

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA MOČNIK RONER

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV ZA UPORABO
V NARAVNI KOZMETIKI Z IZZIVNIM PREIZKUSOM IN
DOLOČANJEM CELOKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV**

**EFFICACY COMPARISON OF ANTIMICROBIAL
PRESERVATIVES FOR USE IN NATURAL COSMETICS WITH
CHALLENGE TEST AND TEST OF TOTAL VIABLE COUNT**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Hvala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farmacije.

Lr. p.

Kazalo

Povzetek	VI
Ključne besede.....	VII
Abstract.....	VIII
Key words.....	IX
Seznam okrajšav	X
1 Uvod	1
1.1 Testiranje mikrobiološke stabilnosti kozmetičnih izdelkov	1
1.1.1 Določanje celokupnega števila mikroorganizmov	2
1.1.2 Izzivni test	3
1.2 Testni mikroorganizem.....	6
1.3 Konzervansi	7
1.3.1 Organske kisline in njihovi estri	8
1.3.2 Alkoholi	9
1.3.3 Protimikrobni peptidi.....	9
1.3.4 Rastlinski ekstrakti	9
2 Namen dela	11
3 Materiali in metode.....	12
3.1 Laboratorijska oprema.....	12
3.2 Kemikalije	12
3.3 Biološki material	13
3.4 Izdelava testnih emulzij.....	13
3.5 Določanje celokupnega števila mikroorganizmov	15
3.6 Izvedba izzivnega testa.....	17
3.6.1 Priprava inokuluma in inokulacija.....	17
3.6.2 Test učinkovitosti medija za deaktivacijo	18

3.6.3	Izzivni test	19
4	Rezultati.....	20
4.1	Rezultati testa celokupnega določanja mikroorganizmov	20
4.2	Rezultati izzivnega testa	22
4.2.1	Prikaz učinkovitosti delovanja medija za deaktivacijo konzervansa.....	22
4.2.2	Kriteriji ustreznosti za izzivni test.....	23
5	Razprava	26
6	Sklep.....	29
7	Literatura	30
8	Priloge.....	33
8.1	Priloga 1: Test delovanja medija za deaktivacijo	33
8.2	Priloga 2: Izzivni test.....	34

Kazalo preglednic

Preglednica I: Primerjava kriterijev Uredbe o kozmetičnih izdelkih in kriterijev farmacevtskih izdelkov za dermalno uporabo	3
Preglednica II: Testni mikroorganizmi za izvedbo izzivnega testa.....	4
Preglednica III: Kriteriji sprejemljivosti za ISO 11930.....	5
Preglednica IV: Kriteriji sprejemljivosti za Schülke KoKo	5
Preglednica V: Kriteriji sprejemljivosti za Ph. Eur. 8	6
Preglednica VI Emulzija za dermalno uporabo	14
Preglednica VII: Koncentracije dodanih konzervansov	15
Preglednica VIII: Puferska raztopina peptona in natrijevega klorida.....	16
Puferska raztopina peptona in natrijevega klorida	16
Preglednica IX: Gojišči TSA in SDA.....	16
Preglednica X: Diluent	17
Preglednica XI: Medij za deaktivacijo konzervansa	18

Preglednica XII: Celokupno število mikroorganizmov v dermalnih emulzijah.....	20
Preglednica XIII: Prikaz učinkovitosti delovanja medija za deaktivacijo.....	22
Preglednica XIV: Ustreznost dermalnih emulzij kriterijem po ISO 11930.....	24
Preglednica XV: Test delovanja medija za deaktivacijo.....	33
Preglednica XVI: Izzivni test, 7 dni po inokulaciji.....	34
Preglednica XVII: Izzivni test, 14 dni po inokulaciji.....	35
Preglednica XVIII: Izzivni test, 21 dni po inokulaciji.....	36
Preglednica XIX: Izzivni test, 28 dni po inokulaciji.....	37

Povzetek

Mikrobiološka stabilnost je ključna za zagotavljanje varnosti kozmetičnega izdelka. Poleg dobre proizvodne prakse je zaradi sorazmerno velike vsebnosti vode in sestavin, občutljivih na mikrobiološko kvarjenje, v kozmetičnih izdelkih naravnega izvora pomembno tudi dodajanje sestavin s širokospektralnim protimikrobnim delovanjem. Konzervansi, ki jih v klasičnih kozmetičnih izdelkih uspešno uporabljamo za konzerviranje že vrsto let, so navedeni v Prilogi V Uredbe ES 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, vendar pa je uporaba večine teh snovi v kozmetičnih izdelkih naravnega izvora prepovedana. Izbrali smo 12 snovi, ki so uvrščene na seznam dovoljenih sestavin kozmetičnih izdelkov in poskušali dokazati njihovo protimikrobno delovanje. Zaradi naraščanja trenda naravne kozmetike in neželene uporabe že dokazano učinkovitih konzervansov je nujno, da izdelovalcem naravne kozmetike zagotovimo dovolj učinkovite in varne alternative.

Preizkusili smo protimikrobno delovanje 12 kozmetičnih sestavin, ki smo jih vmešali v vlažilne emulzije tipa olje v vodi. Preizkusili smo najnižje koncentracije, ki bi naj še delovale, ter visoke koncentracije, ki so za polovico nižje od najvišjih dovoljenih pri izdelkih, ki se sperejo s kože. Emulzijam smo določili tudi celokupno število mikroorganizmov po Ph. Eur. 8, ter tako preverili začetno vrednost vsebnosti mikroorganizmov v formulaciji in preverili potencialno naraščanje te koncentracije v določenem časovnem obdobju. Potrdili smo ustreznost vseh izdelanih dermalnih emulzij, vključno z negativno kontrolo, ki protimikrobnih snovi ni vsebovala, kar kaže na izdelavo v skladu s pravili dobre proizvodnje prakse in dobro kakovost vhodnih surovin.

Izvedli smo izzivni test z glivo *Candida albicans* po standardu ISO 11930, ter določili, da emulzije ustrezno zaščitijo visoka koncentracija ekstrakta grenivke, benzojska kislina, gliceril kaprilat, etanol, sorbinska kislina, salicilna kislina, vodna raztopina dehidroocetne kisline in benzilalkohola, janeževa kislina, dehidroocetna kislina ter zmes metil- in propilparabena v srednji (0,4%) in visoki (0,8%) koncentraciji (slednji smo uporabljali za pozitivno kontrolo). Nezadostno fungicidno delovanje so izkazali: nizka koncentracija ekstrakta grenivke, levulinska kislina, fenoksietanol, filtrat fermenta korenine redkvice ter nizka koncentracija (0,1%) zmesi metil- in propilparabena.

Za potrditev, da preizkušene snovi delujejo kot konzervansi, bi morali izvesti še dodatna testiranja, predpisana po standardu ISO 11930.

Ključne besede

ISO 11930, izzivni preizkus, celokupno število mikroorganizmov, *Candida albicans*, naravni konzervansi

Abstract

Microbiological stability is essential for ensuring the safety of cosmetic products. In cosmetic products of natural origin specially in the case of relatively high water content and ingredients susceptible to microbiological spoilage in addition to the good manufacturing practice, it is also important to add ingredients with broad-spectrum antimicrobial activity. Cosmetic ingredients used as preservatives are listed in Annex V of the Regulation EC No 1223/2009 on cosmetic products, however for most of these substances use in cosmetic products of natural origin is prohibited. Due to the increasing trend of natural cosmetics and undesirability of traditional preservatives, effective and safe alternatives must be provided for manufacturers of natural cosmetics.

We tested antimicrobial activity of 12 cosmetic ingredients which were mixed into the moisturizing emulsion type oil in water. We used lowest concentrations, which were still proven effective and high concentrations, which were half lower than maximum allowed concentrations in products that wash from the skin. Total number of microorganisms was determined in emulsions according to Ph. Eur. 8, in order to determine initial value of microorganisms in the formulation and potential increase of the concentration in given period of time. We have confirmed the adequacy of all manufactured dermal emulsions, including the negative control, which did not contain any antimicrobial substances. This indicates that emulsions were made according to the good manufacturing practice and quality of raw materials was adequate.

We performed the challenge test with *Candida albicans* according to ISO 11930, and determined that emulsions were adequately preserved with high concentration of the grapefruit extract, benzoic acid, glyceryl caprylate, ethanol, sorbic acid, salicylic acid, an aqueous solution of dehydroacetic acid and benzyl alcohol, anisic acid, dehydroacetic acid and a mixture of the methyl and propylparaben in the mean (0.4%) and high (0.8%) concentrations (the latter was used as a positive control). Insufficient fungicidal activity was confirmed in emulsions with: low concentration of the grapefruit extract, levulinic acid, phenoxyethanol, radish root ferment filtrate and a low concentration (0.1%) mixture of methyl and propylparaben.

To confirm that tested compounds act as preservatives additional tests in accordance with ISO 11930 should be performed.

Key words

ISO 11930, Challenge test, Microbial enumeration test, *Candida albicans*, natural preservatives

Seznam okrajšav

CFU (iz angl. *colony forming unit*): kolonijska enota

ISO (iz angl. *International Organization for Standardization*): Mednarodna organizacija za standardizacijo

Ph. Eur. 8 (iz angl. *The European Pharmacopoeia 8th edition*): 8. izdaja Evropske farmakopeje

SCCS (iz angl. *The Scientific Committee on Consumer Safety*): Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov

SDA (iz angl. *sabouraud dextrose agar*): tip agarnega gojišča, ki se uporablja za gojenje dermatofitov ter drugih gliv

TAMC (iz angl. *total aerobic microbial count*): celokupno število aerobnih mikroorganizmov

TMTC (iz angl. *too many to count*): na plošči se je pojavilo preveliko število kolonij, da bi jih bilo mogoče prešteti

TSA (iz angl. *tryptone soya agar*): tip agarnega gojišča, ki se uporablja za gojenje bakterij

TYMC (iz angl. *total yeasts/mould count*): celokupno število kvasovk in plesni

Uredba (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih (angl. *Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products*): Uredba Evropske skupnosti št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih

1 Uvod

Voda je najbolj pogosta surovina, ki se uporablja v kozmetični industriji. Uporablja se kot ena izmed glavnih sestavin pri razvoju, proizvodnji in testiranju kozmetičnih izdelkov, hkrati pa tudi za čiščenje ter sterilizacijo proizvodnih strojev in laboratorijske opreme. Zelo pomembno je torej, da zagotovimo ustrezno kakovost vode, saj lahko ta vsebuje vrsto mikrobioloških in mineralnih kontaminantov (kalcijev in magnezijev hidrogenkarbonat, magnezijev in kalijev klorid, sulfat in nitrat), ki vplivajo na kvaliteto, konsistenco in varnost končnega izdelka (1). Kozmetični izdelki naravnega izvora poleg vode vsebujejo še vrsto drugih snovi, ki so občutljive na mikrobiološko kvarjenje (npr. snovi, bogate z beljakovinami, surovine rastlinskega ali živalskega izvora) (2), zato je njihova zaščita še posebej pomembna.

Za izdelavo kakovostnih, varnih in učinkovitih kozmetičnih izdelkov ni pomembna le kakovost vhodnih surovin, ampak tudi proizvodnja v skladu z načeli dobre proizvodne prakse (3). Zagotavljanje stabilnosti izdelkov pa se ne konča, ko izdelek doseže prodajne police, ampak mora biti zagotovljena celoten čas roka trajanja ob normalnih in razumno predvidljivih pogojih uporabe (2). Pri tem je zelo pomembna izbira primerne embalaže in učinkovit sistem konzerviranja izdelka, ki ustreza obliki kozmetičnega izdelka (4).

1.1 Testiranje mikrobiološke stabilnosti kozmetičnih izdelkov

Kozmetičnih izdelkov ni treba pripravljati aseptično, saj jih nanašamo na kožo, prehajanje v globlje plasti, kjer bi sestavine kozmetičnih izdelkov imele dostop do krvnega obtoka pa ni dovoljeno. Zdrava koža ima zaradi svoje edinstvene sestave rožene plasti s korneociti in medceličnimi lipidi zmožnost obrambe notranjosti organizma pred različnimi nevarnostmi iz okolja, kot so patogeni mikroorganizmi, različni kemični agensi in mehanski stres, hkrati pa organizem ščiti tudi pred pretirano izgubo vode in elektrolitov (5). Kljub temu zmanjšamo možnosti mikrobioloških infekcij kože z dokazovanjem odsotnosti nekaterih patogenih ali fakultativno patogenih mikroorganizmov, ki so najpogostejši povzročitelji takšnih okužb. To so *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Candida albicans*, pa tudi *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, in drugi *Pseudomonas sp.*(6). Uredba o izvajanju Uredbe o kozmetičnih izdelkih (7) določa zahteve, ki jih mora kozmetični izdelek izpolnjevati glede na skupino ljudi, ki ga bodo uporabljali ali predel, na katerega ga bodo nanašali:

Kozmetični izdelki 1. kategorije v 0,1 g ali v 0,1 mL vzorca ne smejo vsebovati naslednjih mikroorganizmov: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans*, v 0,5 g ali 0,5 mL vzorca, pa kozmetični izdelki 2. kategorije, ki so namenjeni za nego otrok, mlajših od treh let, ali za uporabo na koži v območju oči in na sluznicah.

V kozmetičnih izdelkih 1. kategorije v 1 g ali v 1 mL vzorca skupno število živih aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ne sme biti večje kot **1000**,

v kozmetičnih izdelkih 2. kategorije, ki so namenjeni negi otrok, mlajših od treh let, ali za uporabo na koži v območju oči in na sluznicah pa to število ne sme preseči **100**.

Uredba o izvajanju Uredbe o kozmetičnih izdelkih pa predpisuje določene standarde ISO po katerih se moramo ravnati pri testiranju odsotnosti oziroma določanju skupnega števila živih aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. Opisi podobnih testov pa se nahajajo tudi v Farmakopeji, ki s še bolj rigoroznimi predpisi ureja področje zdravil.

1.1.1 Določanje celokupnega števila mikroorganizmov

V tem diplomskem delu smo za določanje celokupnega števila mikroorganizmov izbrali test opisan v poglavju 2. 6. 12. Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests (07/2010: 20612) 8. izdaje Evropske farmakopeje, kriteriji, ki smo jih izbrali za ustreznost kozmetičnega izdelka pa veljajo za farmacevtske pripravke za dermalno uporabo (kriteriji iz poglavja 5. 1. 4. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use (01/2014: 50140)).

Določanje celokupnega števila mikroorganizmov je kvantitativen test, s katerim lahko določimo število mezofilnih bakterij in gliv, ki uspevajo v aerobnih pogojih. Ta test se uporablja, kadar želimo ugotoviti ali določen končen produkt ali vhodna surovina ustrežata mikrobiološkim kriterijem, ki so odvisni od farmacevtske oblike produkta oziroma surovine, lahko pa se uporablja tudi za preverjanje učinkovitosti konzerviranja formulacije.

Postopek je potrebno izvesti tako, da preprečimo zunanjo okužbo vzorcev med delom, hkrati pa s tem ne smemo vplivati na mikroorganizme, ki jih s testom določamo. Pred izvedbo testa moramo učinkovito deaktivirati protimikrobno aktivnost sestavin formulacije, vendar moramo biti prepričani, da medij za deaktivacijo, ki ga bomo uporabili, ni toksičen za mikroorganizme. Za določanje števila mikroorganizmov lahko uporabimo metodo membranske filtracije, metodo najbolj verjetnega števila (angl. *Most*

probable number) ali metodo štetja na ploščah, izbira pa mora biti v skladu z naravo izdelka, ki ga testiramo in pričakovanim številom mikroorganizmov, ki jih bomo s testom določili.

Pred izvedbo testa moramo narediti plan vzorčenja, da bi s tem pridobili čim bolj relevantne rezultate. Tudi pri tem moramo upoštevati karakteristike formulacije, ki jo testiramo, kar pomeni, da izberemo primeren volumen vzorčenja in pretehtamo, če obstaja nevarnost zaradi visoke mikrobiološke okuženosti izdelkov. Premisliti moramo tudi, če so izdelki, ki jih bomo testirali popolnoma homogeni in če obstaja možnost, da so mikroorganizmi v vzorcu neenotno razporejeni. Pomembna je tudi priprava vzorcev pred testiranjem, kar vključuje pripravo primernih redčitev in deaktiviranje protimikrobnih snovi v formulaciji.

Število celokupnih mikroorganizmov določamo s pomočjo dveh parametrov: za določanje števila TAMC uporabljamo medij TSA, ki podpira rast bakterij. Število kvasovk in plesni, torej TYMC pa smo določali na mediju SDA, ki smo mu dodali antibiotik kloramfenikol, zato, da bi zmanjšali možnost kontaminacije medija z bakterijami.

V *Preglednici I* so prikazani kriteriji, ki ustrezajo za kozmetične izdelke in kriteriji, ki ustrezajo za farmacevtske pripravke za dermalno uporabo. Razberemo lahko, da so kriteriji za ustreznost iz Ph. Eur. 8 bolj strogi kot kriteriji za izdelke iz 1. kategorije po Uredbi o kozmetičnih izdelkih in manj strogi kot za izdelke iz 2. kategorije.

Preglednica I: Primerjava kriterijev Uredbe o kozmetičnih izdelkih in kriterijev farmacevtskih izdelkov za dermalno uporabo (2,8)

Kriterij	Uredba o kozmetičnih izdelkih		Ph. Eur. 8		
	1. kategorija	2. kategorija	TAMC	TYMC	Skupaj
Dovoljeno št. aerobnih mezofilnih mikroorganizmov	1000	100	10 ²	10 ¹	110

1.1.2 Izzivni test

Z izzivnimi testi simuliramo predvideno in razumno predvideno uporabo določenega kozmetičnega izdelka ter z enkratnim (ali večkratnim) vnosom velike količine

mikroorganizmov prikažemo pogosto poseganje uporabnika v vsebnik s formulacijo. Konzervans mora prestati izzivni test, da lahko uporabniku zagotovimo varno uporabo izdelka cel čas roka trajanja.

Uspešnost konzerviranja formulacije lahko preverimo na več načinov. Uredba o kozmetičnih izdelkih zahteva, da so v poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka vključene tudi specifikacije o mikrobiološki kakovosti surovin in končnega izdelka, pri čemer je potrebno biti še posebej pozoren pri kozmetičnih izdelkih, ki se uporabljajo okoli oči, na poškodovani koži, otrocih, mlajših od treh let, na starejših ljudeh in na ljudeh, ki kažejo znake zmanjšane odpornosti. Zahteva tudi izzivni preizkus, ki zagotavlja učinkovitost konzervansa, vendar točna metoda, po kateri bi ta preizkus izvedli ni določena.

Izzivni testi temeljijo na namerni okužbi (inokulaciji) testne formulacije z znano količino in koncentracijo suspenzije izbranega mikroorganizma ali kombinacijo le-teh (inokulum). Inokulirano formulacijo nato v originalnem ali drugem sterilnem vsebniku hranimo na določeni temperaturi in v predpisanih časovnih intervalih vzorčimo ter tako spremljamo koncentracijo preživelih mikroorganizmov. Vzorčimo tako, da odzamemo del formulacije, zavremo delovanje konzervansa z medijem, ki zagotavlja deaktivacijo in določimo število mikroorganizmov po eni izmed metod, ki so že opisane v podpoglavju **1.2.1 Določanje celokupnega števila mikroorganizmov**. Zato, da bi se izognili dodatnim zunanji okužbam formulacije, vse korake izvajamo v sterilnem okolju.

Obstaja veliko smernic za izvedbo izzivnih testov, ki se med seboj nekoliko razlikujejo. Za testiranje izberemo tisto, ki je najbolj primerna za vrsto našega izdelka glede na obliko kozmetičnega izdelka in področje uporabe ter ciljno skupino, ki bo izdelek uporabljala (9). V nadaljevanju bomo med seboj primerjali nekaj smernic, ki se najpogosteje uporabljajo in pojasnili zakaj smo izbrali ravno standard ISO 11930.

V *Preglednici II* so zapisani testni mikroorganizmi, katerih uporaba je priporočena v različnih smernicah. S krepko smo označili tiste mikroorganizme, ki se pojavljajo v vseh smernicah.

Preglednica II: Testni mikroorganizmi za izvedbo izzivnega testa (9)

Smernica	Testni mikroorganizmi
ISO 11930	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia</i>

	<i>coli, Aspergillus brasiliensis</i>
Schülke KoKo	<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Escherichia coli, Aspergillus brasiliensis, Enterobacter gergoviae, Klebsella pneumoniae, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Kocuria rhizophila, Penicilinum pinophilum</i>
Ph. Eur. 8	<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Escherichia coli, Aspergillus brasiliensis</i>

Test ISO 11930 in smernice v Ph. Eur. 8 upoštevajo le priporočila Znanstvenega odbora za varnost potrošnikov (SCCS) (10), ki narekujejo, da se za testiranje uporabijo patogeni mikroorganizmi. Test Schülke KoKo v test vključuje tudi druge mikroorganizme, ki lahko povzročijo mikrobiološko kvarjenje izdelka. Kultivacija testnih mikroorganizmov, priprava inokuluma in inokulacija je za vse smernice zelo podobna, razlike pa se znova pojavijo pri kriterijih sprejemljivosti, kar lahko vidimo v **Preglednicah III, IV in V**.

Preglednica III: Kriteriji sprejemljivosti za ISO 11930 (11)

ISO 11930				
Mikroorganizem	Kriterij	Logaritem zmanjšanja (Rx)		
		R7	R14	R28
<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	A	≥3	≥3 in brez povečanja	≥3
	B	ND	≥3	≥3 in brez povečanja
<i>Candida albicans</i>	A	≥1	≥1 in brez povečanja	≥1 in brez povečanja
	B	ND	≥1	≥1 in brez povečanja
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	ND	≥0	≥1
	B	ND	≥0	≥0 in brez povečanja

*ND (ni potrebno določati), R7 (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 7 dni po inokulaciji vzorca), R14 (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 14 dni po inokulaciji vzorca), R21 (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 21 dni po inokulaciji vzorca); sprejemljiva deviacija pri interpretaciji rezultatov je 0,5 log

Preglednica IV: Kriteriji sprejemljivosti za Schülke KoKo (9)

Schülke KoKo			
Mikroorganizem	Kriterij	Logaritem zmanjšanja (Rx)	
		R7, R14, R21, R28, R35, R42	Inokulacijo ponavljamo vsak teden, ¹ : zelo majhno število naraščanja bakterij do 6. cikla
<i>Bakterije</i>	A	≥4	

	B	$\geq 3^1$	
Glive	A	≥ 3	
	B	$\geq 2^1$	

* R7 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 7 dni po inokulaciji), R14 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 14 dni po inokulaciji), R21 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 21 dni po inokulaciji), R28 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 28 dni po inokulaciji), R35 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 35 dni po inokulaciji), 42 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 42 dni po inokulaciji)

Preglednica V: Kriteriji sprejemljivosti za Ph. Eur. 8 (8)

Ph. Eur. 8 (izdelki za dermalno uporabo)					
Mikroorganizem	Kriterij	Logaritem zmanjšanja (Rx)			
		R2	R7	R14	R28
<i>Bakterije</i>	A	2	3	/	Brez povečanja
	B	/	/	3	
Glive	A	/	/	2	Brez povečanja
	B	/	/	1	

* R2 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 2 dni po inokulaciji), R7 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 7 dni po inokulaciji), R14 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 14 dni po inokulaciji), R28 (logaritem zmanjšanja konc. mikroorganizmov 28 dni po inokulaciji)

V tem diplomskem delu bomo testirali učinkovitost konzerviranja dermalne emulzije tipa olje v vodi, zato moramo izbrati temu primeren standard. Izzivni test po kriterijih Schülke KoKo je najbolj zahteven in predvideva testiranje skozi najdaljše časovno obdobje, saj vzorca ne inokuliramo le enkrat, ampak ponovimo 6 ciklov inokulacije. S tem zagotovimo, da je konzervans, ki smo ga uporabili, stabilen v formulaciji ne samo v kratkem časovnem obdobju, ampak tudi med shranjevanjem in uporabo (9). Testa po standardu ISO 11930 in Ph. Eur. 8 trajata 2 tedna manj kot test Schülke KoKo. Kljub temu, da je test iz Ph. Eur. 8 prilagojen za farmacevtske pripravke, so njegovi kriteriji bolj ohlapni, kot kriteriji testa ISO 11930. Ta je primeren predvsem za vodotopne formulacije in formulacije, ki se mešajo z vodo, zato smo izbrali slednjega.

1.2 Testni mikroorganizem

Med kvasovkami, patogenimi za človeka, je najpomembnejši rod *Candida*, najpogostejše so kandidoze z vrsto *Candida albicans*. Pojavljajo se tudi okužbe s kvasovkami iz rodu *Malassezia*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ter drugimi vrstami kvasovk iz rodu *Candida*. Poleg okužb na površini kože lahko povzročajo tudi veliko resnejše sistemske

okužbe. Pri obrambi pred okužbami je osrednjega pomena celična imunost, pomembne pa so tudi normalna dejavnost fagocitov, makrofagov in humoralna imunost. Dovzetnost za okužbe povečujejo zdravljenje s širokospektralnimi antibiotiki, imunosupresivi, diabetes, nekatere endokrine bolezni in bolezni, ki zmanjšujejo celično imunost organizma. Kvasovke vrste *Candida albicans* so fakultativni patogeni, kar pomeni, da njihova prisotnost ne pomeni vedno okužbe, ampak so del zdrave flore orofarinksa, prebavne cevi in vagine (12).

Candida albicans ima več morfoloških oblik, ki se spreminjajo glede na pH, temperaturo in hranila v okolju. Ko raste na standardnih laboratorijskih medijih za glive, se nahaja v okrogli obliki in raste v gladkih belih kolonijah, ima pa tudi sposobnost rasti v obliki pseudohif in hif ter tvorbo blastospor in klamidospor. Ravno zaradi velikih zmožnosti spreminjanja fenotipa je *Candida albicans* tako patogena (13).

1.3 Konzervansi

Konzervansi so snovi, ki jih dodajamo v kozmetične izdelke in izdelke za osebno nego z namenom, da zaščitijo izdelke pred mikrobiološko kontaminacijo med transportom, shranjevanjem in uporabo. Kozmetični izdelek lahko poleg konzervansov vsebuje tudi druge sestavine (npr. rastlinske izvlečke) ki imajo protimikrobno delovanje, vendar navadno niso tako učinkovite kot konzervansi. Idealen konzervans ima definirano kemijsko zgradbo, je kompatibilen s sestavinami kozmetičnega izdelka in embalažo, je stabilen kljub spremembam temperature, učinkovit v širokem pH območju, je brez barve, vonja in okusa, ter najpomembneje, ni toksičen v uporabljeni masi ali koncentraciji. Konzervansi so bolj učinkoviti v višjih količinah, učinkovitost pa se jim lahko poveča, če jih uporabimo v kombinaciji z drugimi protimikrobnimi sestavinami ali kelatorji kovinskih ionov. Pri izbiri kislinskega konzervansa moramo paziti, da bo v kozmetičnem izdelku v nedisociirani obliki, saj je le takrat učinkovit. Za vsak konzervans moramo določiti minimalno inhibitorno koncentracijo, ki je najnižja koncentracija konzervansa, ki prepreči rast mikroorganizmov, vendar pa jih ne ubije (14).

Konzervansi, ki so dovoljeni za uporabo v kozmetičnih izdelkih, so navedeni v Prilogi V Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih. Tam so navedene najvišje dovoljene koncentracije, ter omejitve in opozorila, ki morajo biti navedena na embalaži kozmetičnih izdelkov. V Uredbi je tudi jasno navedeno, da konzervansov ne smemo dodajati zato, da bi prikrili, da

izdelek ni proizveden po protokolu dobre proizvodnje prakse ali da smo uporabili vhodne surovine slabe kakovosti (15). Kljub dokazani učinkovitosti konzervansov, se predvsem na področju naravne kozmetike pojavljajo dvomi o njihovi varnosti, predvsem v povezavi s parabeni in konzervansi, ki sproščajo formaldehid. Prvi naj bi izkazovali šibko estrogeno delovanje in s tem zbuvali polemike o povezanosti z rakom na dojki (14), drugi pa naj bi povzročali draženje kože (16). Uporaba metil- in etilparabena v kozmetiki še vedno ostaja enaka, ker ju uvrščamo med varne snovi. O varnosti parabenov z daljšo verigo (predvsem butil- in propilparabena) pa poroča tudi SCCS, saj nedvoumnih dokazov o nasprotnem še ni, zaradi pomanjkanja podatkov o izpostavljenosti in toksikokinetičnih študijah na ljudeh. (17, 18).

Mehanizmi delovanja konzervansov so različni, najpogosteje gre za lizo celic zaradi poškodb celične stene ali denaturacije proteinov. Delimo jih na alkohole, derivate gvanidina, organske živosrebrove spojine, kvaterne amonijeve spojine, aromatske spojine, kisline in njihove estre, tvorilce formaldehida in druge (14).

Za testiranje smo izbrali protimikrobne učinkovine iz različnih skupin, uporabili pa smo najnižje koncentracije, ki bi naj še delovale, ter visoke koncentracije, ki so za polovico nižje od najvišjih dovoljenih po Uredbi o kozmetičnih izdelkih (15) pri izdelkih, ki se sperejo iz kože.

1.3.1 Organske kisline in njihovi estri

Organske kisline se nahajajo v rastlinah, vendar je njihova izolacija mnogokrat predraga, zato v kozmetiki uporabljamo njihove sintezne nadomestke. Organske kisline naj bi v splošnem učinkoviteje delovale fungicidno kot proti bakterijam. Problematična je tudi njihova topnost v vodi. Delujejo pri pH, ki je nižji od pKa kisline, nad to mejo pa tvorijo sicer v vodi bolj topne, vendar za konzerviranje neuporabne soli. Organske kisline imajo poleg protimikrobnega še mnoge druge učinke. Nekatero kot konzervanse uporabljamo tudi v živilski industriji. Testirali smo dehidroocetno, benzojsko, salicilno in sorbinsko kislino, ki so že navedene v Prilogi V Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih (15), vendar so zaradi svojega izvora vseeno primerne za uporabo v naravni kozmetiki. Preizkusili smo tudi tri protimikrobne snovi, ki še niso navedene v Uredbi. Janeževa oziroma 4-metoksibenzojska kislina se v naravi nahaja v janežu in koromaču. V kozmetiki se uporablja za prekrivanje vonja drugih sestavin, delovala naj bi tudi fungicidno. V kombinaciji z drugimi sestavinami bi se lahko uporabljala kot konzervans (19). Uporabili

smo tudi levulinsko kislino, ki je po uporabi in izvoru zelo podobna janeževi (20). Testirali smo tudi vodno raztopino dehidroocetne kisline in benzilalkohola, ki jo na tržišču najdemo pod zaščitenim imenom Cosgard, oziroma Geogard® 221 (21). Gliceril kaprilat je monoglicerid glicerola in kaprilne kisline, in se navadno pridobiva s hidrolizo in zaestrenjem kokosovega ali palmovega olja. Zaradi svoje amfifilne strukture ima močne protimikrobne značilnosti, saj zmanjša površinsko napetost in omogoči boljše močenje celic, ter tako poveča penetracijo konzervansa v celico. Deluje v širšem razponu pH, hkrati pa kožo vlaži in neguje. Primeren je za uporabo v izdelkih za nečisto kožo, saj močno protimikrobno deluje tudi na *Propionibacterium acnes* (22).

1.3.2 Alkoholi

Alkoholi proti mikroorganizmom delujejo tako, da povzročijo škodo na membrani celic, denaturacijo proteinov in na koncu lizo celic zaradi motenj v metabolizmu. Etanol v kozmetiki uporabljamo predvsem kot topilo in sotpilo, vendar pa je že vrsto let znan kot protimikrobno sredstvo. Problematika visokih koncentracij etanola v kozmetičnih izdelkih je izsuševanje kože in pospeševanje penetracije kozmetičnih sestavin. Uporaba fenoksietanola v kozmetiki narašča, saj zaradi svojega dobrega širokospektralnega protimikrobnega delovanja nadomešča manj zelene konzervanse, ki sproščajo formaldehid in parabene (23). Vendar pa je fenoksietanol bistveno manj proučen kot parabeni in je v uporabi manj časa, zato podatkov o njegovih dolgoročnih neželenih učinkih še nimamo. Fenoksietanol in že prej omenjen benzilalkohol sta uvrščena na seznam dovoljenih konzervansov v prilogi V (15).

1.3.3 Protimikrobni peptidi

Protimikrobni peptidi so prisotni v skoraj vseh živih bitjih, kjer so pomemben del prirojenega imunskega sistema. Izoliramo jih lahko iz različnih rastlinskih ali živalskih tkiv. Mi smo testirali filtrat fermenta korenine redkvice, ki ga najdemo pod zaščitenim imenom Leucidal. Proizvajajo ga s pomočjo mlečnokislinske bakterije *Leuconostoc kimchii*. Poleg dobrih protimikrobnih lastnosti naj bi tudi vlažil in negoval kožo (24).

1.3.4 Rastlinski ekstrakti

Rastlinske ekstrakte že leta uporabljamo za najrazličnejše namene v medicini, kozmetiki, prehrani in farmaciji. Ekstrakt grenivkinih pečk vsebuje polifenole in flavonoide, ki naj bi imeli antioksidativno in protimikrobno aktivnost (25). Pojavljajo pa se polemike o

naravnosti tega ekstrakta, saj polifenolne sestavine grenivke s kemijskimi postopki pretvorijo v kvaterne amonijeve spojine (14).

2 Namen dela

V diplomski nalogi bomo preizkusili delovanje 12. različnih protimikrobnih snovi na razrast glive *Candida albicans* v emulziji za dermalno uporabo z izzivnim testom po standardu ISO 11930. Ustreznost izdelanih dermalnih emulzij bomo preizkusili z določanjem celokupnega števila mikroorganizmov, 2 in 4 mesece po izdelavi, emulzije pa bomo shranjevali v hladilniku na približno 5° C in na sobni temperaturi. Postopek, ki ga bomo uporabili, je opisan v 8. izdaji Evropske farmakopeje (v poglavju 2. 6. 12. *Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests* (07/2010: 20612), kriteriji za določitev ustreznosti pa v poglavju 5. 1. 4. *Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use* (01/2014: 50140)). Za zagotavljanje optimalnega konzerviranja kozmetičnih izdelkov bomo preizkusili nizke in srednje koncentracije izbranih protimikrobnih snovi in s pomočjo zgoraj omenjenih testov določili najustreznejše. Za negativno kontrolo bomo uporabili emulzijo za dermalno uporabo brez dodanih protimikrobnih snovi, za pozitivno kontrolo pa zmes metil- in propilparabena v nizki, srednji in visoki koncentraciji.

3 Materiali in metode

3.1 Laboratorijska oprema

Avtoklav Systec 2540 EL, Bel-Art Products, Pequannock, ZDA

Avtoklava A-21 in A63 CV, Kambič, Semič, Slovenija

Hladilnik, Gorenje, Velenje, Slovenija

Inkubator WTB, Binder, Tuttlingen, Nemčija

Komora z laminarnim pretokom zraka LFVP 12, Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija

Magnetna mešalnica Rotamix 606 MMH in 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija

pH meter 691, Metrohm, Herisan, Švica

Pipeta accu-jet® pro, BrandTech® Scientific, Essex, ZDA

Pipete Research (10-100, 20-200 in 100-1000 µL), Eppendorf, Hamburg, Nemčija

Stresalnik Vibromix 10, Tehnica, Železniki, Slovenija

Sušilnik WTB, Binder, Tuttlingen, Nemčija

Tehnica Exacta 610 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija

Vodna kopel GFL 1013, Burgwedel, Nemčija

Zamrzovalnik, Gorenje, Velenje, Slovenija

3.2 Kemikalije

100 % etanol, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

70 % etanol, Carlo Erba, Val de Reuil, Francija

Benzojska kislina, Caesar&Loretz GmbH, Hilden, Nemčija

Cetearil alkohol, Aliacura, Hamburg, Nemčija

Cetearil glukozid, Alexmo cosmetics, Weyhe, Nemčija

Cosgard, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija

Dehidroocetna kislina, Sigma-Aldrich, Aldrich chemistry, Švica

Dermosoft GMCY, Aliacura, Hamburg, Nemčija

Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Sigma-Aldrich, Nemčija

Ekstrakt grenivkinih pečk, Grenifit kapljice, Lekarne Maribor, Maribor, Slovenija

Eugon LT 100 liquid broth, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francija

Fenoksietanol, Sigma-Aldrich, Fluka analytical, Nemčija

Glicerol, Pharmachem Sušnik, Ljubljana, Slovenija

Janeževa kislina, Sigma-Aldrich, Aldrich chemistry, Kitajska

Kalijev dihidrogen fosfat, Kemika, Zagreb, Hrvaška
Karitejevo maslo, Gadmar Köhler, Alpen, Nemčija
Kloramfenikol, Sigma, Sigma-Aldrich, Kitajska
Ksantan, Dragonspice Naturwaren, Reutlingen, Nemčija
Leucidal, Alexmo cosmetics, Weyhe, Nemčija
Levulinska kislina, Sigma-Aldrich, Aldrich chemistry, ZDA
Mandljevo olje, Lekarna Ljubljana, Ljubljana, Slovenija
Metilparaben, Fagron B.V., Capelle aan de IJssel, Nizozemska
Natrijev klorid, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
Polisorbat 80, Sigma-Aldrich, Nemčija
Propilparaben, Caesar&Loretz GmbH, Hilden, Nemčija
Rehidracijska tekočina za Bioball™, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francija
Salicilna kislina, Kemika, Zagreb, Hrvaška
SDA, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Španija
Sorbinska kislina, Caesar&Loretz GmbH, Hilden, Nemčija
Tripton, Sigma-Aldrich, Fluka Analytical, ZDA
TSA, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francija

3.3 Biološki material

Candida albicans ATCC 8739, IP 48.72, NCPF 3179, CIP48.72, NBRC1594, WDCM00054, Bioball™, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francija

3.4 Izdelava testnih emulzij

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo izbrali 12 protimikrobnih snovi in po pregledu literature ugotovili, v kakšnih koncentracijah se navadno uporabljajo. Izbrali smo nizke in srednje koncentracije, saj smo želeli zagotoviti, da bo konzerviranje izdelane emulzije učinkovito pri najnižji možni koncentraciji. Izdelali smo emulzije tipa olje v vodi, primerne za dermalno uporabo po recepturi, opisani v *Preglednici VI*. Izdelali smo 24 testnih emulzij z nizkimi in srednjimi koncentracijami izbranih protimikrobnih snovi, tri emulzije z različnimi koncentracijami zmesi metil- in propilparabena za pozitivno kontrola in emulzijo brez konzervansov, ki jo bomo uporabili za negativno kontrolo.

Preglednica VI: Emulzija za dermalno uporabo

Emulzija za dermalno uporabo			
Surovina		Masa	Funkcija v emulziji
1	Karitejevo maslo	2,0 g	Emolient
	Mandljevo olje	11,2 g	Emolient
	Cetearil alkohol	0,5 g	Emolient
	Trden konzervans	Glej <i>Preglednico VII</i>	Konzervans
2	Voda	do 100,0 g	Topilo, disperzni medij
	Cetearil glukozid	0,8 g	Emulgator
3	Glicerol	5,0 g	Vlažilec, topilo
	Ksantan	0,4 g	Povečevalec viskoznosti
4	Tekoč konzervans	Glej <i>Preglednico VII</i>	Konzervans

Najprej smo surovine 1. faze natehtali v pateno in jih dali na vodno kopel, segreto na približno 90° C in počakali, da so se stalile. Nato smo v stehtano pateno natehtali cetearil glukozid ter ga po dodatku približno 5 mL mrzle vode v njej raztrli. Homogeno zmes smo dali na vodno kopel in ji po spremembi konsistence dodali preostanek vode, ki smo jo do vretja segrevali na kuhalniku. Talino surovin 1. faze smo dodali k 2. fazi in pateno z vodne kopeli predstavili v ledeno kopel, ter jo homogenizirali s paličnim mešalnikom 2 minuti. Emulzijo smo nato s pestilom mešali do ohladitve. Na tehtalni čolniček smo natehtali ksantan in mu dodali glicerol, ter ga v njem raztrli. 3. fazo smo med mešanjem dodali v ohlajeno emulzijo in mešali do zvišanja viskoznosti. Tekoče konzervanse (4. fazo) smo dodali v končano emulzijo, v kolikor konzervansa nismo že dodali v 1. fazo. Na koncu smo z mlačno vodo dopolnili maso do 100,0 g in emulzijo še enkrat dobro premešali s pestilom. Na koncu smo vsem emulzijam uravnali pH na približno 5,5 z 90 % raztopino mlečne kisline v vodi ali vodno nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata. Z uravnavanjem vrednosti pH smo zagotovili, da bo le-ta primeren za delovanje večine konzervansov, hkrati pa tudi primeren za dermalno aplikacijo. Emulzije smo po izdelavi prenesli v 50 mL centrifugirke (vsak vzorec v dveh paralelah), jih ustrezno označili, ter jih do uporabe hranili v hladilniku, na približno 5° C.

V *Preglednici VII* so napisane nizke in visoke koncentracije konzervansov, ki smo jih dodali v izdelane emulzije za dermalno uporabo. Dodana večja količina konzervansa

pomeni manjšo količino dodane vode, ostale sestavine iz *Preglednice VI* so pri vseh izdelanih vzorcih v enakih količinah.

Preglednica VII: Koncentracije dodanih konzervansov

Konzervansi		Nizke koncentracije (g/100 g emulzije)	Srednje koncentracije (g/100 g emulzije)
Tekoči konzervansi	Dehidroocetna kislina	0,15	0,3
	Vodna raztopina dehidroocetne kisline in benzilalkohola	0,2	0,4
	Ekstrakt grenivkinih pečk	0,1	0,5
	Etanol	14	17
	Fenoksietanol	0,25	0,5
	Filtrat fermenta korenine redkvice	1	1,5
Trdni konzervansi	Benzojska kislina	0,13	0,25
	Gliceril kaprilat	0,3	0,5
	Janeževa kislina	0,05	0,15
	Levulinska kislina	0,2	0,25
	Salicilna kislina	0,13	0,25
	Sorbinska kislina	0,15	0,3
	Zmes metil- in propilparabena (7:3)	0,1	
	0,4		
	0,8		

3.5 Določanje celokupnega števila mikroorganizmov

Mikrobiološko ustreznost vseh izdelanih emulzij smo preizkusili s pomočjo testa določanja celokupnega števila mikroorganizmov, ki je podrobneje opisan v 8. izdaji Evropske farmakopeje (v poglavju 2.6.12. *Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests* (07/2010: 20612)). Vzorčne emulzije smo najprej ustrezno redčili s puferško raztopino peptona in natrijevega klorida (*Preglednica VIII*), nato 1 mL prenesli v sterilne petrijevke s premerom 9 cm in dodali približno 15 do 20 mL segretega (največ 48° C) agarne gojišča TSA oziroma SDA (*Preglednica IX*). Rahlo smo premešali in počakali, da se gojišče ohladi in strdi. Pred uporabo smo gojišči TSA in SDA segreti in nato ohladili na temperaturo med 48 in 45° C. Petrijevke z gojiščem TSA smo do 5 dni inkubirali na 32,5° C ± 2,5° C in preverjali razrast bakterijskih kolonij. Na

petrijevkah z gojiščem SDA, ki smo jih inkubirali do 5 dni na sobni temperaturi, pa smo pričakovali razrast kolonij gliv in plesni.

Vse delo (razen tehtanja vzorčnih emulzij in priprave reagentov) je potekalo aseptično v komori z laminarnim pretokom zraka.

Preglednica VIII: Puferska raztopina peptona in natrijevega klorida

Puferska raztopina peptona in natrijevega klorida	
Kemikalija	Količina
Kalijev dihidrogenfosfat	3,6 g
Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat	7,2 g
Natrijev klorid	4,3 g
Tripton	1,0 g
Prečiščena voda	do 1000 mL
Polisorbat 80	1g/L

Navedene količine kemikalij smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v predpisani količini prečiščene vode, z 1M HCl ali NaOH smo uravnali pH na 7,0 in avtoklavirali. Do uporabe smo raztopino shranjevali na sobni T.

Preglednica IX: Gojišči TSA in SDA

Gojišči TSA in SDA	
Gojišče	Količina
TSA:	40 g
Pankreasni razgradek kazeina	15,0 g
Papajin razgradek sojine moke	5,0 g
Natrijev klorid	5,0 g
Agar	15,0 g
Prečiščena voda	do 1000 mL
SDA:	65 g
Dekstroza	40,0 g
Peptidni razgradek živalskega tkiva	5,0 g
Pankreasni razgradek	5,0 g

kazeina	
Agar	15,0 g
Kloramfenikol	50 mg (uporabljen v konc. 50 mg/L)
100% etanol	1 mL
Prečiščena voda	do 1000 mL

Predpripravljeno gojišče smo natehtali, ga s pomočjo magnetnega mešala raztopili v predpisani količini prečiščene vode, avtoklavirali in do uporabe shranjevali v vodni kopeli ali sušilniku na 60-70° C. Gojišču SDA smo pred avtoklaviranjem dodali kloramfenikol, ki smo ga predhodno raztopili v etanolu, ostanek pa shranili v zamrzovalniku na -20° C.

3.6 Izvedba izzivnega testa

Nadaljnje smo mikrobiološko stabilnost izdelanih emulzij preizkusili z izzivnim testom, ki smo ga izvedli po standardu ISO 11930. Emulzije smo inokulirali s točno določeno koncentracijo glive *Candida albicans* in spremljali naraščanje oziroma upad njene koncentracije 7, 14, 21 in 28 dni po inokulaciji.

3.6.1 Priprava inokuluma in inokulacija

Najprej smo si pripravili kalibriran inokulum, s katerim smo okužili vzorčne emulzije. Liofilizirano kroglico (Bioball™) s sevom *Candida albicans* ATCC 8739 smo suspendirali v rehidracijski tekočini (BioMérieux) in ga z diluentom redčili do koncentracije $1,1 \cdot 10^7$ CFU/mL. Diluent smo pripravili po opisu v *Preglednici X*. Za izvedbo testa učinkovitosti medija za deaktivacijo, smo si pripravili še inokulum s koncentracijo $1,1 \cdot 10^3$ CFU/mL, in sicer tako, da smo osnovno suspenzijo po korakih redčili z diluentom.

Preglednica X: Diluent.

Diluent	
Kemikalija	Količina
Tripton	1,0 g
Natrijev klorid	8,5 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Navedene količine kemikalij smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v predpisani količini prečiščene vode, z 1M HCl ali NaOH smo uravnali pH na $7,0 \pm 0,2$ in avtoklavirali. Do uporabe smo raztopino shranjevali na sobni T.

Nato smo v 50 mL centrifugirke odtehtali po 20 g vzorčnih emulzij in jim dodali 200 μ L kalibriranega inokuluma, tako, da je končna koncentracija glive *Candida albicans* v vzorcih znašala $1,1 \cdot 10^5$ CFU/mL. Vzorčne emulzije smo skladiščili na sobni temperaturi.

3.6.2 Test učinkovitosti medija za deaktivacijo

Hkrati smo izvedli tudi test učinkovitosti medija za deaktivacijo. Uporabili smo dermalne emulzije z višjimi koncentracijami konzervansov, oziroma najvišjo koncentracijo pri negativni kontroli. 1 g vzorčnih formulacij smo natehtali v 15 mL centrifugirke in jih dispergirali v 9 mL medija za deaktivacijo, pripravljenega po opisu v *Preglednici XI*. Testne formulacije smo pustili v kontaktu z medijem za deaktivacijo 30 min \pm 15 min. Vzorcem (oznaka N_{vf}) smo nato dodali po 1 mL inokuluma do končne koncentracije $1,1 \cdot 10^2$ CFU/mL. Pripravili smo tudi kontrolo inokuluma (oznaka N_v): 1 mL inokuluma smo dispergirali v 10 mL diluenta. Naredili smo tudi kontrolo toksičnosti medija za deaktivacijo do uporabljenega testnega mikroorganizma (oznaka N_{vn}) za katero smo 1 mL diluenta dispergirali v 9 mL medija za deaktivacijo in dodali 1 mL inokuluma. Od vseh vzorcev smo po predpisanem obdobju inokulacije odvzeli 1 mL vzorca, ga prenesli na sterilne petrijevke in dodali segreto agarno gojišče SDA. Vsak test smo naredili v dveh paralelah. Pred uporabo smo gojišče SDA ohladili na 48-45° C. Ko se je gojišče na petrijevkah strdilo, smo ga inkubirali na $32,5^\circ \text{C} \pm 2,5^\circ \text{C}$ od 48 do 72 ur in ročno prešteli kolonije mikroorganizmov.

S primerjavo vrednosti N_v in N_{vn} se bomo prepričali, da medij za deaktivacijo ni toksičen za izbrani mikroorganizem. Ustreznost medija za deaktivacijo pa bomo določili tako, da bomo vrednosti N_{vf} primerjali s polovično vrednostjo N_{vn} .

Preglednica XI: Medij za deaktivacijo konzervansa

Medij za deaktivacijo konzervansa	
Kemikalija	Količina
Eugon LT 100 liquid broth:	37,4 g
Pankreasni razgradek kazeina	15,0 g
Papajin razgradek sojine moke	5,0 g

Natrijev klorid	4,0 g
L-cistin	0,7 g
Natrijev sulfit	0,2 g
Glukoza	5,5 g
Jajčni lecitin	1,0 g
Polisorbat 80	5,0 g
Oktoksinol 9	1,0 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Navedeno količino predpripravljenega medija za deaktivacijo smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v predpisani količini prečiščene vode, z 1M HCl ali NaOH smo uravnali pH na $7,0 \pm 0,2$ in avtoklavirali. Do uporabe smo raztopino shranjevali na sobni T.

3.6.3 Izzivni test

Za izvedbo izzivnega testa smo si pripravili diluent (*Preglednica X*), medij za deaktivacijo (*Preglednica XI*) in gojišče SDA (*Preglednica IX*), ki je primerno za rast glive *Candida Albicans*, s katero smo okužili vzorce dermalnih emulzij. Gojišču SDA pri izvedbi izzivnega testa nismo dodajali kloramfenikola. Pred uporabo smo ga vedno ohladili na 48-45° C.

1 g testnih emulzij smo natehtali v 15 mL centrifugirke in jim dodali 9 mL medija za deaktivacijo. Po preteku 30 ± 15 min smo vzorce z diluentom redčili od 100 do 100 000 - krat. 1 mL ustrezno redčenih vzorcev smo prenesli v petrijevke in dolili 15-20 mL gojišča SDA. Za vsak vzorec smo pripravili dve paraleli. Inkubirali smo jih na $32,5^{\circ} \text{C} \pm 2,5^{\circ} \text{C}$ od 48 do 72 ur. Nato smo ročno prešteli in ocenili izvor zraslih kolonij na petrijevkah. To smo ponovili 7, 14, 21 in 28 dni po inokulaciji vzorčnih emulzij. Vse delo (razen tehtanja vzorčnih emulzij in priprave reagentov) je potekalo aseptično v komori z laminarnim pretokom zraka.

4 Rezultati

4.1 Rezultati testa celokupnega določanja mikroorganizmov

Za zagotovitev kriterijev mikrobiološke ustreznosti, opisanih v Ph. Eur. 8 (v poglavju 5. 1. 4. *Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use* (01/2014: 50140)), lahko dermalni pripravek vsebuje koncentracije mikroorganizmov, ki so navedene v *Preglednici I*.

Farmakopeja določa, da je najvišja meja sprejemljivosti za dermalne pripravke 2-kratnik predpisane vrednosti, iz tega sledi:

10^1 CFU/mL: na mediju SDA lahko zraste 20 kolonij gliv ali plesni

10^2 CFU/mL: na mediju lahko TSA zraste 200 kolonij aerobnih mikroorganizmov

Testirali smo dermalne emulzije 2 meseca in 4 mesece po izdelavi. Emulzije smo hranili v hladilniku na približno 5° C in na sobni temperaturi, ki se je gibala med 20 in 25° C. Vse vrednosti TAMC in TYMC iz Preglednice VIII ustrezajo zgoraj navedenim kriterijem, kar pomeni, da določeno celokupno število mikroorganizmov ne presega dovoljenih vrednosti.

Preglednica XII: Celokupno število mikroorganizmov v dermalnih emulzijah

Konzervansi in uporabljene koncentracije		2 meseca		4 meseci			
		5° C		5° C		20 – 25° C	
		TAMC (CFU/mL)	TYMC (CFU/mL)	TAMC (CFU/mL)	TYMC (CFU/mL)	TAMC (CFU/mL)	TYMC (CFU/mL)
Ekstrakt grenivke	0,1%	0	0	1	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Benzojska kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	1	0	0	0
Gliceril kaprilat	0,3%	0	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	1	0	0	0
Etanol	14%	0	0	0	0	0	0
	17%	0	0	1	0	0	0
Sorbinska kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Salicilna kislina	0,13%	1	0	1	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Levulinska kislina	0,2%	1	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	1	0	0	0
Fenoksietanol	0,25%	1	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0

Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	1	0	1	0	2	0
	0,4%	0	0	0	0	0	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	0	0	0	0	0	0
	1,5%	0	0	0	0	0	0
Janeževa kislina	0,05%	0	0	0	0	0	0
	0,15%	1	0	0	0	0	0
Dehidroocetna kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Metil- in propilparaben (7:3), POZ. KONTR.	0,1%	1	0	0	0	0	0
	0,4%	0	0	1	0	0	0
	0,8%	0	0	0	0	0	0
Brez konzervansa, NEG. KONTR.		0	0	0	0	1	0

Pred samostojnim delom za diplomsko nalogo sem sodelovala tudi v eksperimentih na Katedri za farmacevtsko biologijo, s katerimi smo določili celokupno število mikroorganizmov v dermalnih emulzijah, ki smo jih hranili na sobni temperaturi, takoj po izdelavi ter 2 meseca po izdelavi. Ugotovili smo, da so vse emulzije, v obeh časovnih točkah, ustrezale kriterijem, ki so zapisani v Farmakopeji. V okviru teh eksperimentov so določili tudi začetno število mikroorganizmov v emulzijah takoj po izdelavi in ugotovili, da vse ustrezajo kriterijem.

4.2 Rezultati izživnega testa

4.2.1 Prikaz učinkovitosti delovanja medija za deaktivacijo konzervansa

Medij za deaktivacijo je učinkovit, ko dobljene vrednosti ustrezajo spodnjima kriterijema:

$$N_v = N_{vn}$$
$$N_{vf} \geq 0,5 \cdot N_{vn}$$

Najprej smo ugotovili, da je viabilnost inokuluma brez dodane dermalne emulzije po dodatku medija za deaktivacijo (N_{vn}) približno enaka viabilnosti inokuluma brez dermalne emulzije in medija za deaktivacijo (N_v). To pomeni, da deaktivator, ki smo ga uporabili, ni toksičen za glivo *Candida albicans*. Nato smo 0,5-kratno vrednost N_{vn} primerjali s povprečnim številom kolonij, zrastlih na petrijevkah, na katerih smo preverjali viabilnost inokuluma ob prisotnosti različnih vzorcev dermalnih emulzij (N_{vf}). Izkazalo se je, da je za vse vzorce 0,5-kratna vrednost N_{vn} nižja od vrednosti N_{vf} , iz česar lahko sklepamo, da medij za deaktivacijo uspešno zavre delovanje konzervansov že pri 10-kratni redčitvi.

V *Preglednici XIV* je napisano povprečno število zrastlih kolonij mikroorganizmov za posamezne vzorce ter ocena ustreznosti glede na kriterij $N_{vf} \geq 0,5 \cdot N_{vn}$.

Preglednica XIII: Prikaz učinkovitosti delovanja medija za deaktivacijo

Konzervansi in uporabljene koncentracije		Povprečno št. kolonij na petrijevkah \bar{x}	$0,5 \cdot N_{vn} = 109,63$	Ustreznost
Ekstrakt grenivke	0,5%	194,5	> 109,63	✓
Benzojska kislina	0,25%	182,5	> 109,63	✓
Gliceril kaprilat	0,5%	186	> 109,63	✓
Etanol	17%	194	> 109,63	✓
Sorbinska kislina	0,3%	189,5	> 109,63	✓
Salicilna kislina	0,25%	191,51	> 109,63	✓
Levulinska kislina	0,25%	178	> 109,63	✓
Fenoksietanol	0,5%	205,2	> 109,63	✓
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,4%	212	> 109,63	✓
Filtrat fermenta korenine redkvice	1,5%	178	> 109,63	✓
Janeževa kislina	0,15%	207	> 109,63	✓

Dehidroocetna kislina	0,3%	207	> 109,63	✓
Metil- in propilparaben (7:3)	0,8%	181	> 109,63	✓
Nvn			219,25	
Nv			221,75	

*Nvn: inokulum, brez dermalne emulzije, Nv: inokulum, brez dermalne emulzije in medija za deaktivacijo

Iz pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da bo medij za deaktivacijo pri vzorcih dermalnih emulzij, ki imajo nižje koncentracije konzervansov prav tako učinkovit.

4.2.2 Kriteriji ustreznosti za izzivni test

S pomočjo izračuna logaritma zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov lahko ugotovimo, ali določena formulacija ustreza kriterijem standarda ISO 11930 predstavljenim v *Preglednici III*.

Izračun logaritma zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov je potekal po naslednjih korakih:

Za vrednost N_0 smo vzeli koncentracijo inokuluma s suspendiranim mikroorganizmom v času T_0 (inokulacija dermalnih emulzij), $\rightarrow 1,1 \cdot 10^5$ CFU/mL.

Število preživelih mikroorganizmov N_7 , N_{14} in N_{28} izračunamo iz števila prešteti viabilnih kolonij pridobljenih v časovnih točkah T_7 , T_{14} in T_{28} , tako, da upoštevamo ustrezno redčitev in volumen vzorca, ki smo ga nanесли na petrijevko: $N=C(d \cdot V)$.

Npr. na petrijevki je zrastle 250 kolonij (C), vzorec smo 100-krat redčili: faktor redčenja je 10^{-2} (d), na petrijevko pa smo nanесли volumen 1 mL (V), N v tem primeru je 25 000 CFU/mL.

Vrednosti R_x nato izračunamo po enačbi: $R_x = \log N_0 - \log N_x$.

V *Preglednici XV* je predstavljeno število kolonij ob določenih časovnih točkah, dopisan je izračun logaritmskega zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov in ustreznost po kriterijih ISO 11930.

Preglednica XIV: Ustreznost dermalnih emulzij kriterijem po ISO 11930

Konzervansi in uporabljene koncentracije		N ₇ (CFU/mL)	R ₇	N ₁₄ (CFU/mL)	R ₁₄	N ₂₈ (CFU/mL)	R ₂₈	ISO
Ekstrakt grenivke	0,1%	15800	0,8	1560000	<0	4030000	<0	ne
	0,5%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Benzojska kislina	0,13%	150*	>1	0	>1	0	>1	A
	0,25%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Gliceril kaprilat	0,3%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	0,5%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Etanol	14%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	17%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Sorbinska kislina	0,15%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	0,3%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Salicilna kislina	0,13%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	0,25%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Levulinska kislina	0,2%	1000000	<0	2230000	<0	1850000*	<0	ne
	0,25%	1000000	<0	1180000	<0	2180000	<0	ne
Fenoksietanol	0,25%	860000	<0	306000	<0	165500	<0	ne
	0,5%	46000	0,4	25250	0,6	3750	>1	B
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	250*	>1	50*	>1	150*	>1	A
	0,4%	50*	>1	100*	>1	0	>1	A
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	1000000	<0	940000	<0	4220000	<0	ne
	1,5%	42175	0,4	471000	<0	2620000	<0	ne
Janeževa kislina	0,05%	20100	0,7	400*	>1	0	>1	A
	0,15%	23300	0,7	150*	>1	0	>1	A
Dehidroocetna kislina	0,15%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	0,3%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Metil- in propilparaben (7:3)	0,1%	1000000	<0	455000	<0	1260000	<0	ne
	0,4%	0	>1	0	>1	0	>1	A
	0,8%	0	>1	0	>1	0	>1	A
Brez konzervansa		2000000	<0	2720000	<0	7180000	<0	ne

* N_7 (število preživelih mikroorganizmov 7 dni po inokulaciji vzorca), N_{14} (število preživelih mikroorganizmov 14 dni po inokulaciji vzorca), N_{28} (število preživelih 28 dni po inokulaciji vzorca); R_7 (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 7 dni po inokulaciji vzorca), R_{14} (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 14 dni po inokulaciji vzorca), R_{28} (logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov 28 dni po inokulaciji vzorca)

Pri vrednostih N , ki imajo poleg številke dopisano zvezdico (*), je na petrijevkah zrastle manj kot 30 kolonij, kar je spodnja predpisana meja po standardu ISO 11930.

Preglednice z bolj podrobnimi podatki o izzivnem testu se nahajajo v poglavju **Priloge**.

5 Razprava

Cilj našega eksperimenta je bil dokazati in med seboj primerjati učinkovitost protimikrobnega delovanja 12 izbranih protimikrobnih snovi, ki bi se lahko uporabljale v naravni kozmetiki. Najprej smo preverili učinkovitost teh snovi tako, da smo določili celokupno število mikroorganizmov, ki so bili v vzorcih prisotni 2. in 4. mesece po izdelavi. Za učinkovite so se izkazale vse izbrane protimikrobne snovi. Kriterijem testa je ustrezala tudi dermalna emulzija brez dodanega konzervansa, ki je služila za negativno kontrolo. Iz tega lahko sklepamo, da je bil postopek izdelave emulzije aseptičen, sestavine, ki smo jih uporabili pa nekontaminirane. Pri preteklih eksperimentih se je za najbolj problematično sestavino, zaradi katere je prihajalo do kontaminacije, izkazala voda. Voda je bila predhodno sicer prečiščena s postopkom demineralizacije z reverzno osmozo, vendar se je najverjetneje kasneje okužila, ko je zastajala v ceveh (26, 27). Pred uporabo smo jo zato dodatno prekuhali najmanj 5 min.

Opazovali pa smo tudi, kako se mikrobiološka stabilnost dermalne emulzije spreminja glede na temperaturo, na kateri je hranjena. Vzorce smo zato hranili v hladilniku na približno 5° C, ter na sobni temperaturi, ki je nihala med 20 in 25° C. Pričakovali bi, da bodo dermalne emulzije hranjene na nižji temperaturi boljše ohranjale mikrobiološko stabilnost kot tiste na sobni temperaturi, saj le-ta omogoča hitrejšo rast večine mikroorganizmov. Razlika med vzorci ni bila značilna ne po 2 niti po 4 mesecih.

V nadaljevanju smo mikrobiološko stabilnost izdelanih dermalnih emulzij preizkusili še z izzivnim testom po standardu ISO 11930, pri katerem vzorce namerno okužimo s točno določeno koncentracijo izbranega mikroorganizma. V našem primeru smo za inokulacijo uporabili glivo *Candida albicans*. Upad oziroma narast začetne koncentracije glive *Candida albicans* smo preverili 7., 14. in 28. dan po inokulaciji preko izračuna logaritemskega zmanjšanja koncentracij.

Kriterij A standarda ISO 11930 za glivo *Candida albicans* narekuje, da mora biti logaritmsko zmanjšanje večje ali enako 1 po 7. dneh, po 14. in 28. dneh pa mora biti zmanjšanje večje ali enako 1, hkrati pa ne sme priti do povečanja števila zrastlih kolonij na petrijevkah. Temu kriteriju so ustrezale: visoka koncentracija ekstrakta grenivke, benzojska kislina, gliceril kaprilat, etanol, sorbinska kislina, salicilna kislina, vodna raztopina dehidroocetne kisline in benzilalkohola, janeževa kislina, dehidroocetna kislina

ter zmes metil- in propilparabena v srednji (0,4%) in visoki (0,8%) koncentraciji. Pri kritičnem pregledu rezultatov bi se lahko pojavil dvom, če vodna raztopina dehidroocetne kisline in benzilalkohola res spada v kriterij A, saj je pri srednji koncentraciji konzervansa iz točke T₇ na točko T₁₄ koncentracija preživelih kolonij *Candida albicans* iz 50 CFU/mL zrastle na 100 CFU/mL, prav tako pa je pri nizki koncentraciji konzervansa koncentracija preživelih kolonij iz točke T₁₄ na točko T₂₈ narastle iz 50 CFU/mL na 150 CFU/mL. Odločili smo se, da ta porast ni dovolj značilen, da bi spojino uvrstili v kriterij B, ali celo kot neustrezno, ker je na petrijevkah, ki smo jih uporabili pri izračunu koncentracije N zrastle manj kot 30 kolonij.

Kriterij B standarda ISO 11930 za glivo *Candida albicans* pa narekuje, da mora biti logaritemsko zmanjšanje večje ali enako 1 po 14. dneh, 28. dneh pa mora biti zmanjšanje večje ali enako 1, hkrati pa ne sme priti do povečanja števila zrastlih kolonij na petrijevkah. Temu kriteriju je ustrezala le srednja koncentracija fenoksietanola.

Za neučinkovite po standardu ISO 11930 so se izkazale: nizka koncentracija ekstrakta grenivke, levulinska kislina, nizka koncentracija fenoksietanola, filtrat fermenta korenine redkvice ter nizka koncentracija (0,1%) zmesi metil- in propilparabena. Problematična se zdi predvsem levulinska kislina, saj je bila koncentracija preživelih kolonij *Candida albicans* s časom ne le vedno višja, ampak tudi znatno višja, kot pri vzorcu brez konzervansa. Samo na osnovi rezultatov izzivnega testa bi lahko sumili, da je bil okužen sam konzervans, vendar dermalna emulzija z levulinsko kislino pri testu celokupnega določanja mikroorganizmov ni kazala pretirane mikrobiološke aktivnosti, saj ni bila povečana rast ne bakterij niti gliv ali plesni. Vzroke za povišano koncentracijo preživelih kolonij *Candida albicans* moramo iskati pri inokulaciji samega vzorca. Lahko se je zgodilo, da smo pri pipetiranju suspenzije mikroorganizma zajeli področje, kjer je bila koncentracija nekoliko višja, zaradi hitrega posedanja mikroorganizmov v neviskoznem mediju, kot je voda. Presenetljivo se je za neučinkovito izkazala 0,1% zmes metil- in propilparabena, ki smo jo uporabili za pozitivno kontrolo. Glede na Prilogo V Uredbe (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih (15) je dovoljena koncentracija parabenov v izdelkih, ki se iz kože ne izperejo 0,4% za posamezen paraben, oziroma 0,8% za zmes parabenov. Glede na to, da naša emulzija vsebuje skoraj 80 % vode, ki je najbolj občutljiva za okužbo z mikroorganizmi smo izbrali prenizko koncentracijo in neprimerno kombinacijo

parabenov, saj je propilparaben, ki ga je v zmesi 0,03 % topen predvsem v lipofilni notranji fazi (28), 0,07 % metilparabena pa očitno ni dovolj, za učinkovito zaščito emulzije.

Pri izvajanju izzivnega testa smo imeli nekaj problemov z določanjem najustrežnejših redčitev vzorcev v različnih časovnih točkah, saj smo želeli, da bi na petrijevkah zrastle med 30 in 300 kolonij, hkrati pa razlika med dvema paralelama ni smela biti večja od 50 %. Rast glive *Candida albicans* je bila precej nepredvidljiva, zato smo vzorčenje ponovili tudi po 21. dneh, da bi pri vzorčenju po 28. dneh lažje izbrali primerne redčitve. Tabele s točnim številom zrastlih kolonij na petrijevkah se nahajajo v poglavju **Priloge**.

6 Sklep

Vsi kozmetični izdelki prisotni na evropskem trgu morajo imeti izdelano Dokumentacijo o kozmetičnem izdelku, to pa seveda velja tudi za kozmetične izdelke s surovinami naravnega izvora. Dokumentacija o kozmetičnem izdelku mora vsebovati tudi Poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka, ki med drugim zagotavlja tudi, da so izdelki primerno mikrobiološko stabilni. Mikrobiološko stabilnost večine izdelkov moramo dokazati z izvedbo izzivnega testa ter preizkusiti mikrobiološko kakovost končnega izdelka.

V tem diplomskem delu smo določili celokupno število mikroorganizmov 24 različnih dermalnih emulzij in ugotovili, da je bilo vseh 24. testnih emulzij, vključno s pozitivnimi in negativno kontrolo po kriterijih 8. izdaje evropske Farmakopeje mikrobiološko stabilnih. Eksperimentalno delo smo nadaljevali z izzivnim testom po standardu ISO 11930 s testnim mikroorganizmom *Candida albicans* na vseh dermalnih emulzijah. Določili smo, da so emulzijo po kriteriju A, ustrezno zaščitili: srednja koncentracija ekstrakta grenivke, benzojska kislina, gliceril kaprilat, etanol, sorbinska kislina, salicilna kislina, vodna raztopina dehidroocetne kisline in benzilalkohola, janeževa kislina, dehidroocetna kislina ter zmes metil- in propilparabena v srednji (0,4 %) in visoki (0,8 %) koncentraciji. Raven zaščite pa ni bila ustrezna pri konzervansu, ki je ustrezal kriteriju B (srednja koncentracija fenoksietanola), zato moramo po protokolu iz priloge A standardu ISO 11930 s pomočjo proizvodnega procesa, posebne ovojnine ali pogojev uporabe dvigniti raven zaščite, da bi uporabljen konzervans veljal za ustreznega. Konzervanse, ki so se izkazali za neustrezne, bi lahko nadaljnje preizkusili v najvišjih dovoljenih koncentracijah ali pa v različnih kombinacijah, s katerimi bi skušali doseči sinergistično delovanje.

Testiranje bi lahko nadaljevali tudi z drugimi testnimi mikroorganizmi, navedenimi v standardu ISO 11930. Tako ne bi dokazali le fungicidnega, ampak širokospektralno protimikrobno delovanje izbranih protimikrobnih snovi.

7 Literatura

(1) Pomembnost uporabe prečiščene vode:

http://www.purite.com/wpcontent/uploads/2014/03/Purite-Cosmetics_The-importance-of-purified-water-White-Paper-Feb-2014.pdf (Dostopano 17. 1. 2016)

(2) Smernice v zvezi s Prilogo I k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih, 2013, 315/82, 1-24

(3) Uredba (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, 2009, 342/59

(4) Smernice za testiranje stabilnosti kozmetičnih izdelkov CE/CTFA, 2004: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=20> (Dostopano 17. 1. 2016)

(5) Proksch E: The skin: an indispensable barrier. Exp Dermatol. 2008; 17 (12): 72

(6) Seigert W: Microbiological Quality Management for the Production of Cosmetics and Detergents. SOFW Journal 2012; 11 (138): 2-9

(7) Uredba o izvajanju Uredbe (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, Člen 7, 2013, 61/2013, 7130: <https://www.uradni-list.si/1/content?id=114088> (Dostopano 17. 1. 2016)

(8) Evropska farmakopeja, 8.0 izdaja (Ph. Eur. 8.0), 2014: 185-189, 505-506, 559

(9) Siegert W: A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW Journal 2012, 7: 44-53

(10) SCCS1501/12: The SCCS's Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 8th revision, 2012

(11) Mednarodna organizacija za standardizacijo, ISO (the International Organization for Standardization), 11930, Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product, 2012, 2-20

(12) Kansky A: Kožne in spolne bolezni, Združenje dermatovenerologov, Ljubljana, 2002: 88-91

- (13) Encyclopedia of life: <http://www.eol.org/pages/1013921/details> (Dostopano 18. 1. 2016)
- (14) Baumgartner S: Konzervansi v kozmetičnih izdelkih, Predavanje pri predmetu Kozmetični izdelki 1, 27. 3 2013
- (15) Uredba (ES) št. 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, Priloga V, 2009, 342, 317-330
- (16) Varvaresou A: Self-preserving cosmetics. International journal of cosmetic science 2009, 31: 165-175
- (17) Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. Int J Toxicol. 2008, 27 (4): 1-82
- (18) SCCS (Scientific Committee on Consumers Safety): Opinion on parabens, 2010
- (19) Dr. Straetmans Chemische produkte GmbH: Multifunctional additives: Dermosoft® 688 20011-1
- (20) Organske kisline kot konzervansi:
<http://www.ingredientsofstyle.com/2013/07/ingredient-of-week-food-grade.html>
(Dostopano 19. 1. 2016)
- (21) Geogard221:
<https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/762/31266/Geogard-221>
(Dostopano 18. 1. 2016)
- (22) Dermosoft® GMCY:
<https://www.ulprospector.com/en/la/PersonalCare/Detail/2448/77571/dermosoft-GMCY>
(Dostopano 19. 1. 2016)
- (23) Bohn S: Phenoxyethanol-induced urticaria. Allergy 2001, 56: 922-923
- (24) Leucidal: <http://activemicrotechnologies.com/wp-content/uploads/2014/04/M15008-Leucidal-Liquid-Technical-Data-Sheet-v14.pdf> (Dostopano 19. 1. 2016)
- (25) Ekstrakt grenivkinih pečk:
http://www.mb-lekarne.si/slo/izdelki/izdelek/19/grenifit_kapljice (Dostopano 19. 1. 2016)

- (26) Štepic B: Preizkus učinkovitosti konzerviranja različnih sestavin naravnega izvora v dermalni formulaciji z uporabo bakterije *Staphylococcus aureus*. Diplomsko delo, 2015
- (27) Tanjšek K. T: Prikaz učinkovitosti konzerviranja različnih sestavin naravnega izvora v dermalni formulaciji z uporabo glive *Candida albicans*. Diplomsko delo, 2015
- (28) Brittain H: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Vol. 30, Elsevier Academic Press, Boston, 2003: 235-269

8 Priloge

8.1 Priloga 1: Test delovanja medija za deaktivacijo

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

Preglednica XV: Test delovanja medija za deaktivacijo

SDA, 10x redčitev			
Oznaka vzorca	Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij
	1.	2.	\bar{x}
Ekstrakt grenivke	187	202	194,5
Benzojska kislina	173	192	182,5
Gliceril kaprilat	165	207	186
Etanol	188	200	194
Sorbinska kislina	195	184	189,5
Salicilna kislina	202	181	191,5
Levulinska kislina	164	189	178
Fenoksietanol	193	218	205,2
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalk.	218	206	212
Filtrat fermenta korenine redkvice	194	162	178
Janeževa kislina	234	180	207
Dehidroocetna kislina	211	203	207
Metil- in propilparaben (7:3), 0,8%	187	175	181
Nvn	227	224	225,5
	209	217	213
Nv	235	228	231,5
	219	205	212

*Nvn: inokulum, brez dermalne emulzije, Nv: inokulum, brez dermalne emulzije in medija za deaktivacijo

8.2 Priloga 2: Izzivni test

V Preglednici XVII so prikazani izzivnega testa 7 dni po inokulaciji. Osenčene so povprečne vrednosti št. kolonij, ki smo jih uporabili v nadaljnjih izračunih.

Preglednica XVI: Izzivni test, 7 dni po inokulaciji

Konzervansi in koncentracija		SDA, 100x redčitev			SDA, 1000x redčitev		
		Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij	Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij
		1.	2.	\bar{x}	1.	2.	\bar{x}
Ekstrakt grenivke	0,1%	144	172	158	28	17	22,5
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Benzojska kislina	0,13%	2	1	1,5	1	0	0,5
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Gliceril kaprilat	0,3%	0	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Etanol	14%	0	0	0	0	0	0
	17%	0	0	0	0	0	0
Sorbinska kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Salicilna kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Levulinska kislina	0,2%	TMTC	TMTC	TMTC	≅1000	≅1000	≅1000
	0,25%	TMTC	TMTC	TMTC	≅1000	≅1000	≅1000
Fenoksietanol	0,25%	TMTC	TMTC	TMTC	843	876	859,5
	0,5%	446	417	431,5	57	35	46
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	3	2	2,5	0	0	0
	0,4%	1	0	0,5	0	0	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	TMTC	TMTC	TMTC	≅1000	≅1000	≅1000
	1,5%	359	408	383,5	27	65	46
Janeževa kislina	0,05%	152	217	201	32	20	26
	0,15%	230	235	232,5	25	31	28
Dehidroocetna kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Metil- in propilparaben (7:3)	0,1%	TMTC	TMTC	TMTC	905	≅1000	≅1000
	0,4%	0	0	0	0	0	0
	0,8%	0	0	0	0	0	0
Brez konzervansa		TMTC	TMTC	TMTC	≅2000	≅2000	≅2000

V Preglednici XVII so prikazani izzivnega testa 14 dni po inokulaciji. Osenčene so povprečne vrednosti št. kolonij, ki smo jih uporabili v nadaljnjih izračunih.

Preglednica XVII: Izzivni test, 14 dni po inokulaciji

Konzervansi in koncentracija		SDA, 100x redčitev			SDA, 1000x redčitev		
		Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij	Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij
		1.	2.	\bar{x}	1.	2.	\bar{x}
Ekstrakt grenivke	0,1%	TMTC	TMTC	TMTC	1100	2016	1558
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Benzojska kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Gliceril kaprilat	0,3%	0	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Etanol	14%	0	0	0	0	0	0
	17%	0	0	0	0	0	0
Sorbinska kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Salicilna kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Levulinska kislina	0,2%	245*	201*	223*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,25%	123*	112*	118*	TMTC	TMTC	TMTC
Fenoksietanol	0,25%	16*	23*	19,5*	413	421	417
	0,5%	165	165	165	30	38	34
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	1	0	0,5	0	0	0
	0,4%	1	1	1	1	0	0,5
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	79*	109*	94*	TMTC	TMTC	TMTC
	1,5%	TMTC	TMTC	TMTC	430	511	470,5
Janeževa kislina	0,05%	2	6	4	1	0	0,5
	0,15%	1	2	1,5	0	0	0
Dehidroocetna kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Metil- in propilparaben (7:3)	0,1%	42*	49*	45,5*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,4%	0	0	0	0	0	0
	0,8%	0	0	0	0	0	0
Brez konzervansa		316*	227*	271,5*	TMTC	TMTC	TMTC

*10 000x redčitev

V Preglednici XVIII so prikazani izzivnega testa 21 dni po inokulaciji. Osenčene so povprečne vrednosti št. kolonij, ki smo jih uporabili v nadaljnjih izračunih.

Preglednica XVIII: Izzivni test, 21 dni po inokulaciji

Konzervansi in koncentracija		SDA, 100x redčitev			SDA, 1000x redčitev		
		Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij	Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij
		1.	2.	\bar{x}	1.	2.	\bar{x}
Ekstrakt grenivke	0,1%	384*	384*	384*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Benzojska kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Gliceril kaprilat	0,3%	0	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Etanol	14%	0	0	0	0	0	0
	17%	0	0	0	0	0	0
Sorbinska kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Salicilna kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Levulinska kislina	0,2%	1136*	1132*	1134*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,25%	107*	201*	154*	TMTC	TMTC	TMTC
Fenoksietanol	0,25%	16*	20*	18*	166	219	192,5
	0,5%	105	110	107,5	20	18	19
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	1	1	1	0	0	0
	0,4%	0	0	0	0	0	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	333*	387*	360*	TMTC	TMTC	TMTC
	1,5%	190*	306*	275*	TMTC	TMTC	TMTC
Janeževa kislina	0,05%	1	1	1	1	1	1
	0,15%	1	0	0,5	0	0	0
Dehidroocetna kislina	0,15%	1	0	0,5	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Metil- in propilparaben (7:3)	0,1%	159*	155*	157*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,4%	0	0	0	0	0	0
	0,8%	0	0	0	0	0	0
Brez konzervansa		429*	525*	477*	TMTC	TMTC	TMTC

*10 000x redčitev

V Preglednici XIV so prikazani izzivnega testa 28 dni po inokulaciji. Osenčene so povprečne vrednosti št. kolonij, ki smo jih uporabili v nadaljnjih izračunih.

Preglednica XIV: Izzivni test, 28 dni po inokulaciji

Konzervansi in koncentracija		SDA, 100x redčitev			SDA, 1000x redčitev		
		Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij	Št. kolonij na petrijevki		Povprečna vrednost št. kolonij
		1.	2.	\bar{x}	1.	2.	\bar{x}
Ekstrakt grenivke	0,1%	364*	441*	402,5*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Benzojska kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Gliceril kaprilat	0,3%	0	0	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0	0	0
Etanol	14%	0	0	0	0	0	0
	17%	0	0	0	0	0	0
Sorbinska kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Salicilna kislina	0,13%	0	0	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0	0	0
Levulinska kislina	0,2%	18**	19**	18,5**	TMTC	TMTC	TMTC
	0,25%	210	225	217,5	TMTC	TMTC	TMTC
Fenoksietanol	0,25%	616	1600	1108	130	201	165,5
	0,5%	36	39	37,5	2	7	4,5
Vodna raztopina dehidrooc. kis. in benzilalkohola	0,2%	1	2	1,5	0	0	0
	0,4%	0	0	0	0	0	0
Filtrat fermenta korenine redkvice	1%	368*	476*	422*	TMTC	TMTC	TMTC
	1,5%	239*	285*	262*	TMTC	TMTC	TMTC
Janeževa kislina	0,05%	0	0	0	0	0	0
	0,15%	0	0	0	0	0	0
Dehidroocetna kislina	0,15%	0	0	0	0	0	0
	0,3%	0	0	0	0	0	0
Metil- in propilparaben (7:3)	0,1%	116*	135*	125,5*	TMTC	TMTC	TMTC
	0,4%	0	0	0	0	0	0
	0,8%	0	0	0	0	0	0
Brez konzervansa		864*	572*	718*	TMTC	TMTC	TMTC

* 10 000x redčitev

** 100 000x redčitev