedno bolj uveljavlja naravna kozmetika, ki mora biti varna in učinkovita. Do zdaj so v kozmetiki najbolj raziskani in tudi najpogostejše uporabljeni sintezni konzervansi, zato je povpraševanje po alternativnih naravnih konzervansih veliko. V diplomski smo se odločili preveriti protibakterijsko delovanje 11 izbranih sestavin naravnega izvora, ki izkazujejo protimikrobne lastnosti in so razen fenoksietanola po standardu NATRUE primerne za uporabo v naravni kozmetiki. Izzivni preizkus smo izvedli v skladu z mednarodno priznanim standardom ISO 11930. Želeli smo ugotoviti, ali izbrane sestavine v formulaciji vlažilne emulzije ustrezajo evropskemu standardu protibakterijske zaščite proti testnemu sevju bakterije *Escherichia coli*. V 28 dneh, kolikor traja izzivni preizkus, smo opazovali tudi spremembe organoleptičnih lastnosti izdelkov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VLAŽILNA EMULZIJA

Vlažilne emulzije smo pripravili 7 dni pred izvedbo izzivnega preizkusa. Da smo ustavili bakterijsko rast in možnost kontaminacije vzorcev, smo jih do preizkusa hranili neprodušno zaprte v sterilnih vsebnikih pri 5 °C.

Preglednica I: *Formulacija vlažilne emulzije o/v 100 g.*

Oljna faza	
Karitejevo maslo	2 %
Mandljevo olje	11 %
Cetearil alkohol	0,5 %
Vodna faza	
Cetearilglukozid	0,8 %
Glicerol	5 %
Ksantan	0,6 %
Voda	80,1 %
Konzervans*	
Mlečna kislina, 80-odstotna vodna raztopina	q.s.
Natrijev hidrogenkarbonat, 8-odstotna vodna raztopina	q.s.
Skupaj	100 %

* testirana spojina

3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJ TESTIRANIH SPOJIN

Za večino testnih spojin smo koncentracije določili iz priporočil uvoznikov, proizvajalcev ali uradnih dokumentov. Želeli smo testirati koncentracije na spodnji meji, ki se v kozmetiki še uporabljajo v protimikrobne namene, in pri koncentraciji, ki je polovična od največje priporočene oziroma dovoljene.

Preglednica II: Testne sestavine z INCI poimenovanjem in proizvajalec

Konzervans/konzervirni sistem in poimenovanje INCI	Proizvajalec	Min.* (%)	Sr.* (%)	Max. (%)
• DEHIDROOCETNA KISLINA	Sigma-Aldrich	0,15	0,3	0,6
• JANEŽEVA KISLINA <i>p-janeževa kislina</i>	Chemie	0,05	0,15	0,3

ETANOL, 70 % <i>etanol, prečiščena voda</i>		14,0	17,0	x
FENOKSIETANOL <i>2-fenoksietanol</i>		0,25	0,5	1,0
LEVULINSKA KISLINA <i>4-oksopentanojska kislina</i>		0,2	0,25	x
BENZOJSKA KISLINA <i>benzojska kislina</i>	Caesar&Loretz	0,13	0,25	0,5
SORBINSKA KISLINA <i>heksa-2,4-dienojska kislina</i>		0,15	0,3	0,6
PROPILPARABEN <i>propil parahidroksi benzoat</i>		0,03		0,8
METILPARABEN <i>metil parahidroksi benzoat</i>	Fagron B.V.	0,07		
SALICILNA KISLINA <i>2-hidrobenzojska kislina</i>	Kemika	0,13	0,25	0,5
LEUCIDAL LIQUID SF <i>peptid mlečnokislinskih bakterij</i>	Alexmo cosmetics	1,0	1,15	2,0
COSGARD <i>dehidroocetna kislina in benzil alkohol</i>	MANSKE	0,2	0,4	0,8
DERMOSOFT GMCY (GLICERILKAPRILAT) <i>oktanojska kislina</i>	aliacura	0,3	0,5	1,0
GRENIFIT <i>izvleček semen grenivke, glicerol, prečiščena voda</i>	Lekarne Maribor	0,1	0,5	x

* izbrani koncentraciji, ki smo ju testirali v izzivnem preizkusu. Max.: najvišja koncentracija, ki je po evropski direktivi dovoljena v kozmetičnih izdelkih, ki jih speremo s kože. x: ni podatka

3.3. PRIPRAVA EMULZIJ

Za vsako testno spojino smo pripravili 100 g emulzije. Glede na količino testne spojine smo prilagajali količino vode do skupne mase 100 g. Sestavine smo tehtali na 0,1 g natančno, majhne količine pa na 0,001 g natančno. V pateni smo zmešali cetearil glukozid in prečiščeno vodo. Vodno fazo smo nato postavili na vodno kopel in jo segrevali na 80 °C do pojava bistre tekočine. Medtem smo v drugo pateno natehtali oljno fazo in jo prav tako segrevali na vodni kopeli do raztalitve sestavin. Oljno fazo smo primešali vodni fazi in ji dodali testne konzervanse v tekočem agregatnem stanju. Konzervanse v trdni obliki smo v odvisnosti od njihove topnosti primešali med segrevanjem k oljni oziroma vodni fazi. Dodali smo predhodno pripravljeno mešanico glicerola in ksantana. Nato smo sestavine 3 minute mešali s paličnim mešalnikom, da je nastala homogena bela zmes. Z lističi smo izmerili pH emulzij in vrednost pH, ki ni bila med 5,5 in 6, izravnali s kapljico raztopine mlečne kisline ali natrijevega hidrogenkarbonata.

3.4. ORGANIZEM

Za izvedbo preizkusa smo uporabili bakterijo *Escherichia coli* seva ATCC 8739. *E. coli* je po Gramu negativna bakterija iz družine *Enterobacteriaceae* in predstavlja velik del normalne črevesne flore sesalcev (34). Spada v sklop sevov mikroorganizmov, ki jih je standard ISO določil za testiranje kozmetičnih izdelkov z izzivnim preizkusom. Izvedbo izzivnega preizkusa z *E. coli* priporočajo zlasti za peroralne pripravke, vendar je pomembna informacija tudi za dermalne pripravke. Sev *Escherichia coli* ATCC 8739 Bioball™ smo kupili pri proizvajalcu bioMérieux®. Gre za liofilizirano obliko bakterij v vodotopni kroglici in je po rehidraciji s priloženim pufrom takoj primerna za uporabo. Bioball™ proizvajalca bioMérieux® je enostaven za uporabo, zagotavlja koncentracijo 10⁸

cfu/ml živih bakterij, kakor je določeno po standardu ISO, in je odobren s strani farmakopeje.

3.5. REAGENTI

Zaradi praktičnosti smo uporabili že pripravljene zmesi za gojišča, diluent in nevtralizator v obliki praškov, ki smo jim dodali le vodo, diluentu pa še ustrezno količino natrijevega klorida. Ves material, ki smo ga uporabili, je v skladu s standardom ISO 11930. Za bakterije smo uporabljali gojišče TSA-D oziroma triptični soja agar prav tako podjetja bioMérieux®. Je neselektivno bakterijsko gojišče.

Sestavine pripravljenega gojišča TSA-D:

- | | |
|---------------------------------|---------|
| • pankreasni hidrolizat kazeina | 15 g |
| • papainski hidrolizat soje | 5 g |
| • natrijev klorid | 5 g |
| • agar | 15 g |
| • voda | 1000 ml |

Za redčenje smo uporabljali diluent, ki smo ga pripravili iz natrijevega klorida, prečiščene vode in pankreasnega hidrolizata kazeina Bacto™ Tryptone proizvajalca Becton, DICKINSON and COMPANY.

Sestavine diluenta:

- | | |
|---------------------------------|---------|
| • pankreasni hidrolizat kazeina | 1 g |
| • natrijev klorid | 8,5 g |
| • voda | 1000 ml |

Kot nevtralizator konzervansov smo uporabili tekoč medij Eugon LT 100, ki nevtralizira širši spekter protimikrobnih učinkovin, omogoča rast bakterije *E. coli* in je prilagojen za

določanje števila bakterij v kozmetičnih izdelkih. Vsebuje dodatek spojine Triton X 100® z aktivno učinkovino oktksinol 9, ki poveča sproščanje mikroorganizmov iz filma formulacije kozmetičnih izdelkov. Aktivni učinkovini sta polisorbat 80 in lecitin, ki nevtralizirata delovanje konzervansa (35).

Sestavine nevtralizatorja Eugon LT 100:

• pankreasni hidrolizat kazeina	15 g
• papainski hidrolizat soje	5 g
• polisorbat 80	5 g
• natrijev klorid	4 g
• l-cistein	0,7 g
• natrijev sulfit	0,2 g
• glukoza	5,5 g
• jajčni lecitin	1 g
• triton x 100®	1 g
• voda	1000 ml

Po navodilih proizvajalcev smo dehidrirane reagente popolnoma raztopili v prečiščeni vodi in si pri tem pomagali z magnetnim mešalom. Vse reagente smo v steklenih posodah pred uporabo avtoklavirali pri znižanem tlaku na 121 °C 20 min. Pred vstavitvijo v avtoklav smo jih razkužili in nanje nalepili avtoklavirni trak, po katerem smo preverili uspešnost procesa. Takoj po odprtju avtoklava smo steklenice neprodušno zatesnili do uporabe in ohladili na temperaturo pod 48 °C. Potrošni plastični material smo predhodno avtoklavirali v enakih razmerah in posušili v sušilnikih pri 70 °C 2 dni oziroma do izhlapiitve vlage, ki bi bila lahko vir mikrobne kontaminacije. Kolikor je bilo mogoče, smo testiranje opravljali v LAF-komori z laminarnim pretokom zraka in s sterilizacijsko UV-lučko. Emulzije smo odmerjali s tehtanjem na 0,01 g natančno izven LAF-komore, zato razmere med testiranjem niso bile povsem sterilne. Do okužbe testnih pripravkov z okoljskimi mikroorganizmi je torej lahko prišlo med tehtanjem ali dotikom materiala z okuženimi pipetami.

3.6. PRIPRAVA INOKULUMA

Kroglico Bioball™ smo raztopili v 1,1 ml priloženega rehidracijskega pufra. Dobili smo koncentracijo 10^8 cfu/ml živih bakterij *E. coli*, kakor določa standard ISO. Inokulum smo nadalje postopno redčili z diluentom, ker smo za preizkus potrebovali manjše koncentracije in ker bi bile pri delu s tako majhnimi volumni večje napake.

3.7. ŠTETJE KOLONIJ

Kolonije smo šteli s prostim očesom ob predpostavki, da vsaka bakterija v gojišču razvije svojo kolonijo. Standard ISO zahteva, da je na petrijevki od 30 do 300 kolonij in da se za rezultat upošteva povprečje dveh paralel, ki se med seboj ne razlikujeta več kot za polovico. Zato smo začetni inokulum ustrezno redčili z diluentom.

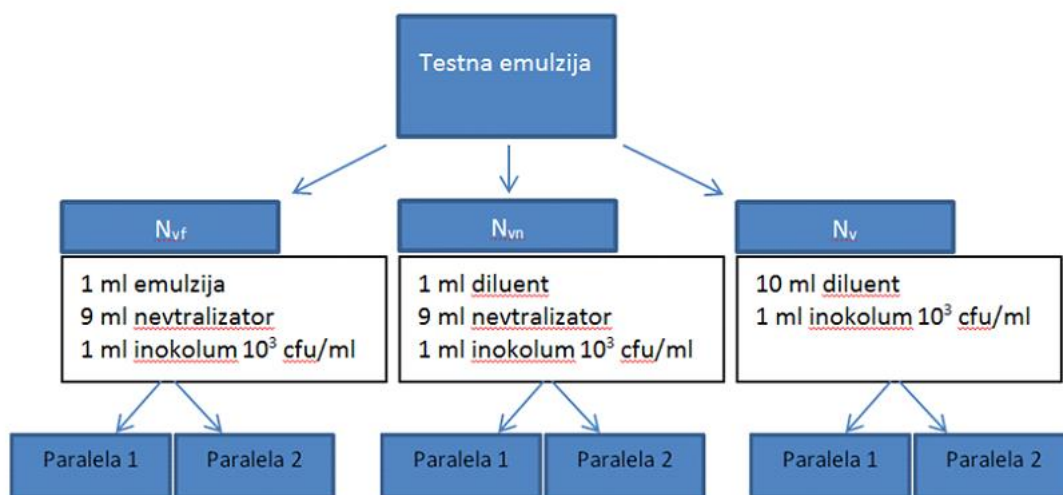
3.8. IZZIVNI PREIZKUS

Izzivni preizkus smo izvajali v skladu z navodili standarda ISO 11930, ki velja za kozmetične izdelke. Testne pripravke smo okužili s predpisanim številom bakterij, nato pa smo v določenih časovnih intervalih spremljali zmanjšanje ali povečanje njihovega števila. Za učinkovitost konzervansa mora ta v kozmetičnem izdelku dosegati pogoje, določene s strani standarda ISO. Preglednica VI prikazuje ocenjevalni kriterij za bakterije, ki ga mora naša formulacija izpolniti.

3.9. PREIZKUS UČINKOVITOSTI NEVTRALIZATORJA

Preizkus učinkovitosti nevtralizatorja smo izvedli prvi dan preizkusa. Za preizkus nevtralizatorja smo uporabili le večje koncentracije testiranih spojin, pozitivno in negativno kontrolo ter za vsako naredili 3 testne pripravke v sterilnih vsebnikih in jih okužili z razredčenim inokulumom, da smo dosegli končno koncentracijo 10^2 cfu/ml. En pripravek je vseboval nevtralizator s testno emulzijo (oznaka N_{vf}), kar je predstavljalo tudi

10-kratno redčitev vzorca. Pustili smo stati 30 minut na sobni temperaturi (približno 25 °C), da se je protimikrobno delovanje konzervansa nevtraliziralo. Druga dva pripravka sta bila za kontrolo živosti bakterij brez formulacije (N_{vf}), kjer smo emulzijo zamenjali z diluentom, in za kontrolo vsebnosti živih bakterij inokuluma (N_v), kjer je bil le razredčen inokulum. Za lažje razumevanje je proces prikazan v miselnem vzorcu na sliki 3.



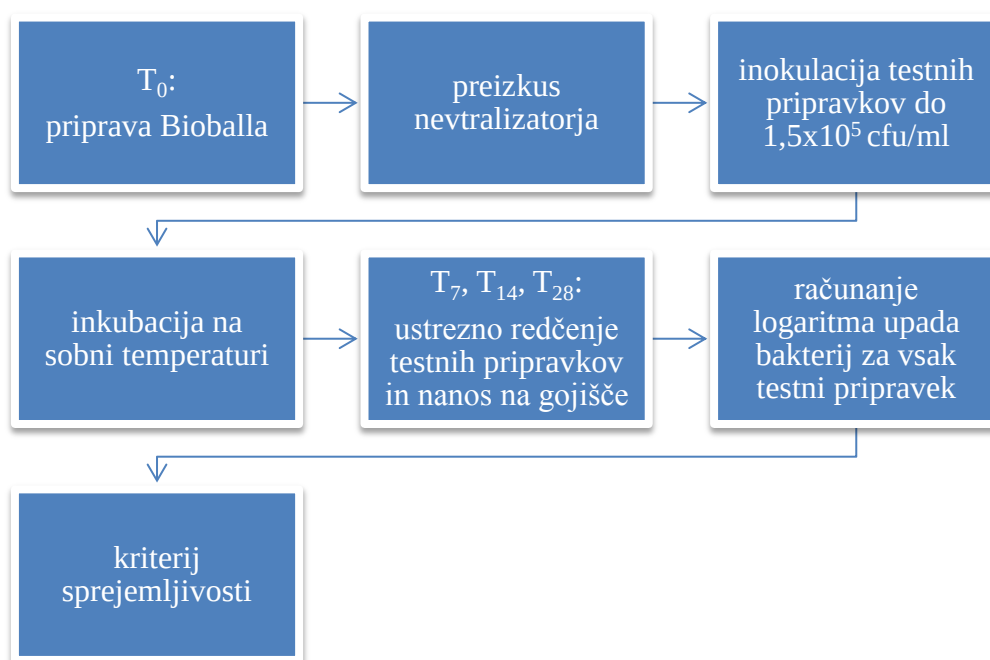
Slika 3: Prikaz preizkusa nevtralizatorja v miselnem vzorcu

Cepitev na gojišče smo izvedli tako, da smo po 1 ml vsakega vzorca odpipetirali na petrijevko in jo previdno zalili s približnim odmerkom 15 do 20 ml gojišča. Pri tem smo morali paziti, da se je temperatura gojišča gibala med 40 in 48 °C. Nad to temperaturo bi bakterije lahko uničili, pod 40 °C pa se je gojišče začelo strjevati. Kot je prikazano v tabeli, smo imeli na koncu 84 petrijev. V LAF-komori smo počakali 10 minut, da se je gojišče strdilo in je vlaga na pokrovčkih petrijev izginila. Nato smo jih postavili v inkubator na 37°C, kjer so se inkubirale 48 ur. Obrnili smo jih s pokrovom navzdol, da se vlaga ni nabirala na gojišču.

3.10. IZVEDBA IZZIVNEGA PREIZKUSA

Po preizkusu učinkovitosti nevtralizatorja smo po 20 g vsake testne emulzije natehtali v

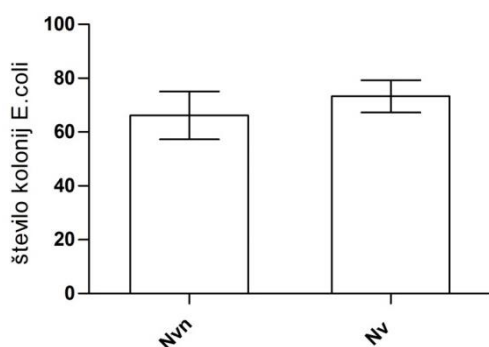
označene sterilne vsebnike in izvedli masovno kontaminacijo. Izvedbo postopka prikazuje slika 4. Za kontaminacijo smo uporabili 30 μl začetnega inokuluma s koncentracijo 10^8 cfu/ml. Tako smo dobili končno koncentracijo $1,5 \times 10^5$ cfu/ml vzorca, kar ustreza predpisani vrednosti od 10^5 do 10^6 cfu/ml, ki jo določa standard ISO. Da je bil inokulum enakomerno razporejen, smo si pri mešanju pomagali s sterilnimi plastičnimi ezami za enkratno uporabo, nato pa smo jih pretresli še na stresalniku. Vsebnike z vzorci smo zaprte shranjevali na sobni temperaturi okoli 25°C ves čas izzivnega preizkusa. V časovnih intervalih 7, 14, 21 in 28 dni od dneva okužbe smo iz vzorcev vzeli po 1 gram pripravka in ga ustrezno razredčenega in z nevtraliziranim protimikrobnim delovanjem nanесли na gojišče. Da smo na petrijevki dobili od 30 do 300 kolonij, smo z diluentom iz 10-kratne redčitve vzorca naredili še 100- in 1000-kratno redčitev. Kasneje smo redčenje prilagajali rasti bakterijam. Postopek redčenja pri izzivnem preizkusu je popolnoma enak kot pri preizkusu nevtralizatorja.



Slika 4: Postopek izzivnega preizkusa v miselnem vzorcu

4. REZULTATI

Vse rezultate smo ovrednotili po kriteriju standarda ISO 11930. Z izzivnim preizkusom smo preverili protibakterijsko delovanje na bakteriji *E. coli*. Da bi lahko ugotovili, ali je testna spojina v taki koncentraciji primerna za našo formulacijo, bi morali opraviti preizkus še z ostalimi mikroorganizmi, ki jih določa standard ISO. Pri preizkusu učinkovitosti nevtralizatorja smo primerjali število zraslih kolonij ob prisotnosti formulacije, kjer bi morale redčenje z nevtralizatorjem preprečiti protimikrobno delovanje konzervansa (N_{vf}), s številom kolonij v nevtralizatorju brez formulacije (N_{vn}) in s številom kolonij inokuluma, ki smo ga redčili v diluentu in ne v nevtralizatorju (N_v). Pri ustreznem nevtralizatorju mora biti vrednost N_{vn} približno enaka vrednosti N_v . S tem potrdimo, da nevtralizator ni toksičen za mikroorganizem, ki ga uporabljamo. Kakor vidimo na sliki 5, se povprečni vrednosti N_{vn} in N_v , ki smo ju izračunali iz števila kolonij na 28 petrijevkah, ne razlikujeta značilno. Zato lahko trdimo, da nevtralizator ni toksičen za *E. coli*. Število kolonij, ki zraste ob prisotnosti formulacije, mora doseči vsaj polovico števila kolonij, ki zraste v odsotnosti formulacije. Oziroma vrednost N_{vf} mora biti večja od polovične vrednosti N_{vn} . Če je ta pogoj zagotovljen nevtralizator uspešno zavre protimikrobno delovanje konzervansov. Iz preglednice III je razvidno, da izbrani nevtralizator Eugon LT 100 izpolnjuje ta pogoj, zato je primeren za izvedbo izzivnega preizkusa s testnimi spojinami.



Slika 5: Preizkus nevtralizatorja. Povprečno število kolonij *E. coli* na petrijevki, ki so zrasle ob prisotnosti nevtralizatorja (N_{vn}) in brez nevtralizatorja, v diluentu (N_v). Povprečje in standardna deviacija sta izračunani iz 28 ponovitev.

Preglednica III: Preizkus učinkovitosti nevtralizatorja

PREIZKUS UČINKOVITOSTI NEVTRALIZATORJA	N_{vf}	Kriterij za N_{vf}
Ime spojine	povprečno število kolonij na petrijevko	
Cosgard	32,5	>31,5
Dehidroocetna kislina	56,5	>27,25
Levulinska kislina	63	>31,25
Sorbinska k.	58,5	>29,5
Dermosoft GMCY	68	>37
Janeževa kislina	80,5	>28,75
Leucidal	85	>38,5
Benzojska kislina	76,5	>28,75
Fenoksietanol	77,5	>37,25
Etanol	92,5	>38,5
Ekstrakt grenivke	67,5	>29,75
Salicilna kislina	82,5	>33,5
Kontrola brez konzervansa	92	>30,75
Pozitivna kontrola	83	>40,75

Povprečno število kolonij na petrijevki, ki so zrasle ob prisotnosti formulacije (N_{vf}) in v odsotnosti formulacije (N_v). Povprečje smo izračunali iz dveh ponovitev.

V primeru vlažilne emulzije konzervans uspešno opravi 28-dnevni izzivni preizkus, če ustreza kriteriju A v prilogi B predpisa ISO 11930 (preglednica IV), ki obravnava protimikrobno delovanje formulacije brez dodatne zaščite pakiranja.

Preglednica IV: Kriterij za ocenjevanje uspešnosti izzivnega preizkusa.

	T ₇	T ₁₄	T ₂₈
Kriterij A	R _{≥3}	R _{≥3} , NP	R _{≥3} , NP
Kriterij B	/	R _{≥3}	R _{≥3} , NP

V učinkovito konzervirani formulaciji pride do upada števila bakterij za vsaj 3 logaritemske enote glede na koncentracijo bakterij ob inokulaciji (R_{≥3}). Oziroma ne pride do povečanja števila mikroorganizmov v primerjavi s številom določenim v predhodni časovni točki (NP). T₇ pri kriteriju B ni zahtevan (/). Dovoljeno je odstopanje za 0,5 logaritemske enote.

Tako kot predpisuje standard ISO, smo ob časovnih intervalih T₇, T₁₄ in T₂₈ določili število še živih *E. coli*, ki smo jih inokulirali ob času T₀, iz povprečnega števila kolonij, ki so zrasle na dveh petrijevkah. Iz koncentracije mikroorganizmov ob času inokulacije (N₀) in koncentracije mikroorganizmov po 7, 14 in 28 dneh (N₇, N₁₄ in N₂₈) smo po enačbi 1 izračunali vrednost R.

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

Enačba 1: *Enačba za izračun logaritemskega zmanjšanja števila bakterij. R_x: logaritem upada števila bakterij ob času x. N₀: koncentracija bakterij ob inokulaciji. N_x: koncentracija bakterij v formulaciji ob času x.*

Povečano rast bakterij *E. coli* smo opazili, če smo formulacijo pripravili z janeževo kislino, fenoksietanolom, pri pozitivni kontroli (zmesi parabenov) in pri negativni kontroli (brez konzervansa). Pri ostalih spojinah je bila rast mikroorganizmov majhna in na petrijevkah je zraslo manj kot 30 kolonij. S pomočjo tega števila kolonij smo ocenili vrednost R. Kljub temu, da predpis ISO zahteva, da inkubacija traja 48 ur, smo prvo štetje kolonij izvedli že po 24 urah. Kolonije so bile namreč ponekod že opazne in jih je bilo še možno ločiti. Po 48 urah pa so bile kolonije večje in so se pri večji gostoti med seboj stikale ali pa se je katera

razrasla po površini in onemogočala štetje ostalih kolonij. Pri T₁₄ se je nepričakovano pojavilo od 200 do 300 kolonij pri 100× redčitvi vsakega pripravka in nekaj manj pri 1000× redčitvi. Sklepali smo, da je prišlo do kontaminacije materiala, zato smo dodatno uvedli časovni interval T₂₁. Shranili smo reagente in čez 7 dni je diluent pomotnil, kar je znak kontaminacije in rezultati zato T₁₄ niso veljavni. Namesto T₁₄ smo upoštevali T₂₁.

Preglednica V: Rezultati izzivnega preizkusa

testirana spojina	odstotek v formulaciji	vrednost R			
		T ₇	T ₂₁	T ₂₈	
DEHIDROOCETNA KISLINA	0,3	>3	3*	>3	ustreza
	0,15	>3	2,9*	>3	ustreza
DERMOSOFT® 688	0,15	2	2,9*	>3	ne ustreza [#]
	0,05	<2	2,8*	>3	ne ustreza [#]
FENOKSIETANOL	0,5	1,8	2,9*	>3	ne ustreza [#]
	0,25	<0	<0	<0*	ne ustreza
LEVULINSKA KISLINA	0,25	>3	>3*	>3*	ustreza
	0,2	>3	>3	>3	ustreza
BENZOJSKA KISLINA	0,25	>3	2,8*	>3	ustreza
	0,13	>3*	2,6*	>3*	ustreza
SORBINSKA KISLINA	0,3	>3	2,9*	>3	ustreza
	0,15	>3	2,8*	>3	ustreza
SALICILNA KISLINA	0,25	>3	2,9*	>3	ustreza
	0,13	>3	2,7*	>3	ustreza
LEUCIDAL LIQUID SF	1,15	>3	1,7*	>3	ne ustreza ^{\$}
	1	>3	2,7*	>3	ustreza
COSGARD	0,4	>3	2,4*	>3	ne ustreza ^{\$}
	0,2	>3	2,9*	0,9	ne ustreza

DERMOSOFT® GMCY	0,5	>3	3*	>3	ustreza
	0,3	>3	2,6*	>3	ustreza
GRENIFIT	0,5	>3	2,6*	>3	ustreza
	0,1	>3	3*	>3	ustreza
70% RAZTOPINA ETANOLA	17	>3	>3*	>3	ustreza
	14	>3	2,5*	>3	ustreza
pozitivna kontrola (metil- in propilparaben v razmerju 7 : 3)	0,1 %	<0	<0	<0	ne ustreza
negativna kontrola	brez	<0	<0	<0	ne ustreza

* na petrijevkah je zraslo manj kot 30 kolonij. § Pri T_{21} je verjetno prišlo do napake, saj formulacija z nižjo koncentracijo leucidala ustreza. \$ Pri T_{21} je vrednost R malo pod sprejemljivo vrednostjo. Ker je ocenjena na podlagi števila kolonij, ki je manjše od 30, smatramo da ustreza. # Bi ustrezal po kriteriju B.

Pri 17 testnih spojinah so zelo dobri rezultati, saj niti pri nižji koncentraciji kolonije niso rasle, zato ustrezajo kriteriju in so izzivni preizkus z *E. coli* opravile. Prav tako je opravila izzivni preizkus 0,13-odstotna benzojska kislina, saj z $R_7 > 3$ ustreza pogoju. Pri koncentraciji 0,2 % Cosgarda so se kolonije pojavile po 4 tednih. Število kolonij na petrijevki je bilo med 30 in 300, zato je rezultat veljaven. Ker je $R_{28} < 3$, izzivni preizkus ni opravljen in koncentracije 0,2 % ne bi uporabili za našo formulacijo. Pri koncentraciji 0,25 % levulinske kisline sta se 21. dan na petrijevkah pojavili manj kot dve koloniji. Glede na to, da pri manjši koncentraciji ni prišlo do rasti kolonij, bi levulinska kislina prišla v poštev v vlogi konzervansa. Dermosoft® 688 z $R_7 < 3$ ne ustreza pogoju A. Ustreza pa, če upoštevamo kriterij B. Veliko kolonij je zraslo pri manjši koncentraciji fenoksietanola, ker je slabo zaščitil našo formulacijo in ni primeren kot konzervans. Največ kolonij pa je bilo na kontrolah, saj so bakterije gojišča povsem prerasle. Negativna kontrola ni imela konzervansa, zato je bil tak rezultat pričakovan, parabeni pa bi morali opraviti preizkus, saj so predstavljali pozitivno kontrolo. Organoleptične lastnosti so se v

skladu z rezultati preizkusa spremenile pri večji koncentraciji Dermosoft® 688, fenoksietanolu in kontrolah. Emulzije so postale manj viskozne, vonj se bistveno ni spremenil. Pri kontrolah in fenoksietanolu so se pokazale kolonije plesni.

5. RAZPRAVA

Trend naravnih izdelkov in pridobivanja učinkovin iz narave se iz dneva v dan povečuje, čemur pospešeno sledi tudi industrija. Natančno določeni procesi in naravne surovine so pogoj za pridobitev certifikata NATRUE. Z vidika manjšega onesnaževanja je to vsekakor dobro, vendar v primeru zaščite okolja in kozmetike pa naravno ne pomeni vedno najboljše. Različni izolirani izvlečki rastlinskega izvora, ki imajo protimikrobno delovanje in ščitijo rastline pred škodljivimi organizmi, so največkrat kompleksno sestavljeni in pri ljudeh nemalokrat povzročajo alergijske reakcije. Tiste protimikrobne spojine, ki jih v teh izvlečkih uspemo prepoznati, lahko sintetiziramo tudi laboratorijsko. To je zelo pomembno, kajti delež teh snovi v rastlinah je zelo majhen in bi za obsežno proizvodnjo porabili ogromno naravnega materiala, poleg tega tudi izolacijski postopki niso poceni (3). Naravne kozmetike ni enostavno mikrobiološko zaščititi. Certifikat NATRUE dovoljuje le nekaj vrst konzervansov, zato je vpeljava novih snovi na tem področju nujna. Z novo evropsko Uredbo je za vse kozmetične izdelke, tako navadne kot tudi naravne, obvezna ocena varnosti in izzivni preizkus je poleg stabilnostnih študij del te ocene. Velik delež naravnih spojin, ki smo jih testirali z izzivnim preizkusom, predstavljajo organske kisline, te pa so učinkovitejše pri pH, nižjem od pH naše formulacije. Kljub temu so testirane spojine presenetljivo dobro zaščitile emulzijo, zlasti če upoštevamo dejstvo, da je šlo za emulzijo z velikim deležem vode in uporabo koncentracij konzervansov na spodnji meji delovanja. Testne spojine so izkazale dobro protibakterijsko delovanje proti *E. coli*, saj pri večini ni zrasla nobena kolonija. Da bi potrdili ustrezno protimikrobno zaščito s testiranimi spojinami, bi morali opraviti nadaljnje teste z mikroorganizmi, ki so določeni s standardom. Na petrijevkah je pogosto zraslo manj kot 30 kolonij, tudi če smo manj redčili okuženo

testno formulacijo. Tudi v teh primerih smo poskušali oceniti vrednost R. V tabeli so te vrednosti označene z zvezdico. Po negativni kontroli vidimo, da so sicer v emulziji bakterije dobro uspevale in je bil protibakterijski učinek posledica testnih sestavin. K protibakterijski zaščiti je nekoliko prispevala mlečna kislina oziroma nekoliko kisel pH. V kislem pH se delovanje konzervansov poveča, spekter bakterij, ki se lahko množijo v kislem okolju, pa je manjši (16). Nekaj težav smo imeli pri zagotavljanju aseptičnih pogojev med izvedbo izzivnega preizkusa. Pri časovni točki T_{14} se nam je okužil diluent, zato smo preizkus ponovili pri T_{21} . Ker nam manjkajo rezultati preizkusa s časovne točke T_{14} , v tem delu potek izzivnega preizkusa ni povsem v skladu s standardom ISO. Iz priloge 3 je razvidno, da je pri časovni točki T_{21} nekaj kolonij zraslo na petrijevkah s 100-krat redčeno formulacijo pri skoraj vseh spojinah. Vzrok zato bi lahko bila zunanja okužba z mikroorganizmi, ki uspevajo na gojišču TSA, okužba katerega od reagentov in materialov, ki smo jih uporabili pri delu. Menimo, da bi bil lahko kriv okužen diluent, saj ga pri 10-kratni redčitvi še nismo uporabljali. Vzrok je lahko tudi, da je pri večjem redčenju zaviralno delovanje konzervansa še bolj učinkovito preprečeno, kar omogoči razrast majhnemu številu *E. coli*, ki so v formulaciji še viabilne. Vse testirane spojine so pokazale boljše protimikrobno delovanje od pozitivne kontrole. Pozitivna kontrola s parabeni je po podatkih kemijskega podjetja Ueno proti *E. coli* učinkovita v koncentraciji, ki smo jo uporabili (36). V končnem poročilu o varnosti parabenov so podatki, da se je leta 2013 v kremah in losjonih za uporabo na koži uporabljala koncentracija parabenov od 0,1 % do 0,46 %. Po rezultatih iz izzivnega testa se je pozitivna kontrola izkazala za popolnoma neučinkovito in je primerljiva negativni kontroli, ki ni vsebovala konzervansa. Vzrok za nedelovanje parabenov bi morda lahko pripisali neustreznim natehtanim količinam, ki smo jo dodali v formulacijo. Pri tehtanju konzervansov smo uporabili zaprto tehtnico z natančnostjo tehtanja na 0,01 g, mi pa smo tehtali količini 0,03 g in 0,07 g. Napako smo tako lahko naredili za 0,01 g. Za neučinkovitost so možni še drugi vzroki, na primer interakcije z ostalimi sestavinami ali nezadostna topnost. Parabeni so v vodi slabo topni, propilparaben celo netopen. Zaradi daljše verige je bolj topen v oljni fazi. Možno je, da je bil večji del propilparabena v oljni fazi in je tako v vodni fazi učinkovalo le 0,07 %

metilparabena, kar pa je očitno premalo za zaščito emulzije. Po podatkih industrijskega obrata Sharon laboratories naj bi se parabeni uspešno raztopili v vodni fazi, ki je segreta nad 60 °C (37). Po podatkih raziskave iz 2005 je minimalna še učinkovita koncentracija za metilparaben 0,2 % in propilparaben 0,1 % v formulaciji losijona (38). Pri izdelavi emulzije smo uporabili neionski emulgator cetearilglukozid, ki bi lahko povzročil manjšo učinkovitost parabenov (28).

6. SKLEP

K trendu ekološkega načina življenja spada tudi uporaba naravne kozmetike. Do zdaj so najbolj raziskani in tudi najpogosteje uporabljeni sintezni konzervansi. Pri izdelavi naravne kozmetike nimamo tako velike izbire konzervansov, zlasti pa niso tako raziskani, zato je vpeljava novih konzervansov na tem področju nujna. Okolju prijazni procesi izdelave in razgradnja naravne kozmetike predstavljajo dosti manjše breme za okolje, kljub temu pa moramo razumno pristopiti k njeni uporabi zaradi potenciala draženja kože in prekomerne porabe naravnih virov. Slednjo težavo učinkovito rešujemo z laboratorijsko sintezo prepoznanih naravnih učinkovin. Izzivni preizkus zelo uspešno pokaže mikrobiološko stabilnost kozmetičnih formulacij. Je pomemben člen ocene varnosti, ki je z novo evropsko direktivo obvezna za vse kozmetične izdelke. Razen Dermosoft® 688 do koncentracije 0,15 %, fenoksietanola do koncentracije 0,5 % in Cosgarda do koncentracije 0,2 % so vse naše testne spojine uspešno opravile izzivni preizkus. Vendar smo s tem dokazali le delovanje proti bakteriji *E. coli*. Da bi lahko ugotovili, ali je testna spojina v taki koncentraciji primerna za našo formulacijo, bi morali opraviti nadaljnje preizkuse z ostalimi mikroorganizmi, ki jih določa standard ISO.

7. VIRI

1. Siegert W: Microbiological Quality Management for the Production of Cosmetics and Detergents. SOFW Journal 2012; 11; 138: 2-9.
2. Fiorentino F A M., Chorili M, Salgado H R N: The use of the challenge test to analyse preservative efficiency in non-sterile cosmetic and health. Anal Methods 2011; 3: 790-98.
3. Steinberg D C: Preservatives for cosmetics. Allured pub corp 2012; 12-210.
4. ISO 11930: Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product 2012.
5. Siegert W. ISO 11930 – A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW Journal, 2012, 138: 44-53.
6. Eurpean Phamacopeia 7.0; 5.1.3.
7. <http://www.midwestscc.org/blog2/wp-content/uploads/presentations/Jan2012CurrentTrendsInCosmeticPreservation.pdf>. Dostopano: 23.9.2011
8. Jeffries N: Shelf Life: The Future of Preservatives. Global Cosmetic Industry 2006; 8: 44-46.
9. Abrutyn E S: Optimizing Formula Preservation. Cosmet Toiletries 2010; 125; 3: 22-28.
10. Spiegeleer B., Wattyn E., Slegers G, Van der Meeren P., Vlaminck K, Van Vooren L: The Importance of the Cosolvent Propylene Glycol on the Antimicrobial Preservative Efficacy of a Pharmaceutical Formulation by DOE-Ruggedness Testing. Pharm Dev Technol 2006; 11: 275-284.
11. Rodford R: Safety evaluation of preservatives. Int J Cosmetic Sci 1997; 19: 281-90.
12. Lundov M D, Moesby L: Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. Contact Dermatitis 2009; 60: 70-8.
13. <http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/39c374b4-30bb-4e1a-b316-b16b8d9060a2/39c374b4-30bb-4e1a-b316-b16b8d9060a2.xml>. Dostopano: 9.5.2015
14. <http://www.cosmos-standard.org/>. Dostopano: 2.4.2015

15. Denyer S P, Baird R M: Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices. CRC Press, 2006: 360.
16. Dweck A C: Formulating Natural Cosmetics, Allured Business Media, 2010: 107-11.
17. Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C: New alternatives to cosmetics preservation. J Cosmet Sci 2010; 61: 107-23.
18. Dermosoft® 688, Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH, Nemčija.
(Informacije o proizvodu)
19. http://www.mb-lekarne.si/slo/izdelki/izdelek/19/grenifit_kapljice Dostopano: 11.6.2015
20. Giamperi L, Fraternale D, Bucchini A, Ricci D: Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract. Fitoterapia 2004; 75: 221-24.
21. Reagor L, Gusman J, McCoy L, Carino E, Heggors JP: The Effectiveness of Processed Grapefruit-Seed Extract as An Antibacterial Agent: I. An In Vitro Agar Assay. J Altern Complement Med 2002; 8; 3: 325-32.
22. Dermosoft GCMY, Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH, Nemčija.
(Informacije o proizvodu)
23. Conley A J, Kabara J J: Antimicrobial Action of Esters of Polyhydric Alcohols. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4; 5: 501-06.
24. Herbert V G, Spiro J M, Reich K, Steinkraus V, Karimi J, Martin V, Breuer K: Glyceryl (mono)caprylate – a new contact allergen. Contact Dermatitis 2013; 69: 375-85.
25. Baumgartner S: Konzervansi v kozmetičnih izdelkih (predavanje); Kozmetični izdelki 1, 27.3.2013.
26. Scognamiglio J, Jones L, Letizia C S, Api A M: Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. Food Chem Toxicol 2012; 50: 244–55.
27. Lundov M D, Johansen J D, Zachariae C, Moesby L: Low-level efficacy of cosmetic preservatives. Int J Cosmet Sci 2011; 33: 190-96.
28. Cosmetics Directive 76/768/EEC, priloga V

29. Brewster B: Preservative blends. *Cosmet Toiletries* 2005; 120; 1: 22-8.
30. <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PR427.pdf> Dostopano: 8.6.2015
31. Shahidi F, Zhong Y: Bioactive peptides. *J AOAC Int* 2008; 91; 4:, 914-31.
32. Kamysz W, Turecka K: Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol Pharm* 2005; 62; 5: 341-46.
33. Leucidal Liquid, Active Micro Tehnologies, ZDA. (Informacije o proizvodu)
34. http://sl.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli Dostopano:9.5.2015
35. http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/02-654_TDS_EN.pdf.. Dostopano: 15.4.2015
36. http://www.ueno-fc.co.jp/MEDIA/PARABEN_HP%20DATA_0702.pdf Dostopano: 5.8.2014
37. <http://www.sharon-labs.com/images/items/30.pdf>. Dostopano: 5.8.2015
38. Manning M, Orawski P: Food-Grade Esters Used as Personal Care Antimicrobials. *Cosmet Toiletries* 2005; 120; 1: 63-8.

8. PRILOGE

		T ₇					
		redčitve					
		10		10 ²		10 ³	
ime spojine	%	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂
<i>Cosgard</i>	0,4	0	0	0	0	0	0
	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Dehidroacetna kislina</i>	0,3	0	0	0	0	0	0
	0,15	0	0	0	0	0	0
<i>Levulinska kislina</i>	0,25	0	0	0	0	0	0
	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Sorbinska kislina</i>	0,3	0	0	0	0	0	0
	0,15	0	0	0	0	0	0
<i>Dermosoft GMCY</i>	0,5	0	0	0	0	0	0
	0,3	1	1	0	0	0	0
<i>Janeževa kislina</i>	0,15	139	129	1	3	0	1
	0,05	prer.	prer.	8	2	2	0
<i>Leucidal</i>	1,15	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	1
<i>Benzojska kislina</i>	0,25	0	0	0	0	0	0
	0,13	2	6	0	0	0	0
<i>FenoksiEtOH</i>	0,5	316	318	2	7	0	0
	0,25	prer.	prer.	prer.	prer.	638	686
<i>EtOH</i>	17	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0
<i>Grenifit</i>	0,5	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0
<i>Salicilna kislina</i>	0,25	0	1	0	0	0	0
	0,13	0	0	0	0	0	0
<i>Kontrola -</i>		prer.	prer.	prer.	prer.	1612	2276
<i>Kontrola +</i>		prer.	prer.	prer.	prer.	1656	1440

Priloga 1: Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T₇. n₁: paralel. n₂: paralela 2. Prer.: preraslo gojišče z bakterijami. %: masni delež v emulzijah.

		T ₂₁											
		redčitve											
		10		10 ²		10 ³		10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶	
ime spojine	%	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂
Cosgard	0,4	0	0	5	7	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,2	0	0	0	4	–	–	–	–	–	–	–	–
Dehidroacetna kislina	0,3	0	0	2	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,15	0	0	3	1	–	–	–	–	–	–	–	–
Levulinska kislina	0,25	1	2	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,2	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–
Sorbinska kislina	0,3	0	0	1	3	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,15	0	0	0	5	–	–	–	–	–	–	–	–
Dermosoft GMCY	0,5	0	0	3	4	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,3	0	0	1	2	–	–	–	–	–	–	–	–
Janeževa kislina	0,15	2	0	1	3	1	5	–	–	–	–	–	–
	0,05	0	0	3	2	0	5	0	6	–	–	–	–
Leucidal	1,15	0	1	2	53	–	–	–	–	–	–	–	–
	1	0	0	6	0	–	–	–	–	–	–	–	–
Benzojska kislina	0,25	0	0	1	4	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,13	0	0	6	2	–	–	–	–	–	–	–	–
FenoksiEtOH	0,5	0	1	2	2	0	0	–	–	–	–	–	–
	0,25	–	–	–	–	–	–	101	125	20	17	3	4
EtOH	17	0	0	4	3	–	–	–	–	–	–	–	–
	14	0	1	0	3	–	–	–	–	–	–	–	–
Grenifit	0,5	0	0	2	0	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,1	0	0	3	6	–	–	–	–	–	–	–	–
Salicilna kislina	0,25	0	2	3	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,13	0	0	1	5	–	–	–	–	–	–	–	–
Kontrola -		–	–	–	–	–	–	prer.	prer.	561	574	63	74
Kontrola +		–	–	–	–	–	–	706	617	72	62	7	–

Priloga 2: Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T₂₁.

Simbol - : redčitve niso bile izvedene

		T ₂₈													
		redčitve													
		10		10 ²		10 ³		10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶		10 ⁷	
ime spojine	%	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂	n ₁	n ₂
Cosgard	0,4	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,2	150	207	21	34	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Dehidroacetna kislina	0,3	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,15	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Levulinska kislina	0,25	0	1	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,2	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sorbinska kislina	0,3	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,15	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Dermosoft GMCY	0,5	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,3	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Janeževa kislina	0,15	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–
Leucidal	1,15	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	1	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Benzojska kislina	0,25	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,13	0	0	2	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FenoksiEtOH	0,5	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,25	–	–	–	–	–	–	12	7	1	1	0	0	0	0
EtOH	17	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	14	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Grenifit	0,5	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,1	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Salicilna kislina	0,25	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,13	0	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Kontrola -		–	–	–	–	–	–	–	–	465	481	62	59	5	4
Kontrola +		–	–	–	–	–	–	–	–	8	15	–	4	–	1

Priloga 3: Število prešteti kolonij pri posameznih redčenjih v časovnem intervalu T₂₈.