

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA ŠTEPIC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA ŠTEPIC

**PREIZKUS UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA RAZLIČNIH SESTAVIN
NARAVNEGA IZVORA V DERMALNI FORMULACIJI Z UPORABO
BAKTERIJE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**CHALLENGE TEST OF PRESERVATION EFFICACY OF VARIOUS NATURAL
INGREDIENTS IN DERMAL FORMULATION USING *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo.

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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., ki mi je omogočila opravljanje diplomskega dela, me ob tem vodila in mi svetovala. Posebna zahvala gre tudi izr. prof. dr. Mojci Lunder za vso pomoč in usmerjanje pri eksperimentalnem delu. Zahvalila bi se tudi celotni Katedri za farmacevtsko biologijo, kjer so mi omogočili delo v zelo prijetnem vzdušju.

Izjava

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

VSEBINA

KAZALO PREGLEDNIC	3
KAZALO SLIK	4
POVZETEK	5
ABSTRACT	6
SEZNAM OKRAJŠAV	7
1. UVOD.....	8
1.1. MIKROBIOLOŠKA OKUŽBA.....	8
1.1.1. MIKROORGANIZMI	8
1.1.2. POSLEDICE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE	9
1.1.3. PREPREČEVANJE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE.....	10
1.2. KONZERVANSI.....	12
1.2.1. KLASIČNI KONZERVANSI	12
1.2.2. TEŽNJA PO NARAVNIH KONZERVANSIH	13
1.3. TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV	16
2. NAMEN DELA	20
3. MATERIALI IN METODE	21
3.1. MATERIALI	21
3.2. METODE	24
3.2.1. PRIPRAVA KOZMETIČNIH IZDELKOV.....	24
3.2.2. TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV	26
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5. SKLEP	36
6. LITERATURA	37
7. PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Mikroorganizmi, ki jih smernice predpostavljajo za testiranje protimikrobne učinkovitosti (28).....	18
Preglednica II: Število mikroorganizmov in količina inokuluma, ki ga uporabimo za testiranje protimikrobne učinkovitosti (28).....	18
Preglednica III: Kriterij sprejemljivosti po standardu ISO 11930 (28).....	19
Preglednica IV: Kriterij sprejemljivosti preizkusa po Schülke KoKo (28).....	19

Preglednica V: Kriterij sprejemljivosti po Evropski farmakopeji (28)	19
Preglednica VI: Kriterij sprejemljivosti po Ameriški farmakopeji (28)	19
Preglednica VII: Kriterij sprejemljivosti po ASEAN (28)	19
Preglednica VIII: Sestavine pripravljenih kozmetičnih emulzij.....	21
Preglednica IX: Izbrane protimikrobne sestavine naravnega izvora	22
Preglednica X: Delež sestavin v kozmetičnem izdelku z minimalno koncentracijo konzervansa	24
Preglednica XI: Delež sestavin v kozmetičnem izdelku z visoko koncentracijo konzervansa .	25
Preglednica XII: Rezultati demonstracije učinkovitosti nevtralizatorja	28
Preglednica XIII: Vrednost R in ustreznost konzervansa pri časovnih točkah T7, T14 in T28 glede na pogoje kriterija A standarda ISO 11930	29
Preglednica XIV: Število kolonij pri vseh treh časovnih točkah ter povprečno število kolonij pri manjši koncentraciji	Priloga
Preglednica XV: Število kolonij pri vseh treh časovnih točkah ter povprečno število kolonij pri višji koncentraciji	Priloga

KAZALO SLIK

Slika 1: Gojišče vzorca z levulinsko kislino z večjo koncentracijo pri točki T7.....	31
Slika 2: Vzorec z veliko vsebnostjo levulinske kisline	33
Slika 3: Vzorec brez protimikrobne snovi pri T14	33
Slika 4: Vzorec z veliko vsebnostjo zmesi dehidroocetne kisline in benzilalkohola pri 100-kratni redčitvi ob T14	33
Slika 5: Vzorec z majhno vsebnostjo salicilne kisline pri 100-kratni redčitvi ob T14.....	33

POVZETEK

Konzervansi so sestavine, ki jih v kozmetičnih izdelkih uporabljamo za preprečevanje mikrobiološke okužbe. Glavni dejavnik za rast in razvoj bakterij, virusov in gliv je voda, ki je v večini kozmetičnih izdelkov. Če upoštevamo, da kozmetične izdelke shranjujemo pri sobni temperaturi, nekatere tudi v vlažnem okolju naše kopalnice ter jih med uporabo večkrat odpiramo ali celo posegamo vanje z nečistimi rokami, lahko zelo hitro pride do okužbe izdelka. Izbira ustreznega protimikrobnega sredstva je kompleksen proces, saj je potrebno upoštevati njegovo učinkovitost, koncentracijo, kompatibilnost z ostalimi sestavinami in cenovno dostopnost. Idealen konzervans širokospektralno uspešno zaščiti izdelek že v zelo majhnih koncentracijah. Klasične konzervanse v kozmetiki in drugih panogah uspešno uporabljamo že vrsto let, vendar pa vse močnejši trend naravne kozmetike povzroča dvome o njihovi varni uporabi in razvija se potreba po naravnih protimikrobnih sestavinah, ki bi lahko v celoti nadomestile uporabo klasičnih konzervansov. V skladu s kozmetično zakonodajo je za vsak kozmetični izdelek, preden se pojavi na tržišču, potrebno izvesti izzivni preizkus učinkovitosti konzervansa, s katerim moramo preveriti, ali je izdelek ustrezno zaščiten pred mikrobiološko okužbo. V sklopu tovrstnih raziskav smo v tem diplomskem delu pripravili enostavne emulzije, ki so vsebovale dve različni koncentraciji štirinajstih naravnih protimikrobnih snovi: zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola, dehidroocetno kislino, salicilno kislino, levulinsko kislino, sorbinsko kislino, glicerilkaprilat, janeževo kislino, fenoksietanol, filtrat fermenta korenine redkvice, benzojsko kislino, etanol, izvleček semen grenivke, mandljevo kislino in izvleček listov rožmarina. Z izzivnim preizkusom učinkovitosti konzervansa smo preverili, ali so izbrane protimikrobne snovi ustrezno zaščitile pripravljene emulzije pred mikrobiološko okužbo z bakterijo *Staphylococcus aureus*. Pri izvedbi preizkusa smo sledili smernicam standarda ISO 11930. Izkazalo se je, da so emulzije pred *Staphylococcus aureus* zaščitile vse izbrane snovi z izjemo levulinske kisline. Gledano širokospektralno, pa nobena izmed snovi ni ustrezno zaščitila pripravljenih emulzij, saj smo že vizualno opazili razrast plesni na površini nekaterih emulzij, ter tudi na gojišču so bile prisotne kolonije tujih mikroorganizmov. Po razmisleku smo ugotovili, da je bil vzrok za to uporaba vode neustrezne kakovosti. Pri pripravi emulzij smo uporabili prečiščeno (demineralizirano) vodo iz pipe, vendar njene kakovosti predhodno nismo kontrolirali.

Jasno se je pokazalo, kako pomembno je upoštevati dobro proizvodno prakso in v procesu izdelave zagotoviti čim manjši vnos mikroorganizmov. Konzervans namreč ne sme biti nadomestilo za dobro proizvodno prakso.

KLJUČNE BESEDE: konzervans, ISO 11930, preizkus učinkovitosti konzervansa, naravne protimikrobne sestavine

ABSTRACT

Preservatives are ingredients, used to prevent microbiological contamination of cosmetic and other products. The majority of these products contain water, which is the main factor for growth and development of bacteria, viruses, and fungi. Considering that we usually store cosmetics at room temperature, including in a moist environment such as in the bathroom, opening these products several times during their use as well as reaching into them with impure hands, microbiological contamination may occur rapidly. Selecting the best preservative system is sometimes a complex procedure, as it is necessary to consider its efficacy, concentration, compatibility with other ingredients in the product, and affordability. An ideal preservative is the one, that offers a broad-spectrum protection of the product at a very low concentration. Classic preservatives have been successfully used in cosmetic and other industries for many years, but increasingly powerful trend of natural cosmetics raises doubts about their safe use and a need for natural antimicrobials, which could entirely replace classic preservative, has developed. According to cosmetics legislation, for every cosmetic product on the market it is obligatory to perform antimicrobial efficacy test, which verifies whether the product is adequately protected against microbiological contamination. In context of such research, we prepared simple emulsions by using two different concentrations of 14 natural antimicrobials: a mixture of Dehydroacetic Acid and Benzyl Alcohol, Dehydroacetic Acid, Salicylic Acid, Levulinic Acid, Sorbic Acid, Glyceryl Caprylate, p-Anisic Acid, Phenoxyethanol, Leuconostoc/Radish Root Ferment Filtrate, Benzoic acid, Alcohol Denat., Citrus Grandis Seed Extract, Mandelic Acid and Rosmarinus Officinalis Extract. Performing the antimicrobial efficacy test, we checked, whether the selected preservatives successfully protected our emulsions against bacteria *Staphylococcus aureus*, following ISO 11930

guidelines. Results showed that all of the selected preservatives successfully protected emulsions against *Staphylococcus aureus*, except levulinic acid. From a broad-spectrum view, none of the selected antimicrobials adequately protected the emulsions. For certain emulsions it was possible to visually see the growth of mold on top, also in most plates numerous colonies of other microorganisms were present. We discovered the cause of this was the use of water of unsuitable quality . For the preparation of emulsions we used purified (demineralised) water from the tap, but its quality was previously not inspected. This clearly shows, how important it is, to work in accordance with good manufacturing practice to ensure the lowest possible input of microorganisms. Preservative should not be a substitute for good manufacturing practice.

KEYWORDS: preservative, ISO 11930, challenge test of preservation efficacy, natural antimicrobial ingredients

SEZNAM OKRAJŠAV

ASEAN - Združenje jugovzhodnih azijskih narodov (*Association of Southeast Asian Nations*)

Cfu - Število enot, ki tvorijo kolonije (*colony forming units*)

Ph. Eur. 8 - Evropska farmakopeja 8. izdaja (*European Pharmacopoeia 8th Edition*)

ISO - Mednarodna organizacija za standardizacijo (*International Organization for Standardization*)

Ph. Eur. 8 - Evropska farmakopeja 8. izdaja (*European Pharmacopoeia 8th Edition*)

SCCS - Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (*Scientific Committee on Consumer Safety*)

T7 - Časovna točka preizkusa učinkovitosti konzervansa 7 dni po inokulaciji

T14 - Časovna točka preizkusa učinkovitosti konzervansa 14 dni po inokulaciji

T28 - Časovna točka preizkusa učinkovitosti konzervansa 28 dni po inokulaciji

TSA - gojišče Trypton-soja-agar (*tryptic soy agar*)

USP – Ameriška farmakopeja (*United States Pharmacopoeia*)

1. UVOD

Konzervansi so pomembne sestavine mnogih izdelkov v živilski, farmacevtski in kozmetični industriji ter v mnogih drugih panogah. So protimikrobna sredstva, ki izdelek ščitijo pred mikrobiološko okužbo in razrastom mikroorganizmov. Kot vemo, so številni mikroorganizmi v našem okolju stalno prisotni, a ne povzročajo težav. Problematični lahko postanejo, če se preveč razmnožijo ali pa v naše okolje vdrejo patogeni mikroorganizmi. Ti imajo lahko resne neželene učinke na naše zdravje.

1.1. MIKROBIOLOŠKA OKUŽBA

1.1.1. MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi, ki lahko povzročijo okužbo, so bakterije, virusi in plesni. Bakterije so lahko okrogle (koki), paličaste (bacili) ali spiralne (spirohete) oblike. Z metodo barvanja bakterije delimo na grampozitivne in gramnegativne. Te se razlikujejo glede na privzem barvila zaradi razlik v sestavi celične stene. Grampozitivne bakterije se pri preizkusu obarvajo temno modro ali temno vijoličasto. Njihova celična stena je sestavljena iz številnih peptidoglikanskih plasti in teihoične kisline. Znani predstavniki te vrste bakterij so streptokoki in stafilokoki. Gramnegativne bakterije, kot je npr. *Escherichia coli*, pa se pri preizkusu obarvajo rožnato. Njihova celična stena vsebuje le eno plast peptidoglikana in zunanjo membrano z lipopolisaharidi (1, 2). Največji pomen za rast mikroorganizmov imajo voda, pH in temperatura. Deloma lahko rast mikroorganizmov nadzorujemo s temi tremi dejavniki, večinoma pa to ne zadostuje in moramo poseči po protimikrobnih sredstvih (3). Najbolj problematični so torej izdelki, ki vsebujejo veliko vode. Včasih je lahko voda, ki jo uporabimo za izdelavo izdelka, celo vir okužbe. Običajno za izdelavo uporabljamo prečiščeno vodo visoke kakovosti, a ta se lahko okuži v procesu izdelave, v ceveh in pipah. Naravne sestavine, ki se v skladu s trendom vse pogosteje pojavljajo v kozmetiki, so veliko bolj podvržene razgradnji z mikrobi kot sintezne in tako pripomorejo k okužbi (4).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus je fakultativna anaerobna grampozitivna bakterija v obliki kokov, ki tvori okrogle, gladke in rumeno obarvane kolonije. Pripada družini *Staphylococcaceae*.

Staphylococcus aureus je običajno prisotna v nosni sluznici in na koži (5). Spada med oportunistične patogene, kar pomeni, da običajno ne povzroča težav, razen če vstopi v telo. V tem primeru lahko povzroči razvoj bolezni, kot so npr. kožne lezije, pljučnica, osteomielitis, endokarditis, okužbe urinskega trakta in še bi lahko naštevali. Nekateri sevi te bakterije so razvili odpornost na antibiotike in s tem povzročajo resne težave (6).

1.1.2 POSLEDICE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE

Ob okužbi izdelka mikroorganizmi metabolizirajo kozmetične sestavine, se namnožijo in povzročijo različne spremembe v izdelku (4):

- *TOKSIČNE UČINKE*: Določene vrste mikroorganizmov proizvajajo toksične molekule, ki so lahko škodljive za izdelek ali celo uporabnika. Endotoksini so sestavljeni iz lipopolisaharidov in so tesno vezani na celično steno bakterije. Veliko bolj škodljivi so eksotoksini, ki so slabše vezani na celično steno in so sestavljeni iz proteinov. Pogosto teh sprememb vizualno ni moč opaziti. Poleg tega lahko v metabolnem procesu sestavin ti mikrobi proizvajajo tudi organske kisline in amine, ki so sicer lahko škodljivi za človeka, a v zelo velikih koncentracijah. Nenazadnje pa lahko nekateri mikrobiološki metaboliti povzročijo tudi draženje kože ali preobčutljivostne reakcije (4).
- *SPREMEMBE UČINKOV KOZMETIČNEGA IZDELKA*: Omenili smo že možnost, da ob mikrobiološki kontaminaciji pride do razgradnje kozmetičnih sestavin, če se razgradijo npr. površinsko aktivne snovi, to lahko vodi do fizikalne nestabilnosti sistema. Če se razgradijo tudi kozmetično aktivne sestavine, to lahko vodi v spremembo učinkov ali v popolno izgubo učinkov teh sestavin in s tem izdelka (4).
- *SPREMEMBE ORGANOLEPTIČNIH LASTNOSTI*: Kadar vizualno opazimo, da so se v izdelku zgodile spremembe, je precej verjeten vzrok za to mikrobiološka okužba. Pri tekočih izdelkih se najpogosteje pojavita motnost in usedlina, medtem ko pri poltrdnih in trdnih izdelkih na površini razrastejo kolonije, ki so pogosto obarvane.

Prav tako se lahko spremeni barva celotnega izdelka, bodisi zaradi spremembe pH ali drugih dejavnikov, povzročenih z metabolno aktivnostjo mikroorganizmov. Kadar se na površini izdelka pojavijo mehurčki, je to lahko znak, da mikroorganizem pri svojem metabolizmu proizvaja tudi plin v količini, ki ni več topna v izdelku. Nastanejo lahko tudi druge vidne spremembe, kot so na primer heterogenost izdelka, razplastitev emulzij in sprememba viskoznosti (4). Med glavne opozorilne znake verjetno spada vonj izdelka. V kozmetiki je namreč le-ta zelo pomemben za uporabnika. Številne bakterije in plesni proizvajajo snovi neprijetnega vonja. Pri nekaterih izdelkih, kot so npr. balzami za ustnice ali šminke, lahko pri okužbi opazimo tudi spremembo okusa. Tekstura izdelka je v kozmetiki prav tako zelo pomembna in njene spremembe je moč hitro opaziti. Kadar npr. naša krema postane grudasta ali se spremeni njena mazljivost, je krivec za to lahko mikrobiološka okužba (4).

1.1.3. PREPREČEVANJE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE

Upoštevati moramo, da kozmetične izdelke uporabljamo v naši vsakodnevni rutini. Pretežno jih shranjujemo v kopalnici, ki predstavlja vlažno in toplo okolje, idealno za razrast mikroorganizmov. Poleg tega mnoge izdelke uporabljamo tudi večkrat dnevno, jih odpiramo in posegamo vanje z nečistimi rokami. Pri tem mora izdelek do konca svojega roka uporabe ostati povsem varen za uporabnika, torej mora biti učinkovito zaščiten pred mikrobiološko okužbo (3). Ko je kozmetični izdelek pripravljen za izdajo na tržišče, mora v skladu z Uredbo o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 izpolnjevati določene kriterije mikrobiološke ustreznosti:

- 1 g ali 1 ml vzorca kozmetičnega izdelka ne sme vsebovati več kot 1000 aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (7).
- 1 g ali 1 ml vzorca kozmetičnega izdelka, ki je namenjen otrokom, mlajšim od treh let ali za uporabo na predelu kože okoli oči ali sluznici, ne sme vsebovati več kot 100 aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (7).
- Izdelki ne smejo vsebovati naslednjih mikroorganizmov: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans* (7).

Za nastanek varnega in kakovostnega kozmetičnega izdelka je poleg ustrezne izbire konzervansa pomembnih več dejavnikov:

- *DOBRA PROIZVODNA PRAKSA*: V skladu z Uredbo o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 morajo biti kozmetični izdelki proizvedeni po navodilih dobre proizvodne prakse (GMP), ki jo definira standard ISO 22716. Dobra proizvodna praksa zajema skupek pogojev in dejavnikov, ki preprečujejo, da bi se izdelek v procesu izdelave okužil, in zajema primerno usposobljeno in opremljeno osebje, vodenje pripadajoče administracije, aseptične prostore in dezinficiran pribor ter kakovostne in mikrobiološko testirane vhodne surovine (8).
- *USTREZNA IZBIRA OVOJNINE*: Tudi ovojnina ima pomemben vpliv na stabilnost in kakovost izdelka. Najboljši so seveda vsebniki za enkratno uporabo, a ti so pri kozmetičnih izdelkih bolj izjema kot pravilo. Vsebniki s potisnikom ali tube izdelek veliko bolje zaščitijo pred okužbo kot pa recimo lončki, v katere med uporabo večkrat posežemo z rokami (8).
- *AKTIVNOST VODE*: Mikroorganizmi za svojo rast in razvoj potrebujejo vodo, zato lahko s formulacijami z manjšo vsebnostjo vode deloma nadzorujemo mikrobiološko rast. »Aktivnost vode opisuje količino biološko dostopne vode v kozmetični formulaciji. Opredeljuje jo primerjava med parnim tlakom formulacije, ki vsebuje vodo, in parnim tlakom čiste vode« (8). Različne vrste mikroorganizmov imajo različno toleranco aktivnosti vode. Največ vode namreč potrebujejo prav bakterije, najmanj pa plesni. Aktivnost vode lahko z določenimi sestavinami znižamo. V ta namen najpogosteje uporabljamo 20-odstotni (w/w) glicerol ali sorbitol, ki pa v velikih koncentracijah povzroča lepljiv občutek na koži (8).
- *FORMULACIJA*: Z izbiro nosilnega sistema kozmetičnega izdelka lahko deloma vplivamo na okužbo in mikroorganizmom postavljamo ovire za rast in razvoj. Kot smo že omenili, so najbolj problematične vodne raztopine in emulzije tipa o/v, a to nikakor ne pomeni, da ob izbiri drugih sistemov konzervirnih sredstev ni potrebno uporabiti (8).

- *pH*: pH spada med pomembnejše dejavnike nadzovanja mikrobiološke rasti, saj potrebuje vsak mikroorganizem za rast in razvoj optimalen pH svojega okolja. Večinoma so krivci za mikrobiološko okužbo v kozmetiki tisti, ki tolerirajo bolj nevtralen pH, čeprav lahko nekatere plesni preživijo tudi ekstremne razmere. Izdelki z zelo nizkim ali zelo visokim pH so tako manj dovzetni za okužbo (npr. barve za lase) (8).

1.2. KONZERVANSI

Spoznali smo torej, da so protimikrobna sredstva v večini primerov nepogrešljivi del kozmetičnega izdelka, vendar je njihova izbira precej težavna. Idealen konzervans mora namreč biti kompatibilen s celotnim izdelkom, z vsemi sestavinami in ovojnino, varen za uporabnika, stabilen in učinkovit proti širokem spektru kontaminantov pri čim manjši koncentraciji, brez vonja in barve ter mora ustrezati regulativi. Seveda pomembno vlogo pri izbiri igrajo tudi cena, dostopnost in vpliv na okolje. Na mikrobiološko stabilnost pa seveda vplivajo tudi kakovost izhodnih surovin, razmere shranjevanja in uporabe, ovojnina in rok uporabe izdelka (3).

1.2.1. KLASIČNI KONZERVANSI

Z izrazom klasični konzervansi običajno označujemo tiste konzervanse, ki jih v kozmetiki uspešno uporabljamo že vrsto let. V prilogi V Uredbe o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 se nahaja seznam dovoljenih konzervansov v kozmetičnih izdelkih ter njihova največja koncentracija, dovoljena v izdelku (9). Med najpogosteje uporabljane spadajo estri *p*-hidroksibenzojske kisline oz. parabeni, izotiazolinoni, organske kisline in soli, alkoholi, kelirajoča sredstva ter konzervansi, ki sproščajo formaldehid. Gotovo je njihova največja prednost ta, da so že uveljavljeni in tudi širokospektralno učinkoviti v boju z mikrobiološko okužbo. Žal pa so zlasti v zadnjih letih pod drobnogled prišle njihove domnevno negativne lastnosti. Pogosto so namreč vzrok za nastanek draženja kože in razvoj preobčutljivostnih reakcij pri uporabnikih. Značilen primer so konzervansi, ki sproščajo formaldehid, kot je npr. diazolidinil-sečnina. Tudi izotiazolinoni so se izkazali za vzrok številnih preobčutljivostnih reakcij (9). Parabeni, ki jih v farmaciji in kozmetiki uporabljamo že skoraj 100 let (10), so pred leti postali tarča podrobnejšega preiskovanja,

zaradi potencialne šibke estrogene aktivnosti. Uredba o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 dovoljuje njihovo uporabo v maksimalni koncentraciji 0,4 % za posamezen paraben in 0,8 % za zmes parabenov. V dolgih letih njihove uporabe so parabene z vidika varnosti večkrat podrobneje obravnavali, zlasti v zvezi z njihovim endokrinim (estrogenim) vplivom. Dovoljene vrednosti uporabe metil- in etilparabena v kozmetičnih izdelkih še vedno ostajajo enake, saj ju ne smatramo za potencialno nevarni snovi. SCCS prav tako meni, da je uporaba butilparabena in propilparabena povsem varna, če ne presegata koncentracije 0,19 %. Do drugačnih zaključkov do sedaj še niso prišli, saj nedvoumnih znanstvenih dokazov, ki bi potrdili nevarnost parabenov z daljšo verigo, še vedno ni. Metilparaben pa je prisoten tudi v naravi, in sicer v borovnicah, zato sodi med naravne konzervanse (11, 12).

1.2.2. TEŽNJA PO NARAVNIH KONZERVANSIH

Svoj delež k vse večji uperjenosti proti uporabi klasičnih konzervansov nedvomno prispeva naraščajoči trend po naravni kozmetiki in naravnih sestavinah oz. t.i. kozmetiki brez konzervansov. Da bi se lahko povsem izognili uporabi protimikrobnih sredstev v kozmetičnih izdelkih, bi morala proizvodnja potekati povsem sterilno in izdelek bi moral biti polnjen v vsebnikih za enkratno uporabo. A takšen izdelek imel za posledico previsoko ceno. Na tržišču se sicer že pojavljajo izdelki, ki so označeni z izrazom »brez konzervansov«, a to pomeni le, da ne vsebujejo konzervansov, ki so kot protimikrobna sredstva klasificirani v prilogi V Uredbe o kozmetičnih izdelkih 1223/2009, pač pa sestavine, ki imajo med drugimi ugodnimi učinki na kožo tudi protimikrobno delovanje (8). Mednje spadajo tudi protimikrobne sestavine, ki smo jih preizkušali v tej diplomski nalogi:

- **ORGANSKE KISLINE IN NJIHOVI MONOESTRI:** Predstavniki so salicilna kislina, dehidroocetna kislina, benzojska kislina in sorbinska kislina. Te se nahajajo tudi v naravi in so že uvrščene na seznam dovoljenih konzervansov v prilogi V Uredbe o kozmetičnih izdelkih 1223/2009. Dehidroocetno kislino kot konzervans pogosto uporabljamo tako v kozmetični kot v prehrambeni industriji (13). Salicilna kislina spada med beta hidroksi kisline in jo najbolj poznamo po njenih keratolitičnih lastnostih ter učinkovitosti v boju proti aknam (14). Sorbinska kislina je varen konzervans, ki pa naj bi deloval proti manjšemu številu mikroorganizmov, saj ga večje število mikroorganizmov lahko celo metabolizira (15).

Benzojska kislina pa poleg svojih protimikrobnih lastnosti v kozmetiki služi tudi kot dišava in sredstvo za uravnavanje pH izdelka (16). Poleg teh smo v diplomskem delu preizkušali tudi tri med konzervanse še neuvrščene naravne organske kisline. Levulinsko kislino v kozmetiki uporabljamo kot dišavo in emolient (17), pridobivamo pa jo lahko iz lesa in ogljikovih hidratov (18). Janeževa kislina je organska kislina, ki se nahaja v številnih rastlinah, kot npr. v koromaču. Uporabljamo jo kot dišavo, predvsem z namenom prekrivanja vonja drugih sestavin. Spada med šibke kisline in pomaga vzdrževati zaščitni kisel plašč kože, s tem pa deloma brani tudi pred bakterijami in virusi (19). Kar zadeva protimikrobno učinkovanje, naj bi janeževa kislina delovala predvsem fungicidno, v kombinaciji z baktericidom pa bi lahko povsem nadomestila klasične konzervanse (19). Mandljeva kislina spada med alfa hidroksi kisline, ki jih v kozmetiki uporabljamo že vrsto let. Glavno vlogo igrajo predvsem v procesu kemičnega luščenja, a številne imajo tudi druge pozitivne lastnosti. Lipofilna mandljeva kislina npr. deluje proti mastni koži, pomembne pa so tudi njene protimikrobne lastnosti, zaradi katerih so jo nekdanje uporabljali za zdravljenje okužb urinskega trakta (20, 21). Glicerilkaprilat pridobivamo s hidrolizo in esterifikacijo iz čistih rastlinskih materialov, navadno kokosovega olja in palmovega olja iz semen. Zaradi svoje strukture je izredno učinkovit pri vlaženju kože, pa tudi pri dostavljanju lipidov v kožo, zahvaljujoč svoji amfifilni strukturi. Izkazuje tudi močno protimikrobno učinkovitost v boju s *Propionibacterium acne*, ki so odgovorne za nastanek aken (22).

- ALKOHOLI: Fenoksietanol kot konzervans v kozmetiki uporabljamo precej krajši čas kot npr. parabene, a je njegova uporaba v zadnjem času narasla, predvsem zaradi trenda, ki parabenom išče zamenjavo. V dovoljeni koncentraciji 1% ima nizek potencial za povzročanje preobčutljivostnih reakcij (23, 11). Fenoksietanol, ki je prisoten v kozmetičnih izdelkih, je običajno sinteznega izvora, vendar ga najdemo tudi v čajevcu (23). Benzilalkohol uporabljamo kot protimikrobno sredstvo, topilo in dišavo. Naravno prisoten je v nekaterih vrstah sadja, kot so npr. kokos, marelice, brusnice, najdemo pa ga tudi v eteričnem olju jasmína, hijacinte in ilanga (16). Oba sta uvrščena na seznam dovoljenih konzervansov v prilogi V Uredbe o kozmetičnih izdelkih 1223/2009.

Etanol je ena izmed najpogosteje uporabljenih sestavin v kozmetični industriji, ki jo lahko pridobivamo naravno ali sintezno. V naravni in ekološki kozmetiki uporabljamo le etanol, pridobljen iz rastlinskega materiala. Lahko znatno pripomore k protimikrobni zaščiti, a le v velikih koncentracijah, ki pa so dražeče in kožo izsušijo (24).

- **PROTIMIKROBNI PEPTID:** Protimikrobna učinkovitost filtrata bakterijskega (*Leuconostoc kimchii*) fermenta korenine redkvice (*Raphanus sativus*) izhaja iz naravnih mehanizmov, s katerimi se rastline in mikroorganizmi zavarujejo pred nevarnostmi iz okolja. Filtrat sestavlja protimikrobni peptid, ki ga proizvajajo iz mlečnokislinske bakterije (25).

- **ETERIČNA OLJA IN RASTLINSKI IZVLEČKI:** Eterična olja so aromatične lipofilne zmesi iz različnih rastlinskih delov, ki jih najpogosteje pridobivamo s parno destilacijo. Rastlinski izvlečki pa so zmesi spojin, ki jih pridobivamo s pomočjo različnih tehnik in topil (8). V zadnjem času se je skupaj s trendom naravne kozmetike njihova uporaba močno razmahnila. V številnih raziskavah so že v preteklosti izkazali ugodne učinke na koži, mnogi izmed njih imajo antioksidativne, negovalne, protivnetne, adstringentne in druge ugodne lastnosti, v zadnjem času pa je v ospredje prišla tudi njihova protimikrobna učinkovitost. Do zdaj so namreč rastlinske izvlečke in eterična olja raziskovali in uporabljali le z vidika spodbujanja delovanja drugih protimikrobnih sredstev, v zadnjih letih pa se raziskovalci ukvarjajo z vprašanjem, ali bi lahko ti v celoti nadomestili uporabo že dolgo uveljavljenih klasičnih konzervansov, med katerimi so nekateri povzročitelji neželenih reakcij. Težava je v tem, da te spojine pogosto delujejo na mnogo ožji spekter mikroorganizmov kot klasični konzervansi. Pa ne le to, imajo tudi potencial za povzročitev preobčutljivostnih reakcij. Poleg tega imajo nekatere zelo močen vonj, ki ga je težko prekriti z drugimi sestavinami v izdelku (8). Izvleček semen grenivke pridobivamo iz grenivkinih semen. Vsebuje polifenole in flavonoide, ki naj bi imeli poleg svojih antioksidativnih lastnosti tudi protimikrobno učinkovitost (26). V lipidih topni izvleček listov rožmarina vsebuje diterpene, ki imajo ugodno antioksidativno in protimikrobno delovanje (27).

1.3. TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

Preden kozmetični izdelek pride na tržišče, mora imeti v skladu z Uredbo o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 pripravljen varnostni list, ki zajema tudi podatke o mikrobiološki kakovosti. Proizvajalec mora namreč preveriti, ali izbrani konzervans in njegova koncentracija ustrezno zaščitita izdelek pred mikrobiološko okužbo (9). Proizvajalec izvede t. i. izzivni preizkus učinkovitosti konzervansa, za katerega je na voljo več različnih smernic. Glavni princip preizkusa je priprava inokuluma z določenim številom določene vrste mikroorganizma, s katerim okužimo testirani kozmetični izdelek. Ob določenih časovnih točkah (7, 14, 21, 28 dni) preverjamo število preživelih mikroorganizmov v okuženem izdelku (28).

Za testiranje učinkovitosti naših izbranih protimikrobnih učinkovin smo se v diplomskem delu ravnali po standardu ISO 19930. V nadaljevanju bomo primerjali nekaj smernic in preizkusov, ki so na voljo za izzivni preizkus: smernice ISO 11930, smernice Znanstvenega odbora za varstvo potrošnikov (SCCS), preizkus Schülke KoKo, smernice Evropske farmakopeje, smernice Ameriške farmakopeje, smernice združenja ASEAN. Vse omenjene smernice in preizkusi vključujejo testiranje na mikroorganizmih *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans*, ki v kozmetičnih izdelkih ne smejo biti prisotni. Glede na smernice SCCS je priporočljivo izdelke testirati tudi za ostale specifične mikrobo, ki so znani povzročitelji okužb kozmetičnih izdelkov, medtem ko preizkusi po ISO 11930, Evropska farmakopeja, Ameriška farmakopeja in ASEAN uporabljajo le patogene mikroorganizme. Le preizkus Schülke KoKo povsem ustreza priporočilom SCCS saj, kot je razvidno iz preglednice I, predpostavlja poleg zgoraj navedenih treh mikroorganizmov tudi testiranje na mnogih drugih pogostih povzročiteljih okužb kozmetičnih izdelkov (28). Pri pripravi inokuluma so si metode precej podobne. Mikroorganizme speremo z gojišč in z redčenjem pridobimo začetno koncentracijo inokuluma. Tega nato uporabimo neposredno na vzorcih izdelka. Preizkus Schülke KoKo za razliko od ostalih uporablja mešane suspenzije kultur, kar pomeni, da posamezno gojene mikroorganizme zmešamo v suspenziji. Sledi inokulacija vzorcev. Tudi tu se ta preizkus razlikuje od ostalih, saj pri njem izdelka ne inokuliramo enkrat, ampak šestkrat. Po koncentraciji mikroorganizmov v kozmetičnem izdelku so si, kot je razvidno iz

preglednice II, smernice dosti podobne (28).

Na manjše razlike med omenjenimi metodami naletimo pri kriterijih sprejemljivosti, kot je razvidno iz spodnjih preglednic III, IV, V, VI in VII. V splošnem je pomembno, da se število prisotnih mikroorganizmov v okuženem izdelku zmanjša in ne naraste. Opazujemo logaritemsko vrednost R , ki je s številom prisotnih mikrobov povezana z enačbo: $R_x = \lg N_0 - \lg N_x$; pri čemer je N_0 število mikroorganizmov, prisotnih v izdelku ob okužbi, in N_x število mikroorganizmov, prisotnih v izdelku ob izbrani časovni točki. Kriteriji za število R so različni glede na različne smernice (28). Za standard ISO 110930 in preizkus Schülke KoKo velja, da v kolikor formulacija zadosti pogojem kriterija A, je izdelek ustrezno zaščiten pred mikrobiološko okužbo. Če pa zadosti pogojem B, je potrebno analizirati tudi ostale dejavnike, ki pripomorejo k zaščiti izdelka pred okužbo (npr. ovojna). Pri Evropski farmakopeji kriterij A predstavlja priporočljivo učinkovitost konzervansa, a v primeru, da zaradi možnosti pojava neželenih učinkov ne moremo doseči kriterija A, zadostuje tudi kriterij B. Preizkusa po ASEAN in Ameriški farmakopeji pa predpostavljata samo en kriterij, ki zajema vrednosti, ki jih moramo doseči, da lahko izdelek smatramo za učinkovito zaščitenega (28). Med procesom mora konzervans seveda ostati stabilen, da lahko učinkovito opravlja svojo nalogo. Pri smernicah SCCS je navedeno, da ni dovolj, da testiramo le sveže pripravljen izdelek, saj se lahko med shranjevanjem in v času roka uporabe izdelka določene kozmetično aktivne sestavine inaktivirajo ali razgradijo pri določenih pH vrednostih. ISO 11930 ne dodaja nikakršnih predlogov glede tega, prav tako ne Ameriška farmakopeja in ASEAN. Preizkus Schülke KoKo temelji na šestkratni inokulaciji, ki že sama vključuje tudi preverjanje stabilnosti konzervansa. Šesta inokulacija se namreč zgodi pri šest tednov starem vzorcu in v praksi se je izkazalo, da je to zadostno obdobje za zagotavljanje mikrobiološke kakovosti. Evropska farmakopeja določa, da moramo analizirati protimikrobno učinkovitost v času celega obdobja shranjevanja (28). ISO 11930 je relativno nov med standardi, ki jih uporabljamo za testiranje protimikrobne učinkovitosti. Glede na kriterije je manj strog kot smernice Evropske farmakopeje in preizkus Schülke KoKo. Preizkus po ASEAN je primerljiv standardu ISO 11930, medtem ko preizkus po Ameriški farmakopeji spada med šibkejše standarde (28).

Preglednica I: Mikroorganizmi, ki jih smernice predpostavljajo za testiranje protimikrobne učinkovitosti (28)

Smernica/preizkus	Mikroorganizmi
ISO 11930	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>
SCCS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Specifični znani mikroorganizmi, ki povzročajo degradacijo kozmetičnih izdelkov</i>
Schülke KoKo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Kocuria rhizophila</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Penicillium pinophilum</i>
Ph. Eur. 8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus Brasiliensis</i>
USP 38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus niger</i>
ASEAN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Aspergillus niger</i>

Preglednica II: Število mikroorganizmov in količina inokuluma, ki ga uporabimo za testiranje protimikrobne učinkovitosti (28)

Smernica/preizkus	Vzorec	Količina inokulum	Koncentracija inokuluma	Koncentracija v kozmetičnem izdelku
ISO 11930	20 g/20 ml	1%	10 ⁷ – 10 ⁸ cfu/ml za bakterije 10 ⁶ – 10 ⁷ cfu/ml za glive	10 ⁵ – 10 ⁶ cfu/ml za bakterije 10 ⁴ – 10 ⁵ cfu/ml za glive
Schülke KoKo	25 g	0,4 % za vsako inokulacijo (2,4 % na 6 inokulacij)	10 ⁷ – 10 ⁸ cfu/ml za bakterije 10 ⁶ – 10 ⁷ cfu/ml za glive	2,4×10 ⁵ – 2,4×10 ⁶ cfu/ml za bakterije na 6 inokulacij 2,4.10 ⁴ – 2,4.10 ⁵ cfu/ml za glive na 6 inokulacij
Ph. Eur. 8	Originalni vsebnik	≤1 %	≈10 ⁸ cfu/ml	10 ⁵ – 10 ⁶ cfu/ml
USP 38	Originalni vsebnik	0,5 – 1,0 %	≈10 ⁸ cfu/ml	10 ⁵ – 10 ⁶ cfu/ml
ASEAN	100 g	1 %	≈10 ⁸ cfu/ml za bakterije ≈10 ⁷ cfu/ml za glive	≈10 ⁶ cfu/ml za bakterije ≈10 ⁵ cfu/ml za glive

Preglednica III: Kriterij sprejemljivosti po standardu ISO 11930 (28)

	Kriterij	Zmanjšanje log vrednosti		
		7 dni	14 dni	28 dni
Bakterije	A	≥ 3	≥ 3 + ni povečanja	≥ 3
	B	Ni izveden	≥ 3	≥ 3 + ni povečanja
<i>C. albicans</i>	A	≥ 1	≥ 1 + ni povečanja	≥ 1 + ni povečanja
	B	Ni izveden	≥ 1	≥ 1 + ni povečanja
<i>A. brasiliensis</i>	A	Ni izveden	≥ 0	≥ 1
	B	Ni izveden	≥ 0	≥ 0 + ni povečanja

Preglednica IV: Kriterij sprejemljivosti preizkusa po Schülke KoKo (28)

	Kriterij	Zmanjšanje log vrednosti					
		7 dni	14 dni	21 dni	28 dni	35 dni	42 dni
Bakterije	A	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
	B	≥ 3 *)	≥ 3 *)	≥ 3 *)	≥ 3 *)	≥ 3 *)	≥ 3 *)
Glive	A	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3
	B	≥ 2 *)	≥ 2 *)	≥ 2 *)	≥ 2 *)	≥ 2 *)	≥ 2 *)

*) zelo majhno število naraščanja bakterij do 6. cikla

Preglednica V: Kriterij sprejemljivosti po Evropski farmakopeji (28)

	Kriterij	Zmanjšanje log vrednosti			
		2 dni	7 dni	14 dni	28 dni
Bakterije	A	2	3	-	Ni povečanja
	B	-	-	3	Ni povečanja
Glive	A	-	-	-	Ni povečanja
	B	-	-	-	Ni povečanja

Preglednica VI: Kriterij sprejemljivosti po Ameriški farmakopeji (28)

	Zmanjšanje log vrednosti	
	14 dni	28 dni
Bakterije	> 2	Ni povečanja
Glive	Ni povečanja	Ni povečanja

Preglednica VII: Kriterij sprejemljivosti po ASEAN (28)

	Zmanjšanje log vrednosti			
	7 dni	14 dni	21 dni	28 dni
Bakterije	> 3	Ni povečanja	Ni povečanja	Ni povečanja
Glive	Ni povečanja	Ni povečanja	Ni povečanja	> 1

2. NAMEN DELA

Kozmetično tržišče je preplaval trend kozmetike z naravnimi sestavinami, ki mu sledi vse večje število potrošnikov in posledično tudi proizvajalcev, ki seveda želijo uporabnikom ponuditi izdelke v skladu z njihovimi željami in potrebami. Težnja po kozmetičnih izdelkih, ki ne bi vsebovali konzervansov, oziroma bi vsebovali le konzervanse naravnega izvora, je spodbudila podrobnejše preučevanje že uporabljenih kozmetičnih sestavin naravnega izvora, ki poleg ugodnih kozmetičnih lastnosti izkazujejo tudi potencialno protimikrobno delovanje in bi morda lahko nadomestile uporabo klasičnih sinteznih konzervansov.

V sklopu našega diplomskega dela bomo izvedli izzivni preizkus protimikrobne učinkovitosti štirinajstih različnih sestavin naravnega izvora. Pripravili bomo 14 enostavnih emulzij, ki bodo vsebovale minimalno dovoljeno oziroma priporočeno koncentracijo protimikrobne snovi ter 14 enostavnih emulzij s koncentracijo protimikrobne snovi, ki je polovica največje dovoljene oziroma priporočene. Protimikrobne snovi, ki jih bomo uporabili so: zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola, dehidroocetna kislina, salicilna kislina, levulinska kislina, sorbinska kislina, glicerilkaprilat, janeževa kislina, fenoksietanol, filtrat fermenta korenine redkvice, benzojska kislina, etanol, izvleček semen grenivke, mandljevo kislino in izvleček listov rožmarina. Naš cilj bo preveriti, ali bodo izbrani konzervansi pripravljene emulzije protimikrobno ustrezno zaščitili pred mikroorganizmom *Staphylococcus aureus*, in če, pri kateri koncentraciji. Opazovali bomo tudi, ali bodo izbrane protimikrobne snovi emulzije zaščitile tudi pred drugimi mikroorganizmi. Izzivni preizkus bomo izvedli glede na smernice standarda ISO 11930. Zanima nas, če bodo izbrane protimikrobne sestavine izpolnile pogoje za kriterij A ali B, ki jih predpisuje standard ISO 11930.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Za pripravo kozmetičnih izdelkov smo uporabili:

Preglednica VIII: Sestavine pripravljenih kozmetičnih emulzij

Sestavina	INCI	Funkcija navedena v podatkovni zbirki CosIng	Proizvajalec
Voda	<i>Aqua</i>	Topilo	
Karitejevo maslo	<i>Butyrospermum Parkii</i> <i>Butter</i>	Sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože, uravnavanje viskoznosti	Baccararose
Mandljevo olje	<i>Prunus Amygdalus</i> <i>Dulcis</i>	Sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože	LL
Cetostearol	<i>Cetearyl Alcohol</i>	Emolient, emulgator, sredstvo za penjenje, motnenje, površinsko aktivna snov, uravnavanje viskoznosti	Aliacura
Cetearil glukozid	<i>Cetearyl Glucoside</i>	Emulgator, površinsko aktivna snov	Alexmo
Glicerol 85 %	<i>Glycerin</i>	Denaturant, sestavina za ohranjanje zdravega stanja las, vlažilec, prekrivanje vonja, nega ustne votline, dišava, zaščita kože, uravnavanje viskoznosti	Pharmachem Sušnik
Ksantan	<i>Xanthan Gum</i>	Vezava, emulgiranje, stabilizacija emulzij, tvorba gela, sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože, površinsko aktivna snov, uravnavanje viskoznosti	Baccararose
Mlečna kislina 90 %	<i>Lactic Acid</i>	Sestavina za ohranjanje pH kozmetičnega izdelka, vlažilec, sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože	Fluka
Natrijev hidrogenkarbonat 9 %	<i>Sodium Bicarbonate</i>	Abraziv, sestavina za ohranjanje pH kozmetičnega izdelka, deodorant, nega ustne votline, zaščita kože	Riedel-De Haën

Preglednica IX: Izbrane protimikrobne sestavine naravnega izvora

Sestavina	INCI	Funkcija navedena v podatkovni zbirki CosIng	Proizvajalec	Največja dovoljena/priporočena koncentracija
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	<i>Benzyl Alcohol, Dehydroacetic Acid, Aqua</i>	Dehidroocetna kislina: konzervans. Benzilalkohol: Konzervans, dišava, topilo, uravnavanje viskoznosti.	MANSKE GmbH	0,2–0,8 % (proizvajalec)
Dehidroocetna kislina	<i>Dehydroacetic Acid</i>	Konzervans	Sigma-Aldrich	0,6 % (9)
Salicilna kislina	<i>Salicylic Acid</i>	Sredstvo proti prhljaju, sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože in las, keratolitično delovanje, prekrivanje vonja, konzervans	Kemika	0,5 % (9)
Levulinska kislina	<i>Levulinic Acid</i>	Dišava, sestavina za ohranjanje zdravega stanja kože	Sigma-Aldrich	/
Sobinska kislina	<i>Sorbic Acid</i>	Konzervans	Caelo	0,6 % (9)
Glicerilkaprilat	<i>Glyceryl Caprylate</i>	Emolient, emulgiranje	Aliacura	0,3–1,0 % (proizvajalec)
Janeževa kislina	<i>p-Anisic Acid</i>	Prekrivanje vonja	Sigma-Aldrich	0,05–0,3 % (proizvajalec)
Fenoksietanol	<i>Phenoxyethanol</i>	Konzervans	Sigma-Aldrich	1 % (9)
Filtrat fermenta korenine redkvice	<i>Leuconostoc/Radish Root Ferment Filtrate</i>	Sredstvo proti prhljaju, protimikrobno sredstvo	Alexmo cosmetics	/
Benzojska kislina	<i>Benzoic Acid</i>	Polnilo, prekrivanje vonja, konzervans	Caesar & Loretz GmbH	0,5 % (9)
Etanol	<i>Alcohol Denat.</i>	Sredstvo proti penjenju, konzervans, adstringent, prekrivanje vonja, topilo, uravnavanje viskoznosti	Carlo Erba	/

Izvleček semen grenivke	<i>Aqua, Glycerin, Citrus Grandis Seed Extract</i>	Adstringent, dišava, nega kože, tonik	Lekarna Maribor	/
Mandljeva kislina	<i>Mandelic Acid</i>	Protimikrobno sredstvo	Fluka	/
Izvleček listov rožmarina	<i>Rosmarinus Officinalis Extract</i>	Protimikrobno sredstvo, osvežilno sredstvo, tonik	Dragonspice Natur	/
Metilparaben	<i>Methylparaben</i>	Konzervans	Fagron B.V.	0,4 % za posamezen
Propilparaben	<i>Propylparaben</i>	Konzervans, dišava	Caesar & Loretz GmbH	paraben in 0,8 % za zmes parabenov (9)

Pri izvedbi preizkusa smo uporabili:

- *Staphylococcus aureus*, NCTC 10788 CIP4 83, NCIMB9518, NBRC13276, FDA209, WDCM00032; Izvor: Bioball™, proizvajalec bioMerieux
- Rehidracijska tekočina (bioMerieux)
- Natrijev klorid (Sodium Chloride) NaCl M=58,44 g/mol
- Agar (KOB E I pulv ROTH 5210.4)
- Pankreasni hidrolizat kazeina (Bacto™ Tryptone Pancreatic Digest of Casein)
- Hidrolizat soja-kazein (Tryptic Soy Broth (Casein Soya Broth* CASO Broth))
- Nevtralizator Eugon LT 100 (LT 100 Broth Bouillon LT 100)

Sestava:

	g/L
• Pankreasni hidrolizat kazeina (Tryptone)	15,0
• Papainski hidroizat soje (Soy Peptone)	5,0
• Natrijev klorid (Sodium Chloride)	4,0
• Glukoza (Glucose)	5,5
• Lecitin (Lecithin)	1,0
• Polisorbat 80 (Tween 80)	5,0
• Triton X100	1,0
• Natrijev sulfit (Sodium Sulphite)	0,2
• L-cistein (L-Cystine)	0,7

3.2. METODE

3.2.1. PRIPRAVA KOZMETIČNIH IZDELKOV

V prvem koraku smo pripravili emulzije tipa o/v. Skupno smo pripravili 30 izdelkov, ki so vsebovali različne deleže protimikrobnih snovi in vode, ostale sestavine pa so bile pri vseh izdelkih prisotne v enakih deležih. Sestava je razvidna iz preglednic X in XI. Izmed teh emulzij sta bili dve kontroli, in sicer pozitivna kontrola je vsebovala zmes metil- in propilparabena, negativna kontrola pa ni vsebovala protimikrobne snovi.

Preglednica X: Delež sestavin v kozmetičnem izdelku z minimalno koncentracijo konzervansa

[g]	Konzervans	Karitejevo maslo	Mandljevo olje	Cetostearol	Voda	Cetearil glukozid	Glicerol	Ksantan
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	0,2	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6
Dehidroocetna kislina	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6
Salicilna kislina	0,13	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6
Levulinska kislina	0,2	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6
Sorbinska kislina	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6
Glicerilkaprilat	0,3	2	11	0,5	79,8	0,8	5	0,6
Janeževa kislina	0,05	2	11	0,5	80,05	0,8	5	0,6
Fenoksietanol	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6
Filtrat fermenta korenine redkvice	1	2	11	0,5	79,1	0,8	5	0,6
Benzojska kislina	0,13	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6
Etanol	14	2	11	0,5	66,1	0,8	5	0,6
Izvleček semen grenivke	0,1	2	11	0,5	80	0,8	5	0,6
Mandljeva kislina	0,1	2	11	0,5	80	0,8	5	0,6
Izvleček listov rožmarina	0,2	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6

Preglednica XI: Delež sestavin v kozmetičnem izdelku z visoko koncentracijo konzervansa

[g]	Konzervans	Karitejevo maslo	Mandljevo olje	Cetostearol	Voda	Cetearil glukozid	Glicerol	Ksantan
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	0,4	2	11	0,5	79,7	0,8	5	0,6
Dehidroocetna kislina	0,3	2	11	0,5	79,8	0,8	5	0,6
Salicilna kislina	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6
Levulinska kislina	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6
Sorbinska kislina	0,3	2	11	0,5	79,8	0,8	5	0,6
Glicerilkaprilat	0,5	2	11	0,5	79,6	0,8	5	0,6
Janeževa kislina	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6
Fenoksietanol	0,5	2	11	0,5	79,6	0,8	5	0,6
Filtrat fermenta korenine redkvice	1,5	2	11	0,5	78,6	0,8	5	0,6
Benzojska kislina	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6
Etanol	17	2	11	0,5	63,1	0,8	5	0,6
Izvleček semen grenivke	0,5	2	11	0,5	79,6	0,8	5	0,6
Mandljeva kislina	0,3	2	11	0,5	79,8	0,8	5	0,6
Izvleček listov rožmarina	0,4	2	11	0,5	79,7	0,8	5	0,6
Metil- + Propilparaben	(0,07 g MePa + 0,03 g PrPa) 0,1	2	11	0,5	80	0,8	5	0,6
Brez konzervansa	0	2	11	0,5	80,1	0,8	5	0,6

Karitejevo maslo, mandljevo olje in cetostearol smo segreli in stalili v pateni na vodni kopeli pri 80–90 °C. Na električnem kuhalniku smo v čaši na približno enako temperaturo segreli še prečiščeno vodo s cetearil glukozidom, nato pa lipidno fazo združili z vodno fazo ter mešali s paličnim mešalnikom približno 2 minuti. Zatem smo dodali še ksantan, ki smo ga predhodno raztrli v glicerolu in vse skupaj mešali s pestilom do ohladitve. Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola, fenoksietanol, izvleček semen grenivke, izvleček listov rožmarina levulinsko kislino, filtrat fermenta korenine redkvice in etanol smo dodali

na koncu, ostale konzervanse, ki so bili v trdnem stanju in slabo topni v vodi, smo segreli skupaj z lipidno fazo. Po ohladitvi smo izdelke prenesli v sterilne 50-mililitrske plastične centrifugirke. Med delom smo ves pribor in delovne površine večkrat premazali s 70 % etanolom. Uporabljali smo prečiščeno (demineralizirano) vodo. Končnim izdelkom smo pomerili pH z indikatorskimi papirčki in v kolikor je bil le-ta višji od 5,5, smo dodali 90-odstotno mlečno kislino, če pa je bil pH nižji od 5,5, smo dodali natrijev hidrogenkarbonat.

3.2.2. TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

V drugem delu smo izvedli izzivni preizkus učinkovitosti protimikrobnih sredstev za izbrani mikroorganizem *Staphylococcus aureus*. Ravnali smo se po smernicah mednarodnega standarda ISO 11930, ki smo jim sledili med celotnim procesom testiranja konzervansa, z izjemo pridobitve inokuluma na začetku. Inokuluma bakterijskih kultur nismo pridobili sami, kot to narekuje standard, temveč smo uporabili že vnaprej pripravljene kulture (Bioball™). Celoten preizkus je trajal 28 dni in je bil sestavljen iz štirih časovnih točk: 0, 7, 14, 28 dni. V vsaki časovni točki smo sveže pripravili:

- MEDIJ ZA REDČENJE 80 ml

Pankreasni hidrolizat kazeina	0,08 g
NaCl	0,68 g
Voda	80 ml

- NEVTRALIZATOR 180 ml

Gojišče Eugon LT 100	6,73 g
Voda	180 ml

- GOJIŠČE TSA 3x400 ml

Hidrolizat soja-kazein	10 g
Agar	6 g
Voda	400 ml

Praškaste sestavine smo raztopili v vodi in mešali na magnetnem mešalu do homogenosti in avtoklavirali 15 min pri 121 °C ter ohladili. Ob časovni točki 0 smo pripravili inokulum. Bioball smo raztopili v 1,1 ml rehidracijske tekočine in s tem dobili koncentracijo bakterij *Staphylococcus aureus* 10^8 cfu/ml. Odpipetirali smo 975 μ l in redčili z diluentom do 6,5 ml. Dobili smo naš prvi inokulum s koncentracijo $1,5 \times 10^7$ cfu/mL. Okužili smo 20 g vsakega pripravljenelega kozmetičnega izdelka z 200 μ l tega inokuluma, tako da je bila končna koncentracija bakterij v posameznem vzorcu $1,5 \times 10^5$ cfu/ml. Izdelke smo nato hranili v zaprtih centrifugirkah na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo. Ob prvi časovni točki smo izvedli tudi demonstracijo učinkovitosti nevtralizatorja, kot narekuje standard. Nevtralizator je zmes spojin, ki nevtralizira delovanje konzervansa, a hkrati ne zavira rasti preizkušane mikroorganizma. S tem preizkusom smo preizkusili, ali nevtralizator pri desetkratni redčitvi res deluje. Iz zgoraj pripravljenelega inokuluma s koncentracijo 10^8 cfu/mL smo odpipetirali preostalih 50 μ l in dodali 450 μ l diluenta. S tem smo dobili desetkratno redčitev. Enako smo redčili vse do koncentracije 10^3 cfu/mL. To je bil naš drugi inokulum. Natehtali smo po 1 g neokuženih kozmetičnih izdelkov z veliko koncentracijo protimikrobnih snovi v centrifugirke, dodali 9 ml nevtralizatorja, homogeno premešali in pustili na sobni temperaturi približno 30 ± 15 minut, nato pa dodali 1 ml tega inokuluma (N_{vf}). Potem smo pripravili še kontrolo, v kateri smo 1 ml formulacije nadomestili z 1 ml diluenta (N_{vn}), ter kontrolo inokuluma, ki je vsebovala le 1 ml inokuluma ter 10 ml diluenta (N_v). Na petrijevke smo odpipetirali po 1 mL vsakega pripravljenelega vzorca in dodali gojišče (15 – 20 ml). Preizkus vzorcev s formulacijo smo delali v dveh paralelah, obe kontroli pa v štirih. Plošče smo inkubirali 48 ur na $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$. Ob vsaki naslednji časovni točki (7, 14 in 28 dni) smo v sterilno centrifugirko natehtali 1 g izdelka, ki smo ga inokulirali ob času 0, in dodali 9 ml nevtralizatorja. Mešali smo do homogenosti in nato pustili stati na sobni temperaturi 30 ± 15 minut, da je nevtralizator učinkoval. Pripravili smo 10-kratno in 100-kratno redčitev vsakega vzorca z diluentom. V petrijevke smo odpipetirali po 1 ml vzorca (dve ponovitvi) in dodali gojišče TSA (15 - 20 ml). Inkubirali smo 48 ur pri $32,5 \pm 2,5 \text{ °C}$. Priprava inokuluma, inokulacija, vse redčitve in vlivanje na petrijevke smo opravljali v komori z laminarnim pretokom zraka, da bi se izognili morebitnim dodatnim okužbam izdelkov. Ves pribor smo pred in med delom večkrat razkužili s 70 % etanolom, prav tako površine komore.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Preglednica XII: Rezultati demonstracije učinkovitosti nevtralizatorja

	1. Paralela	2. Paralela	Povprečna vrednost
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	40	34	37
Dehidroocetna kislina	36	49	42,5
Salicilna kislina	38	39	38,5
Levulinska kislina	50	60	55
Sorbinska kislina	29	20	24,5
Glicerilkaprilat	33	33	33
Janeževa kislina	57	45	51
Fenoksietanol	45	44	44,5
Filtrat fermenta korenine redkvice	2	5	3,5
Benzojska kislina	21	23	22
Etanol	39	30	34,5
Izvleček semen grenivke	1	1	1
Mandljeva kislina	37	36	36,5
Izvleček listov rožmarina	63	38	50,5
Brez konzervansa	43	42	42,5
Parabeni	41	43	42
Nv1	31	35	31
Nv2	28	30	
Nvn1	38	33	33,5
Nvn2	32	31	

Za dokazano učinkovitost nevtralizatorja morata biti vrednosti N_v in N_{vn} zelo blizu ter mora biti izpolnjen pogoj: $N_{vf} \geq 0,5 N_{vn}$, pri čemer je:

- N_v viabilnost inokuluma,
- N_{vn} viabilnost inokuluma brez formulacije,
- N_{vf} viabilnost inokuluma ob prisotnosti formulacije.

Glede na pridobljene rezultate v preglednici XII smo ob upoštevanju kriterijev standarda ISO 11930 dokazali učinkovitost nevtralizatorja pri 10-kratni redčitvi za vse emulzije z izjemo formulacij, ki sta vsebovali filtrat fermenta korenine redkvice in izvleček semen grenivke. Ta dva vzorca sta imela število kolonij bistveno manjše od 16,75, kar je polovična vrednost N_{vn} . S tem torej nista izpolnila kriterija in zanju nismo dokazali učinkovitosti nevtralizatorja pri 10-kratni redčitvi. Standard ISO 11390 narekuje, da se v takšnem primeru uporabi drugačen nevtralizator ali pa izvede preizkus pri nadaljnji redčitvi vzorca. Pri nadaljnjem testiranju bi torej morali, namesto v diluentu, še 10-krat redčiti v nevtralizatorju. Mi smo nadaljevali z uporabo enakega nevtralizatorja in enake redčitve, so pa pri kasnejšem ponovnem poskusu na Katedri za farmaceutsko biologijo pri enakih pogojih in ob upoštevanju istega standarda dokazali učinkovitost tega nevtralizatorja za filtrat fermenta korenine redkvice in izvleček semen grenivke pri 100-kratni redčitvi v nevtralizatorju. Pri preizkusu smo uporabili le izdelke, ki vsebujejo večje koncentracije konzervansov, saj lahko predpostavljamo, da dobljeni rezultati veljajo tudi za izdelke z manjšo vsebnostjo konzervansov.

Preglednica XIII: Vrednost R in ustreznost konzervansa pri časovnih točkah T7, T14 in T28 glede na pogoje kriterija A standarda ISO 11930

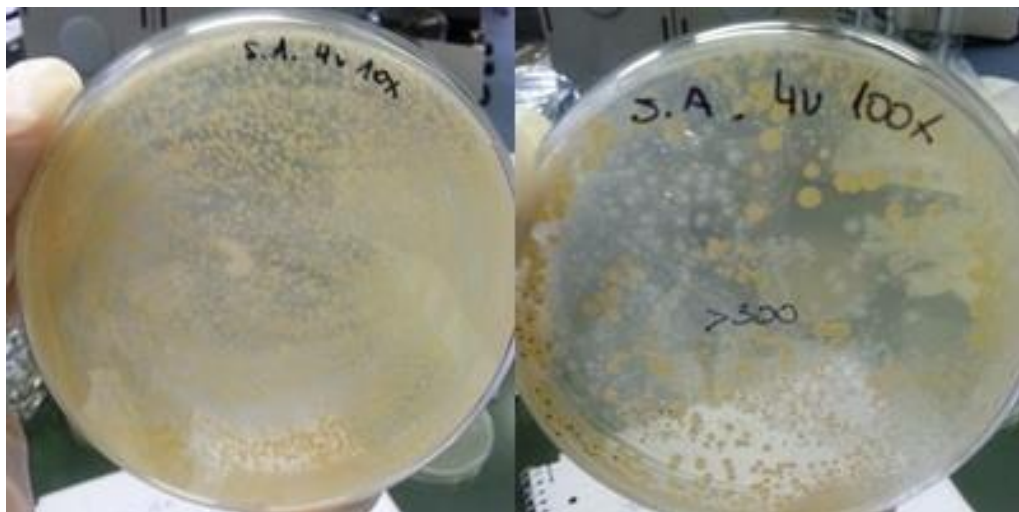
Testirana spojina	Koncentracija v formulaciji	Vrednost R			
		T7	T14	T28	
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Dehidroocetna kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Salicilna kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Levulinska kislina	Majhna	1,69	2,15	2,57	Ne ustreza
	Velika	<0,69	<0,69	<0,69	Ne ustreza
Sorbinska kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza

Glicerilkaprilat	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Janeževa kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Fenoksietanol	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Filtrat fermenta korenine redkvice	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Benzojska kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Etanol	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Izvleček semen grenivke	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Mandljeva kislina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Izvleček listov rožmarina	Majhna	>3	>3	>3	Ustreza
	Velika	>3	>3	>3	Ustreza
Pozitivna kontrola	Metil in propil paraben (7:3) 0,1 g	>3	>3	>3	Ustreza
Negativna kontrola	Brez konzervansa	>3	>3	>3	Ustreza

Glavno vprašanje našega diplomskega dela je bilo: Ali so uporabljeni konzervansi primerni za zaščito pripravljenega kozmetičnega izdelka proti mikroorganizmu *Staphylococcus Aureus* in pri kateri koncentraciji? Ob prvi časovni točki, torej ob točki 0, smo izdelke okužili s pripravljenim inokulumom s koncentracijo $1,5 \times 10^7$ cfu/ml. V vsako centrifugirko z 20 g izdelka smo dodali 200 μ l inokuluma in s tem je bilo v izdelkih prisotnih $1,5 \times 10^5$ cfu/ml.

Po pretečenih sedmih dneh okužbe ni na ploščah zraslo nič kolonij *Staphylococcus aureus*, razen pri izdelku z levulinsko kislino pri obeh koncentracijah. Po enačbi $R_x = \log N_0 - \log N_x$ smo izračunali zmanjšanje logaritemske vrednosti oziroma število R, ki mora biti glede na kriterij A standarda ISO 11930 ≥ 3 ob vseh treh časovnih točkah.

Pri vseh vzorcih, kjer ni na plošči zrasla nobena kolonija ali pa samo ena, smo za izračun uporabili teoretično vrednost ≤ 10 , ki ima logaritemsko vrednost ≤ 1 , in s tem izračunali, da je vrednost števila R v vsakem primeru večja ali enaka 4. To pomeni, da so ti vzorci vsekakor ustrezali kriteriju A. Tega pa ne moremo trditi za nobenega od vzorcev z levulinsko kislino, saj je bilo njuno število R zelo majhno. Pri vzorcu z majhno vsebnostjo levulinske kisline je bila vrednost R manjša od 2,5 pri časovnih točkah T7 in T14, medtem ko je bila pri točki T28 vrednost 2,57. Kriterij sicer dovoljuje odstopanje za 0,5 od vrednosti 3, tako da je vzorec pri tej časovni točki teoretično ustrezal kriteriju, a ker sta bili prvi dve časovni točki nesprejemljivi formulacija vsekakor ni bila ustrezno zaščitena. Podobno lahko rečemo za emulzijo z veliko vsebnostjo tega konzervansa, pri kateri je bila vrednost R vseskozi manjša od 1. Na teh gojiščih je zraslo veliko kolonij, ki so bile brez dvoma kolonije *Staphylococcus aureus*, kot vidimo na sliki 1.

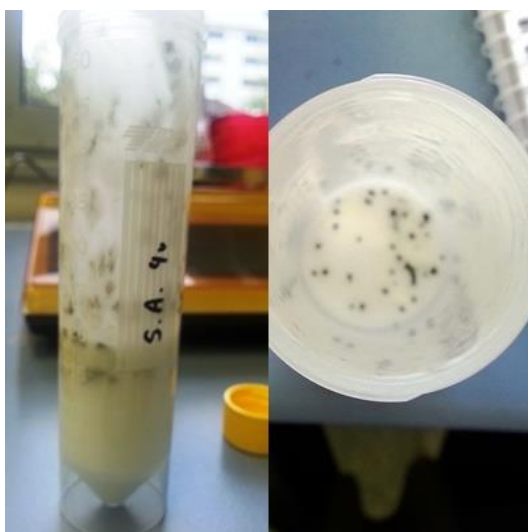


Slika 1: Gojišče vzorca z levulinsko kislino z večjo koncentracijo pri točki T7

Pri preizkusu smo testirali tudi pozitivno kontrolo (zmes parabenov) ter negativno kontrolo (formulacija brez konzervansa). Kontrola, ki je vsebovala zmes parabenov, je, kar zadeva *Staphylococcus aureus*, ustrezala kriteriju A. Tudi na kontroli, ki ni vsebovala konzervansov, ni zraslo skoraj nič kolonij *Staphylococcus aureus*, kar pa ni bilo v skladu z našimi pričakovanji. Najbolj logična pojasnila za takšen rezultat bi bila npr., da inokulacija pri tem vzorcu ni bila dovolj uspešna, da smo slabo premešali vzorec ali pa, da smo morda pri pripravi emulzij po nesreči dodali v kontrolo tudi konzervans. V ponovni izvedbi tega poizkusa v eni od naslednjih diplom so namreč kontrole ustrezale pričakovanim rezultatom. V našem eksperimentalnem delu smo opazovali izključno učinkovitost izbranih protimikrobnih sestavin na *Staphylococcus aureus*. Glede na rezultate lahko rečemo, da izbrani konzervansi v večji in manjši uporabljeni koncentraciji ustrezno zaščitijo izdelek pred razrastom *Staphylococcus aureus*, z izjemo levulinske kisline, kot vidimo v preglednici XII zgoraj ter v preglednici XIV in XV v prilogah. Tudi po kriterijih preizkusa Schülke KoKo, Evropske farmakopeje, Ameriške farmakopeje in ASEAN so izbrane protimikrobne sestavine ustrezno zaščitile izdelek (26). Če pa gledamo na širše delovanje izbranih protimikrobnih učinkovin, smo naleteli na manjše težave. Kot rečeno, na večini plošč kolonij *Staphylococcus aureus* ni bilo, so pa bile prisotne številne kolonije drugih neznanih mikroorganizmov. Ob časovni točki T7 so bile na ploščah z vzorci levulinske kisline poleg kolonij *Staphylococcus aureus* v večjem številu prisotne tudi majhne podolgovate bele kolonije. Pri vzorcu z majhno koncentracijo janeževe kisline je zraslo > 300 kolonij, ki so bile bele prosojne barve. Pri nekaterih ostalih vzorcih pa so se poleg teh pojavili še majhni, beli, kosmičasti delci in velike prosojne kolonije. To sovпада z našim vizualnim opažanjem, saj smo pri naslednjih vzorcih opazili na vrhu tanjši sloj plesni zelenosive barve, kakršen je viden tudi na sliki 2:

- Izdelek z majhno koncentracijo levulinske kisline;
- Kontrola brez konzervansa;
- Izdelek z veliko in majhno koncentracijo izvlečka listov rožmarina;

- Izdelek z veliko koncentracijo mandljeve kisline.

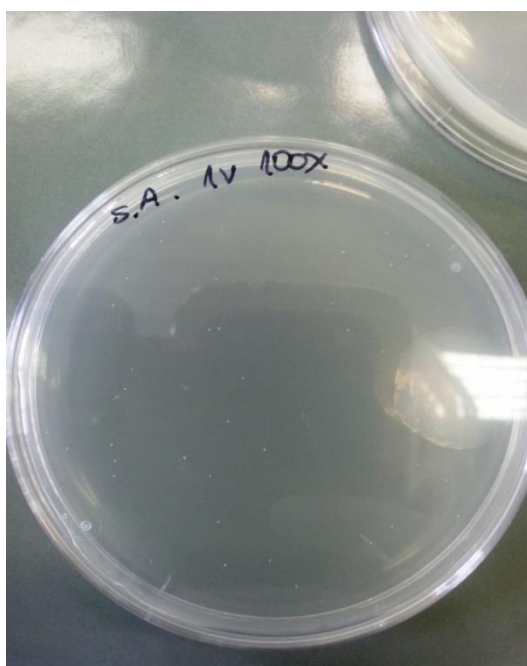


Slika 2: Vzorec z veliko vsebnostjo levulinske kisline

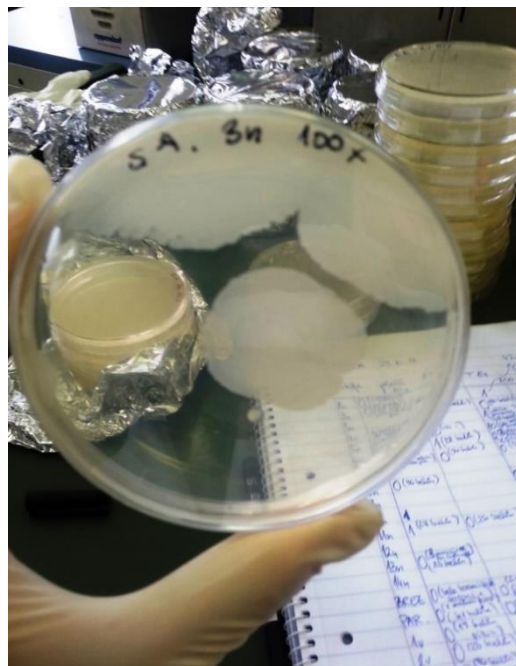


Slika 3: Vzorec brez protimikrobne snovi pri T14

Kosmičasti delci, ki so bili prisotni na nekaterih ploščah, verjetno niso predstavljali kolonije, ampak so zašli v vzorec iz te vrhnje plasti izdelka s plesnijo, ko smo iz centrifugirke odtehtali 1 g za pripravo vzorca.



Slika 4: Vzorec z veliko vsebnostjo zmesi dehidroocetne kisline in benzilalkohola pri 100-kratni redčitvi ob T14



Slika 5: Vzorec z majhno vsebnostjo salicilne kisline pri 100-kratni redčitvi ob T14

Pri pripravi vzorcev za časovni točki T14 in T28 smo vizualno ponovno opazili zelenosive plasti plesni pri istih emulzijah kot pri prejšnji časovni točki ter še pri emulzijah z majhno vsebnostjo levulinske kisline in benzojske kisline. Pri kontroli brez protimikrobne snovi je bilo opaziti tudi oranžne pikice na vrhu, kot je vidno na sliki 3. Okužba se je nato pokazala tudi na gojiščih, saj je bilo na večini prisotnih kar precej kolonij v obliki belih podolgovatih pikic, na nekaterih so zrasle tudi ogromne prosojne belkaste kolonije (sliki 4 in 5). Sodeč po našem poizkusu za širokospektralno zaščito torej izbranih protimikrobnih sestavin ne bi mogli uporabiti, bi pa bilo smiselno, da bi preizkusili več različnih kombinacij teh izbranih sestavin. Tudi parabeni, ki so uveljavljeni širokospektralni konzervansi, v uporabljeni koncentraciji niso pokazali ustrezne učinkovitosti, saj je na testnih gojiščih zraslo kar nekaj kolonij, ki pa niso bile kolonije *Staphylococcus aureus*.

Sprva smo pomislili, da so se morda pokvarili, a smo kasneje ugotovili, da je bila krivec premajhna koncentracija parabenov v izdelku. V emulzijah smo namreč uporabili le 0,1 % zmesi parabenov, medtem ko je dovoljena koncentracija 0,8 %. Glede na pridobljene rezultate bi torej lahko rekli, da izbrana naravna protimikrobna sredstva niso širokospektralno zaščitila naših pripravljenih emulzij. Po razmisleku smo ugotovili, da je bil verjetno vzrok za tolikšno okužbo prav voda, ki smo jo uporabili za pripravo izdelkov. Uporabili smo sicer prečiščeno (demineralizirano) vodo iz pipe, vendar je verjetno v sistemu prišlo do okužbe, lahko zaradi premajhnega pretoka, porabe ali pa zaradi mrtvih kotov. Pri kasnejšem ponovnem preizkusu na Katedri za farmacevtsko biologijo so uporabili prekuhano vodo in ugotovili, da je to zelo vplivalo na rezultate, saj so bili vsi vzorci ustrezno zaščiteni, vključno z izdelkom, ki je vseboval levulinsko kislino. Možna razlaga bi bila, da kolonije, ki smo jih opazili na gojišču vzorca z majhno in veliko koncentracijo levulinske kisline, niso bile kolonije *Staphylococcus aureus*, temveč so jim bile le podobne. Naš preizkus je torej več kot očiten dokaz, kako pomembna je dobra proizvodna praksa pri izdelavi kozmetičnega izdelka. Ni le dovolj, da izdelek zaščitimo z ustreznim protimikrobnim sredstvom, ampak moramo pri procesu izdelave upoštevati tudi vse ostale dejavnike, ki so lahko pomembni za kakovost končnega izdelka in že v osnovi zagotoviti čim manjši vnos mikroorganizmov. Eden izmed njih je vsekakor čistota vode in ostalih vhodnih surovin, ki lahko bistveno vpliva na zaščito in stabilnost proizvoda.

Vodo na področju kozmetične industrije uporabljamo za načrtovanje, proizvodnjo, analizo in testiranje izdelkov. Za nobenega izmed teh postopkov ne uporabljamo vodovodne vode iz pipe. Naravna voda namreč vsebuje številne mikroorganizme, nečistoče ter snovi in je s tem eden pogostejših virov kontaminacije v izdelku. V kozmetiki, farmaciji in sorodnih področjih torej uporabljamo prečiščeno vodo, ki jo pridobivamo na različne načine glede na kakovost, ki je zahtevana za določen postopek oz. izdelek. Postopki, ki jih običajno uporabljamo za pripravo prečiščene vode so destilacija, reverzna osmoza in ionska izmenjava. Najpogosteje uporabljamo prav reverzno osmozo, pri kateri vodo pod tlakom potiskamo skozi pol-prepustno membrano. S to metodo odstranimo kar do 98 % mineralov in soli ter 99 % mikroorganizmov (29). V kozmetiki običajno uporabljamo demineralizirano vodo, saj lahko soli, ki jih voda vsebuje (kalcijeve, magnezijeve soli), negativno vplivajo na izdelavo kozmetičnega izdelka, pri uporabnikih z npr. suho kožo ali drugimi motnjami kožne bariere pa lahko takšna voda stanje celo poslabša (30). Pri našem delu smo uporabljali demineralizirano vodo, pridobljeno z reverzno osmozo.

5. SKLEP

V našem diplomskem delu smo iskali odgovor na vprašanje: Ali bo štirinajst izbranih protimikrobnih sestavin naravnega izvora ustrezno zaščitilo enostavno emulzijo o/v pred bakterijo *Staphylococcus aureus*? Prišli smo do sklepa, da so izbrani naravni konzervansi zadostili pogojem kriterija A standarda ISO 11930, in so bili učinkoviti v boju s to bakterijo, z izjemo levulinske kisline, ki pa žal pripravljenih kozmetičnih emulzij ni ustrezno zaščitila. Gledano širokospektralno, pa uporabljeni konzervansi niso ustrezno zaščitili našega izdelka, saj smo tako opazili okužbo izdelkov z vsaj dvema vrstama mikroorganizmov. Težave nam je pri delu povzročala neustrezna voda, za katero smo ugotovili, da je bila verjetno okužena, zato so v nadaljnji raziskavi na Katedri za farmacevtsko biologijo preizkus za boljši rezultat ponovili in vodo prekuhali ter pri kontroli s parabeni uporabili večjo koncentracijo le-teh. Smiselno bi bilo, da bi morda izbrana naravna protimikrobna sredstva uporabili v kombinaciji in preverili, ali bi tako lahko dosegli sinergistično delovanje in morda širokospektralno zaščito.

6. LITERATURA

1. Toddar Kenneth, PhD. Todar's Online Textbook of Bacteriology: Structure and Function of Bacterial Cells (page 5). http://www.textbookofbacteriology.net/structure_5.html. Datum dostopa: 4.5.2015.
2. Wood E.J. Ferguson: The Living Ocean, Croom Helm Ltd, London 1975: 37-38.
3. Brannan K. Daniel: Cosmetic preservation. J. Soc. Cosmet. Chem. 1995; 46: 199-220.
4. Smart. R, Spooner D.F.: Microbiological Spoilage in Pharmaceuticals and Cosmetics. J. Soc. Cosmet. Chem 1972; 23: 721-737.
5. Pathogen Regulation Directorate, Public Health Agency of Canada. Staphylococcus aureus 2011. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/staphylococcus-aureus-eng.php>. Datum dostopa: 4.5.2015.
6. Toddar Kenneth, PhD. Todar's Online Textbook of Bacteriology: Staphylococcus (page 2). http://textbookofbacteriology.net/staph_2.html. Datum dostopa: 4.5.2015.
7. Urad RS za kemikalije, Ministrstvo RS za zdravje. Mikrobiološka ustreznost kozmetičnih izdelkov. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/kozmeticni_proizvodi/mikrobioloska_ustreznost_kozmeticnih_izdelkov/. Datum dostopa: 4.5.2015.
8. Varvaresou A., Papageorgiou S., Tsirivas E., Protopapa H., Kefala V., Demetzos C.: Self-preserving Cosmetics. International Journal of Cosmetic Science 2009; 31: 163-175.
9. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Priloga V. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:sl:PDF>. Datum dostopa: 4.5.2015.
10. Cosmetics info: Parabens. <http://www.cosmeticsinfo.org/paraben-information>. Datum dostopa: 5.10.2015.
11. S. Baumgartner, N. Bajramović, I. Bartenjev, M.R. Butina, P. Fiala, M. Gašperlin, M. Gosenca, D. Janeš, A. Menard, B. Štrukelj; N. K. Glavač, A. Zvonar (Urednici): Kozmetologija I, Trendi na področju kozmetičnih izdelkov- učinkovitost in varnost sestavin, strokovno izobraževanje, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 41-52.
12. Scientific Comitee on Consumers Safety SCCS: Opinion on parabens 14. december 2010.

- http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf.
Datum dostopa: 20.5.2015.
13. Lonza inc, USA: Geogard® 221 Preservative. (Specifikacija proizvajalca.)
14. Cosmetics info: Salicylic acid. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/salicylic-acid>
Datum dostopa: 20.5.2015
15. Eastman Chemical Company: Sorbic Acid and Potassium Sorbate as Cosmetic Preservatives. Publication CB-35 April 1998. (Specifikacija proizvajalca.)
16. Cosmetics info: Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Sodium Benzoate. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/benzyl-alcohol-benzoic-acid-and-sodium-benzoate>. Datum dostopa: 20.5.2015.
17. EWG's Skin Deep® Cosmetics Database: Levulinic Acid. http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/703537/LEVULINIC_ACID/.
Datum dostopa: 20.5.2015.
18. Viswas G., Milford H.: Cereals: Novel Uses and Processes (Industrial Applications for Levulinic Acid). Plenum press, New York, 1997: 49.
19. Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH: Multifunctional additives: Dermosoft® 688 20011-1. (Specifikacija proizvajalca.)
20. Derma center Maribor <http://www.derma-mb.si/pogosta-vprasanja/sadne-kislina/>.
Datum dostopa: 20.5.2015.
21. Ash Michael and Irene: Handbook of Preservatives, Synapse Information Resources, inc., New York, 2004: 444.
22. Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH: Multifunctional additives: Dermosoft® GMCY 2008-1. (Specifikacija proizvajalca.)
23. Krowka J. e tal: Phenoxyethanol as a Safe and Important Preservative in Personal Care. Cosmetics & Toiletries Junij 2014; 129 (5): 24-27.
24. Valeine Lauma: Natural Alcohol in Cosmetics. Myths and Facts. <http://www.madaracosmetics.com/en/experts/expert:lauma-valeine/article:natural-alcohol-in-cosmetics-myths-and-facts/>. Datum dostopa: 20.5.2015
25. Active Micro Technologies: Leucidal® Liquid Technical Data Sheet. Version 8; 10.15.10. (Specifikacija proizvajalca.)

26. Lekarne Maribor: Grenifit kapljice.
http://www.mb-lekarne.si/slo/izdelki/izdelek/19/grenifit_kapljice. Datum dostopa:
20.5.2015.
27. Flavex® Naturextrakte GmbH: CO2-Antioxidantien aus Rosmarin und Salbei.
(Specifikacija proizvajalca.)
28. Siegert. W.: A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW Journal 2012; 7: 44-53.
29. Water Purification Systems Purite: The importance of water purification in cosmetics manufacturing. http://www.purite.com/wp-content/uploads/2014/03/Purite-Cosmetics_The-importance-of-purified-water-White-Paper-Feb-2014.pdf. Datum dostopa:
25.7.2015.
30. Lautenschläger Hans: Water and water-just not the same things: water qualities.
Kosmetische Praxis 2005; (4): 8-10.

7. PRILOGE

Preglednica XIV: Število kolonij pri vseh treh časovnih točkah ter povprečno število kolonij pri manjši koncentraciji

Testirana spojina (majhna koncentracija)	T7						T14						T28					
	10-kratna redčitev			100-kratna redčitev			10-kratna redčitev			100-kratna redčitev			10-kratna redčitev			100-kratna redčitev		
	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	0	0	0	0	0	0	0°*	0*	0	1°*	0°*	0,5	0°*	0°*	0	0°*	0°*	0
Dehidroocetna kislina	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0°*	0	0*	0*	0
Salicilna kislina	0	0	0	0	0	0	0*	0°*	0	1°*	0°*	0,5	0*	0*	0	0*	0°*	0
Levulinska kislina	110°	90°	100	23°	38°	30,5	36*	20*	28	10*	11°*	10,5	17*	17*	17	3°*	5°*	4
Sorbinska kislina	0	0	0	0	0	0	0*	1*	0,5	2°*	0*	1	0°*	0*	0	0°*	0°*	0
Glicerilkaprilat	0	0	0	0	0	0	0°*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0°*	0
Janeževa kislina	0*	0*	0	0*	0*	0	0	0	0	0°	0°	0	0*	0*		0°	0°	0
Fenoksietanol	0	0	0	2	0	1	0*	1*	0,5	2*	0°*	1	0*	0*	0	0*	0*	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0	0	0	0°*	0°*	0
Benzojska kislina	0	0	0	1	0	0,5	0*	0*	0	0°*	0°*	0	0*	0*	0	0*	0°*	0

Etanol	0	0	0	0	0	0	1*	0*	0,5	0°*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0
Izvleček semen grenivke	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0	0	0	0*	0°*	0
Mandljeva kislina	0	0	0	0	0	0	0°*	0*	0	0°*	0°*	0	0*	0*	0	0*	0°*	0
Izvleček listov rožmarina	0	0	0	0 ^x	0 ^x	0	0 ^x	0° ^x	0	0°*	0°*	0	0°*	0*	0	0*	0*	0

*Na ploščah je bilo več svetlih, prosojnih velikih kolonij

°Poleg kolonij *Staphylococcus aureus* so bile na ploščah vidne tudi številne bele podolgovate kolonije.

^xNa ploščah so bili prisotni beli kosmičasti delci (1 - 10).

1p-prva ponovitev

2p-druga ponovitev

p.š.-povprečno število

Preglednica XV: Število kolonij pri vseh treh časovnih točkah ter povprečno število kolonij pri višji koncentraciji

Testirana spojina (velika koncentracija)	T7						T14						T28					
	10-kratna redčitev			100-kratna redčitev			10-kratna redčitev			100-kratna redčitev			10-kratna redčitev			100-kratna redčitev		
	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.	1p	2p	p.š.
Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0°	0	0	0*	0°*	0
Dehidroocetna kislina	0	0	0	0	0	0	0*	0°*	0	1°*	0*	0,5	0°*	0*	0	0°*	0°*	0
Salicilna kislina	1	0	0,5	0	0	0	0°*	0*	0	0°*	1*	0,5	0*	0*	0	0*	0°*	0
Levulinska kislina	>300°	>300°	>300	>300°	>300°	>300	>3000	>3000	>3000	>300*	>300*	>300	>1000*x	>1000*x	>1000	>300*	>300*	>300
Sorbinska kislina	0	0	0	0	0	0	1*	0°*	0,5	0*	0°*	0	0*	0*	0	0°*	0*	0
Glicerilkaprilat	0	0	0	0	0	0	0°*	0°*	0	0°*	0°*	0	0*	0°*	0	0*	0°*	0
Janeževa kislina	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0°*	0*	0	0*	0*	0	0°*	0*	0
Fenoksietanol	0	0	0	0	0	0	0*	0*	0	0*	0°*	0	0*	0*	0	0°*	0°*	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	0	0	0	0	0	0	0°	0	0	0*	1*	0,5	0	0	0	0*	0°*	0
Benzojska kislina	0	0	0	0	0	0	0°*	0*	0	0°*	0°*	0	0	0°	0	0°*	0*	0

Etanol	0	0	0	0	0	0	0 ^{o*}	0*	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0	1*	0*	0,5	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0
Izvleček semen grenivke	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0	0*	0	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0
Mandljeva kislina	0 ^x	0 ^x	0	0	0	0	0 ^x	0 ^x	0	0*	0 ^{*x}	0	0 ^{o*}	0 ^o	0	0*	0 ^{o*}	0
Izvleček listov rožmarina	0 ^x	0 ^x	0	0 ^x	0 ^x	0	0 ^x	0 ^x	0	0 ^x	0	0	0 ^o	0 ^o	0	0 ^o	0 ^o	0
Metil + Propil paraben	1	1	1	0	0	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0	0	0*	0	0*	1 ^{o*}	0,5
Brez konzervansa	3 ^x	2 ^x	2,5	0 ^x	0	0	0 ^x	0 ^{o*x}	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0	0*	0 ^{*x}	0	0 ^{o*}	0 ^{o*}	0

* Na ploščah je bilo več svetlih, prosojnih velikih kolonij

^oPoleg kolonij *Staphylococcus aureus* so bile na ploščah vidne tudi številne bele podolgovate kolonije

^xNa ploščah so bili prisotni beli kosmičasti delci (1 - 10).

1p-prva ponovitev

2p-druga ponovitev

p.š.-povprečno število