

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAEL AVSEC

**OCENA VARNE UPORABE FENOLNIH ANTIOKSIDANTOV IN NJIHOVIH
DERIVATOV V KOZMETIČNIH IZDELKIH**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAEL AVSEC

**OCENA VARNE UPORABE FENOLNIH ANTIOKSIDANTOV IN NJIHOVIH
DERIVATOV V KOZMETIČNIH IZDELKIH**

**EVALUATION OF SAFE USE OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS AND THEIR
DERIVATIVES IN COSMETIC PRODUCTS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag farm.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za vso pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za vso pomoč in podporo v času študija in pisanja magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag farm.

Mihael Avsec

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	II
KAZALO GRAFOV	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 Kozmetični izdelki.....	1
1.1.1 Sestava kozmetičnih izdelkov	2
1.2 Varnost kozmetičnega izdelka	4
1.2.1 Zakonodaja	4
1.2.2 Ocena varnosti kozmetičnega izdelka	6
1.3 Antioksidanti.....	6
1.3.1 Fenolni antioksidanti	10
1.4 Koža.....	11
1.4.1 Dermalna (perkutana) absorpcija	11
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Kreme za obraz	14
3.2 Losjoni in mleka za telo.....	15
3.3 Šminke	16
3.4 Maskare.....	17
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	19
4.1 Fenolni antioksidanti v izbranih kozmetičnih izdelkih.....	19
4.2 Toksikološki profili fenolnih antioksidantov prisotnih v izbranih kozmetičnih izdelkih.....	20
4.2.1 Tokoferol.....	20

4.2.2	<i>Tokoferil acetat</i>	31
4.2.3	<i>Butil-hidroksitoluen (BHT)</i>	36
4.2.4	<i>Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat (PTHHC)</i>	44
4.2.5	<i>Butil-hidroksianizol (BHA)</i>	48
4.2.6	<i>Propil-galat (PG)</i>	54
4.3	OCENA VARNOSTI FENOLNIH ANTIOKSIDANTOV	59
5	SKLEP.....	66
6	LITERATURA.....	69

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primer reakcije fenolnega antioksidanta z radikalom. P – predstavlja (polimerno) verigo (16).	10
Slika 2:	Strukturni formuli tokoferolov in tokotrienolov. Kiralni centri so označeni z zvezdico (*) (24).	21
Slika 3:	Strukturne formule α (alfa), β (beta), γ (gama) in δ (delta) tokoferola (23).	22
Slika 4:	Predlagane metabolne poti (36).	27
Slika 5:	Strukturna formula α (alfa) – tokoferil acetata (40).	31
Slika 6:	Strukturna formula butil-hidroksitoluena (47).	36
Slika 7:	Strukturna formula pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat (57).	44
Slika 8:	Strukturni formuli dveh izomerov BHA (60).	48
Slika 9:	Strukturna formula propil-galata (65).	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Primarni oz. pravi antioksidanti – fenolni antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).	8
Preglednica 2:	Reducirajoči antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).	8

Preglednica 3: Sinergistični antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).	9
Preglednica 4: Pregled zastopanosti fenolnih antioksidantov v izbranih kozmetičnih izdelkih.	19
Preglednica 5: Število kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo 1, 2 oz. 3 fenolne antioksidante.	20
Preglednica 6: Primerjava koncentracij tokoferola v kozmetičnih izdelkih z načini oz. mesti izpostavitve v letih 2013 in 1999 (24).	24
Preglednica 7: Tokoferol ekvivalenti (običajno) izraženi v mg (28).	25
Preglednica 8: Fizikalno-kemijske lastnosti α -tokoferola (35).	25
Preglednica 9: Metaboliti tokoferola (36).	26
Preglednica 10: Absorpcija α -tokoferola v žive plasti kože (37).	28
Preglednica 11: Penetracija α -tokoferola skozi kožo (37).	28
Preglednica 12: Primerjava koncentracij tokoferil acetata v kozmetičnih izdelkih z načini oz. mesti izpostavitve v letih 2013 in 1999 (24).	32
Preglednica 13: Fizikalno kemijske lastnosti α -tokoferil acetata (41).	32
Preglednica 14: Delež (%) v živih plasteh kože prisotnega α -tokoferola glede na celokupno količino v koži prisotnega α -tokoferil acetata in njegovega metabolita α - tokoferola (42).	33
Preglednica 15: Pojav neoplazem po subkutani aplikaciji (26).	35
Preglednica 16: Fizikalno-kemijske lastnosti butil-hidroksitoluena (47).	37
Preglednica 17: BHT metaboliti v človeškem urinu (48, 51, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).	38
Preglednica 18: Fizikalno-kemijske lastnosti PTHHC (57).	45
Preglednica 19: Fizikalno – kemijske lastnosti BHA (60).	49
Preglednica 20: Fizikalno – kemijske lastnosti propil-galata (65).	55
Preglednica 21: Vrednosti LD50, NOAEL in ADI.	59
Preglednica 22: Dopustne zgornje meje vnosa (UL).	60
Preglednica 23: Dermalna absorpcija (DA) fenolnih antioksidantov.	60

Preglednica 24: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) fenolnih antioksidantov v obraznih kremah.	62
Preglednica 25: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) ter delež »pokoriščenega« UL (%UL) fenolnih antioksidantov v losjonih in mlekih za telo.	62
Preglednica 26: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) fenolnih antioksidantov v šminakah.....	63
Preglednica 27: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) fenolnih antioksidantov v maskarah.....	63
Preglednica 28: Primerjava fenolnih antioksidantov glede na genotoksičnost, kancerogenost, okularno iritacijo ter iritacijo in senzitivizacijo kože.	64

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Količina absorbiranega α -tokoferola v odvisnosti od aplicirane koncentracije (37).	28
---	----

POVZETEK

Fenolni antioksidanti in njihovi derivati se uporabljajo v farmacevtski, kozmetični in živilski industriji z namenom preprečevanja in upočasnjevanja oksidativnega razpada sestavin izdelkov. Procesi oksidacij sestavin kozmetičnega izdelka lahko privedejo do nastanka toksičnih produktov, spremembe barve in vonja ter posledično do izdelka, ki ni primeren za uporabo. Z dodatkom antioksidantov zagotovimo oksidativno stabilnost izdelka v času trajanja uporabe. Da je kozmetični izdelek kot celota varen za uporabo, pa moramo zagotoviti, da so varne prav vse komponente, ki tak izdelek sestavljajo. Tako je zelo pomembno, da so varni za uporabo tudi fenolni antioksidanti in njihovi derivati.

V magistrski nalogi smo, z namenom ugotavljanja prisotnosti fenolnih antioksidantov in njihovih derivatov, skupno pregledali 80 kozmetičnih izdelkov, tako s področja negovalne kot dekorativne kozmetike. Ugotovili smo, da praktično vsi kozmetični izdelki vsebujejo vsaj en fenolni antioksidant oz. njihov derivat. V največji meri je zastopan tokoferol, saj ga je vsebovalo kar 61,25% vseh pregledanih izdelkov. Sledijo mu tokoferil acetat (45%), butil-hidroksitoluen (BHT) (26,25%), Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinaamat (PTHHC) (7,5%), butil-hidroksianizol (BHA) (3,75%) in propil-galat (2,5%). Delež pregledanih kozmetičnih izdelkov, ki so vsebovali en fenolni antioksidant je znašal 61,3%, sledili so izdelki (31,2%), ki so vsebovali dva fenolna antioksidanta in izdelki (7,5%) s tremi fenolnimi antioksidanti.

Fenolne antioksidante, ki smo jih zasledili v kozmetičnih izdelkih smo s pomočjo literature toksikološko okarakterizirali in na koncu izdelali oceno varne uporabe. Ugotovili smo, da pogostost uporabe posameznega fenolnega antioksidanta nekako sledi njihovi toksičnosti, z izjemo PTHHC, ki se je izkazal za praktično netoksičnega, vsebovalo pa ga je le 6 izdelkov. Tako so po naraščajoči toksičnosti sledili tokoferol, ki je v kozmetičnih izdelkih tudi v največji meri zastopan, tokoferil acetat (derivat tokoferola), BHT, propil-galat in BHA. Pri oceni varne uporabe smo ugotovili, da se ob predvideni uporabi losjonov in mleka za telo, ki se aplicirajo skoraj na celotno površino kože telesa, sprejemljiv dnevni vnos (ADI) za tokoferol in tokoferil acetat prekorači. Prav tako je izračunana vrednost meje varne uporabe (MoS) za ta dva primera nižja od 100. Ob predvideni uporabi ostalih kozmetičnih izdelkov, ADI za vse v teh izdelkih vsebovane fenolne antioksidante ni prekoračen in v nobenem primeru ne preseže 10% določenega ADI. Prav tako so za te primere izračunane vrednosti MoS (občutno) višje od 100.

Ključne besede: fenolni antioksidanti, kozmetični izdelki, varna uporaba, toksikologija

ABSTRACT

Phenolic antioxidants and their derivatives are used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries with the aim to prevent and to slow down the oxidative decay of product components. Oxidation processes of ingredients of cosmetic products can lead to the formation of toxic products, discoloration and odor changes, consequently rendering the product unsuitable for use. With the addition of antioxidants we ensure oxidative stability of the product throughout the entire period of its shelf life. However, to ensure that the cosmetic product as a whole is safe for use, we must confirm that each of its constituents are safe in terms of toxicology. Thus, it is also very important that phenolic antioxidants and their derivatives are nontoxic and safe for use.

In the present work we investigated the presence of phenolic antioxidants and their derivatives in cosmetic products. Thus, we examined a total of 80 cosmetic products from fields of nourishing and decorative cosmetics. We found that virtually all cosmetic products contain at least one phenolic antioxidant or derivative thereof. Most frequently present was tocopherol, which was found in 61,25% of all the examined products, followed by tocopheryl acetate (45%), BHT (26,25%), PTHHC (7,5%), BHA (3,75%) and propyl-gallate (2,5%). According to the number of different phenolic antioxidants present in an individual product, we found that most frequently, that is 61,3% of cosmetic products contained only one phenolic antioxidant, followed by the presence of two (31,2%), and three (7,5%) different types of phenolic antioxidants.

Using the available literature we performed toxicological characterization of all phenolic antioxidants found in cosmetic products and ultimately prepared a risk assessment. We have found that the frequency of use of each of the phenolic antioxidants somehow follows their toxicity, with the exception of PTHHC, which turned out to be practically non-toxic and present in only six products. Thus, according to the increased toxicity PTHHC is followed in ascending order by tocopherol (most frequently used), tocopheryl acetate (a derivative of tocopherol), BHT, propyl-gallate and BHA. In a process of assessing safe use, we found that with intended use of body lotions and milks, which are applied almost on the entire skin surface of the body, the acceptable Daily Intake (ADI) for tocopherol and tocopheryl acetate are exceeded. In addition to that, calculated values of the Margin of Safety (MoS) for these two cases were less than 100. With intended use of all the other cosmetic products, ADI for all contained antioxidants was not exceeded and did not even exceed 10% of the specified ADI value. Finally, their calculated values of MoS were (significantly) higher than the 100.

Keywords: phenolic antioxidants, cosmetic products, safe use, toxicology

SEZNAM OKRAJŠAV

%ADI – delež »pokoriščenega« ADI

ADI – sprejemljiv dnevni vnos (ang. acceptable daily intake)

ADME – absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija

ANS – Svet EFSA za živilske aditive in hranilne vire, dodane živilom (ang. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food)

ASA – askorbinska kislina

ASP – askorbil-palmitat

BHA – butil-hidroksianizol

BHA-OH – 3-*terc*-butil-4,5-dihidroksianizol

BHA-o-O – 3-*terc*-butil-4,5-kinon

BHT – butil-hidroksitoluen

CAS – Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (ang. Chemical Abstracts Service)

CDMDHC – karboksidimetildecil-hidroksikroman

CDMOHC – karboksidimetiloktil-hidroksikroman

CEHC – karboksietil-hidroksikroman

CFR – Kodeks zveznih predpisov Združenih držav (ang. Code of Federal Regulations)

CMBHC – karboksimetilbutil-hidroksikroman

CMHHC – karboksimetilheksil-hidroksikroman

CosIng – Baza podatkov o sestavinah kozmetičnih proizvodov

CPNP – Notifikacijski portal za kozmetične izdelke (ang. Cosmetic Products Notification Portal)

DA – dermalna absorpcija

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kislina

EC – Evropska komisija (ang. European Commission)

EC₃ – koncentracija testne substance, ki inducira trikratno proliferacijo limfocitov glede na kontrolo

EC25 – koncentracija agonista, ki izzove 25% maksimalnega učinka

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

EFSA – Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)

EU – Evropska unija

FDA – Uprava ZDA za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)

GPMT – maksimizacijski preskus na morskih prašičkih (ang. Guinea Pig Maximisation Test)

GRAS – na splošno spoznano kot varno (ang. Generally Recognized as Safe)

Hb – hemoglobin

HCT – hematokrit

HMBP – 4-hidroksimetil-2,6-di-terc-butilfenol

HPRT – hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaza

HPT – kožni test z obližem izveden na človeku (ang. Human Patch Test)

HRIPT – ponavljajoči kožni test z obližem izveden na človeku (ang. Human Repeated Insult Patch Test)

IARC – Mednarodna agencija za raziskovanje raka (ang. International Agency for Research on Cancer)

IC50 – polovična inhibitorna koncentracija

INCI – mednarodna nomenklatura kozmetičnih sestavin (ang. The International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

IUPAC – Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (ang. The International Union of Pure and Applied Chemistry)

JECFA – Skupni strokovni odbor FAO/WHO za aditive za živila (ang. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

LD50 – srednja letalna doza

LLNA – test na lokalnih limfnih vozlih miši (ang. Local Lymph Node Assay)

LOAEL – najnižji odmerek, pri katerem je opažen neželen učinek (ang. Lowest Observed Adverse Effect Level)

logP_{ow} – logaritem porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda

MM – molekulska masa

MoS – meja varne uporabe (ang. Margin of Safety)

NACDG – Skupina za kontaktni dermatitis za Severno Ameriko (ang. The North American Contact Dermatitis Group)

NDGA – nordihidrogvaiaretinska kislina

NOAEL – najvišji odmerek, pri katerem še ni opaznih neželenih učinkov (ang. No Observed Adverse Effect Level)

OECD – Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (ang. Organisation for Economic Co-operation and Development)

PCPC – Svet za izdelke namenjene osebni negi (ang. Personal Care Products Council)

PG – propil-galat

PTHHC – Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinaamat

RBC – število eritrocitov (ang. Red Blood Cell count)

SCCS – Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (ang. Scientific Committee on Consumer Safety)

SCE – Preskus izmenjave sestrskih kromatid (ang. Sister Chromatid Exchange test)

SCF – Znanstveni odbor za prehrano (ang. Scientific Committee on Food)

SED – raven sistemske izpostavljenosti (ang. Systemic Exposure Dose)

SSA – površina kože izpostavljene kozmetičnemu izdelku (ang. Skin Surface Area)

SUE – Resni neželeni učinki (ang. Serious Undesirable Effects)

TBHQ – terc-butil-hidrokinon

TBQ – terc-butilkinon

TBQO – terc-butilkinon oksid

TGA – tioglikolna kislina

THBP – 2,4,5-trihidroksi-butirofenon

TLC – tankoplastna kromatografija

TT – telesna teža

UL – dopustna zgornja meja vnosa (ang. tolerable upper intake level)

UV-sevanje – Ultravijolično sevanje

1 UVOD

V današnjem času, z namenom ohranjanja lepote in zdravja, veliko ljudi vsakodnevno uporablja različne kozmetične izdelke. Posledično je za zadovoljitev potreb in želja uporabnikov na voljo široka paleta izdelkov, tako s področja negovalne kot tudi s področja dekorativne kozmetike. Ker smo kozmetičnim izdelkom izpostavljeni oz. jih uporabljamo dnevno, skozi vse življenje, je varnost le-teh poglavitnega pomena. Večina kozmetičnih izdelkov vsebuje sestavine, ki so podvržene oksidativnemu razpadu. Produkti, ki v kozmetičnem izdelku nastanejo kot posledica reakcij oksidacij, lahko ob uporabi povzročijo različne neželene učinke, kot je draženje kože. Prav tako pa prispevajo k drugim neželenim lastnostim, kot je pojav neprijetnega vonja in videza kozmetičnega izdelka. Zato v kozmetične formulacije dodajamo antioksidante, ki preprečujejo nastanek škodljivih oksidacijskih produktov. Poleg omenjenega pa imajo antioksidanti v kozmetičnih izdelkih tudi funkcijo zaščite kože pred oksidativnim stresom. Tako je potrebno kot za vse ostale sestavine zagotoviti, da se v kozmetičnih izdelkih uporabljajo le antioksidanti, ki so varni za uporabo.

1.1 KOZMETIČNI IZDELKI

V Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih je opredeljeno, da kozmetični izdelek:

»... pomeni katero koli snov ali zmes, namenjeno stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasiščem, nohti, ustnicami in zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljenja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja.« (1)

Iz zgornje definicije lahko razberemo, da pojem kozmetični izdelek zajema širok repertoar izdelkov, ki se razlikujejo ne samo po sestavinah, ki jih vsebujejo, temveč tudi po končni obliki izdelka oz. formulaciji. Medtem ko je na voljo veliko število različnih vrst kozmetičnih izdelkov, poznamo le približno 10 različnih formulacij oz. končnih oblik, kot so raztopine, emulzije (kreme, losjoni), mazila in paste, suspenzije, geli, prahovi, trdni izdelki v obliki paličic, tablet in valjev, ter aerosoli (2).

Glede na uporabo kozmetičnih izdelkov pa le-te delimo na negovalne in dekorativne kozmetične izdelke, pri čemer so, kot že ime navaja, negovalni kozmetični izdelki

namenjeni negi telesa, dekorativni kozmetični izdelki pa dekoraciji oz. okraševanju telesa. V današnjem času pa so na voljo tudi izdelki, ki imajo hkrati negovalno in dekorativno funkcijo.

1.1.1 Sestava kozmetičnih izdelkov

Velika raznolikost kozmetičnih izdelkov tako z vidika uporabe kot z vidika končnih oblik oz. formulacij zahteva široko paleto sestavin z ustreznimi lastnostmi in funkcionalnostmi. Da je zadoščeno omenjenim potrebam, je danes na voljo širok nabor sestavin, ki se uporabljajo pri izdelavi oz. proizvodnji kozmetičnih izdelkov. Tako glavne skupine kozmetičnih sestavin predstavljajo:

- Voda

Voda predstavlja najpogosteje uporabljano sestavino (topilo) v kozmetičnih formulacijah, ki ima funkcijo hidrofilnega nosilca. Da zagotovimo ustrezno stabilnost in kakovost končnega izdelka, moramo v formulaciji uporabiti vodo ustrezne kakovosti oz. čistosti. Tako za pripravo večjih količin vode z ustrezno čistostjo uporabljamo tehnike kot so ionska izmenjava, destilacija in reverzna osmoza (3, 4).

- Lipofilne sestavine

Lipofilne sestavine v kozmetičnih izdelkih imajo funkcijo zadrževanja vode v roženi plasti kože, kar je posledica okluzivnega delovanja (prekritje površine) ob nanosu na kožo. Posnemajo učinek naravnih lipidnih dvoslojev in tako preprečujejo izhlapevanje vode iz površine kože. Poleg omenjenega imajo funkcijo lipofilnega topila v kozmetičnem izdelku. So sestavine, ki se uporabljajo v trdnih, poltrdnih in tekočih izdelkih kot so šminke, mazila, kreme in losjoni. Med lipofilne sestavine spadajo olja, maščobe, višje maščobne kisline in alkoholi, voski, ogljikovodiki in silikoni (3, 4, 5).

- Hidrofilne sestavine

V kozmetičnih izdelkih se uporabljajo za zadrževanje vlage v izdelku. Po uporabi oz. nanosu, pa povišajo vsebnost vode v koži. Zaradi svoje higroskopnosti so sposobne ad/absorbirati vodo iz okolice in jo zadržati na mestu delovanja. Hidrofilne sestavine, ki se uporabljajo v kozmetičnih izdelkih so lahko naravnega ali sinteznega izvora. Mednje štejemo butilen-glikol, glicerol, mlečno kislino, pantenol, L-piroglutaminsko kislino, propilen-glikol, hialuronsko kislino, sorbitol in sečnino (3, 4, 5).

- Površinsko aktivne snovi

So amfifilne snovi, ki vsebujejo tako hidrofilni kot lipofilni del molekule. Sposobne so zniževanja medfazne oz. površinske napetosti mejne površine med dvema tekočinama, ki se med seboj ne mešata. V kozmetičnih izdelkih se uporabljajo kot močljivci, emulgatorji, stabilizatorji, čistilna sredstva, itd. Po kemizmu jih delimo na anionske, kationske, amfoterne in neionske. Pogosti predstavniki v kozmetiki so soli višjih maščobnih kislin, alkil-sulfati, alkil-amini, kvarterne amonijeve spojine, betaini, višji maščobni alkoholi, itd. Uporabljajo se v kremah, losjonih, čistilnih sredstvih, šamponih, itd (3, 4, 5).

- Zgoščevalci

Uporabljajo se za povečevanje viskoznosti kozmetične formulacije z namenom zagotavljanja enostavnejše uporabe oz. aplikacije, kot tudi za stabilizacijo produkta. Tako npr. pri emulzijah (losjoni, mleka za telo, kreme) sodelujejo pri preprečevanju ločevanja faz in na ta način stabilizirajo izdelek. Mednje sodijo vodotopni polimeri kot so derivati celuloze, alginati, škrob, kolagen, itd (4, 5).

- Konzervansi

Igrajo poglavitno vlogo pri zagotavljanju mikrobiološke neoporečnosti kozmetičnega izdelka in tako prispevajo k daljši obstojnosti ter posledično podaljšanju roka uporabe. Najpogosteje uporabljeni konzervansi v kozmetičnih izdelkih so parabeni (metil-paraben, propil-paraben), organske kisline (benzojska in sorbinska kislina), sproščevalci formaldehida (imidazolidinil urea, diazolidinil urea), izotiazolinoni in fenoksietanol (5, 6).

- Antioksidanti

Kozmetične izdelke poleg ostalih komponent sestavljajo snovi kot so maščobe, olja in voski. Take snovi imajo v kemijski strukturi prisotne nenasičene dvojne vezi, ki pa so lahko podvržene oksidaciji. V kozmetičnem izdelku pri reakcijah oksidacije nastajajo spojine neprijetnega vonja in lahko povzročajo različne neželene učinke. Zato, da preprečimo nastanek takih spojin in kontroliramo potek reakcij oksidacije, kozmetičnim izdelkom dodajamo antioksidante. Poleg omenjenega pa imajo po aplikaciji antioksidanti v koži tudi preventivno oz. zaščitno funkcijo. V telesu konstantno nastajajo radikali, ki med drugim povzročajo staranje kože. Tako je naloga antioksidantov zaščititi kožo pred radikali in preprečiti njeno prezgodnje staranje (4, 5).

- Ostale sestavine

Različne vrste kozmetičnih izdelkov lahko vsebujejo številne druge sestavine. Tako izdelki dekorativne kozmetike vsebujejo veliko različnih pigmentov in barvil. Izdelki za barvanje las vsebujejo neoksidativna in oksidativna barvila. Zobne paste vsebujejo sestavine proti kariesu, zobnemu kamnu in preobčutljivosti zob. Zaščitne kreme proti soncu pa vsebujejo organske in anorganske UV-filtre.

1.2 VARNOST KOZMETIČNEGA IZDELKA

Kozmetične izdelke uporabljajo milijoni ljudi po vsem svetu. Veliko ljudi jih uporablja vsak dan in skozi celotno življenjsko obdobje, tako je zaradi pogoste oz. ponovljive in dolgotrajne uporabe, zagotavljanje varnosti kozmetičnih izdelkov izrednega pomena (5). Posledično je varnost potrošnikov poglavitni cilj oz. zahteva, ki jo je pri proizvodnji in trženju kozmetičnih izdelkov, potrebno dosegati in zagotavljati (7).

1.2.1 Zakonodaja

V Evropi kozmetično industrijo ureja *Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih*, ki je v veljavi od 11. julija 2013. Uredba viša nivo varnosti kozmetičnih izdelkov in poenostavlja pravni okvir za vse subjekte v tem sektorju. Nadomestila je *Direktivo 76/768/EGS*, ki je bila sprejeta leta 1976 in kasneje večkrat dopolnjena (8).

Nova Uredba o kozmetičnih izdelkih tako predstavlja robustno in mednarodno priznano ureditev, katere namen je zagotoviti večjo varnost izdelkov ob upoštevanju najnovejših tehnoloških razvojnih trendov, vključno s potencialno uporabo nanomaterialov (8).

Zajema iste določbe o prepovedi testiranj na živalih kot predhodna Direktiva, ki je predstavljala regulatorni okvir za postopno odpravo testiranj posameznih sestavin in/ali končnih izdelkov na živalih za kozmetične namene. V veljavi sta dva koncepta prepovedi (8, 9).

- *Prepoved testiranja na živalih* – vključuje prepoved preizkušanja končnih kozmetičnih izdelkov na živalih, ki je v veljavi od 11. septembra 2004, in prepoved preizkušanja posameznih kozmetičnih sestavin na živalih, ki velja od 11. marca 2009 (9).

- *Prepoved trženja* – velja na ozemlju EU in obsega prepoved trženja kozmetičnih izdelkov in sestavin uporabljenih v kozmetičnih izdelkih, ki so bile za kozmetične namene preizkušene na živalih. Prepoved velja od 11. marca 2009 dalje za sestavine in končne izdelke za katere so bili izvedeni kakršnikoli toksikološki testi, z izjemo testov toksičnosti pri ponovljivih odmerkih, reproduktivne toksičnosti in toksikokinetike. Za te izjeme pa velja prepoved od 11. marca 2013 dalje, ne glede na to ali so oz. niso na voljo alternativni toksikološki preskusi (9).

Najpomembnejše spremembe uvedene z Uredbo o kozmetičnih izdelkih vključujejo:

- Okrepljene varnostne zahteve za kozmetične izdelke.

Proizvajalci morajo tako upoštevati posebne zahteve pri pripravi poročila o varnosti kozmetičnega izdelka pred dajanjem le-tega na trg (8).

- Uvedba pojma "odgovorna oseba".

Le kozmetični izdelki za katere je v EU določena pravna ali fizična oseba kot "odgovorna oseba", se lahko dajo na trg. Nova Uredba o kozmetičnih izdelkih omogoča natančno identifikacijo odgovorne osebe in jasno opredeljuje njene obveznosti (8).

- Centralizirano obveščanje o vseh kozmetičnih izdelkih, dostopnih na trgu EU.

Proizvajalec mora priglasiti svoj izdelek samo enkrat, in sicer preko Portala za obveščanje o kozmetičnih izdelkih (ang. Cosmetic Products Notification Portal - CPNP) (8).

- Uvedba poročanja resnih neželenih učinkov (ang. Serious Undesirable Effects - SUE).

Odgovorna oseba ima obveznost do poročanja o resnih neželenih učinkih pristojnim nacionalnim organom. Organi pa zbirajo tudi podatke, ki prihajajo s strani uporabnikov in zdravstvenih delavcev. Pridobljene podatke je potrebno deliti tudi z ostalimi državami članicami EU (8).

- Nova pravila za uporabo nanomaterialov v kozmetičnih izdelkih.

Barvila, konzervansi in UV-filtri, vključno s tistimi, ki so v obliki nanomaterialov, morajo biti izrecno dovoljeni. V kolikor bo imela Komisija pomisleke glede izdelkov, ki vsebujejo nanomaterialne, ki z Uredbo o kozmetičnih izdelkih niso prepovedani oz. drugače omejeni, bodo le-ti na nivoju EU predmet popolne ocene varne uporabe. Nanomateriali morajo biti označeni na seznamu sestavin z besedo "nano" v oklepaju za imenom posamezne snovi, npr. "titanov dioksid (nano)" (8).

Uredba o kozmetičnih izdelkih vsebuje tudi vrsto prilog. Priloga 1 opisuje poročilo o oceni varnosti kozmetičnega izdelka, ki mora biti sestavljeno za kozmetični izdelek preden je leta dan na trg. Priloge 2 – 6 predstavljajo sezname prepovedanih in dovoljenih snovi (konzervansi, barvila, UV-filtri, ...), ki se ne smejo oz. lahko uporabljajo v kozmetičnih izdelkih. Priloga 7 pa navaja simbole, ki se uporabljajo na primarni in sekundarni embalaži (1).

1.2.2 Ocena varnosti kozmetičnega izdelka

Ocena varnosti kozmetičnega izdelka se izdelava na podlagi ustreznih informacij o varnosti njegovih sestavin. Mnenja o varnosti posameznih sestavin pripravi Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (ang. Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS). Tako je pri pripravi mnenja o varnosti posamezne sestavine potrebno izvesti različne teste od identifikacije in fizikalno-kemijskih lastnosti spojine do toksikoloških študij. S toksikološkimi testi se ugotavlja akutna toksičnost, korozivnost in iritacija, senzitivizacija kože, dermalna absorpcija, toksičnost pri ponovljivih odmerkih, reproduktivna toksičnost, mutagenost in genotoksičnost, karcinogenost, toksikokinetika in fototoksičnost. Zaradi prepovedi izvajanja toksikoloških testov na živalih se uvajajo alternativne *in vitro* metode (1, 10).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Oksidacija je kemična reakcija pri kateri pride do prenosa elektrona (ali vodikovega atoma) z reducenta na oksidant. Reakcije oksidacije lahko privedejo do nastanka radikalov, ki sprožijo verižne radikalske reakcije, ki potekajo tako v kozmetičnem izdelku kot v celici. Antioksidanti preprečujejo oksidacijo drugih molekul tako, da se sami oksidirajo (reagirajo z oksidanti) oz. reagirajo z radikalskimi intermediati in tako preprečijo nadaljnji potek verižnih radikalskih reakcij (11).

Antioksidante dodajamo kozmetičnim izdelkom iz dveh razlogov.

- Z namenom zaščite kozmetičnega izdelka oz. njegovih sestavin pred oksidacijo (avtooksidacijo).

Izpostavljenost kozmetičnega izdelka kisiku v zračni atmosferi ali drugim oksidantom, privede do pojava reakcij oksidacij oz. oksidativnega razpada njegovih sestavin. Med

sestavine, ki so pogosto podvržene oksidacijam spadajo maščobne kisline, živalske maščobe in rastlinska olja. Produkti takih reakcij dražijo kožo in povzročajo neprijeten vonj (5).

- Z namenom preprečevanja oz. kontrole oksidativnega stresa v celicah oz. telesu (koži).

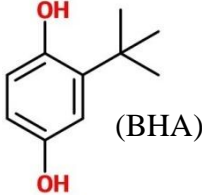
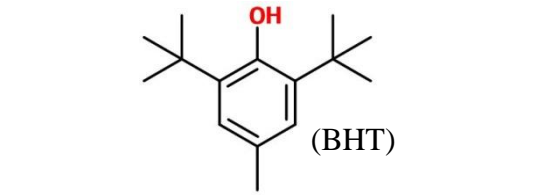
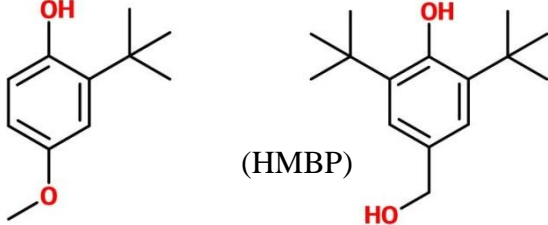
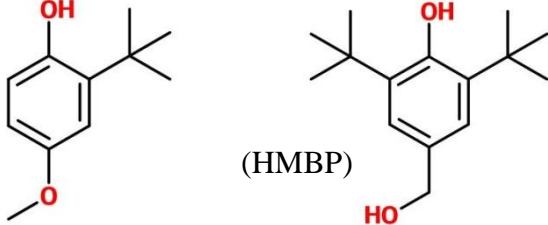
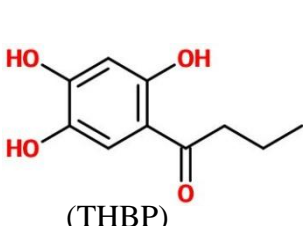
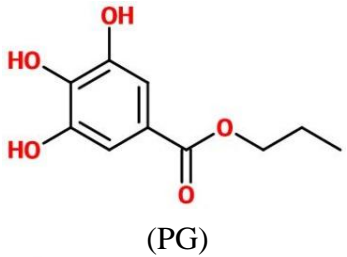
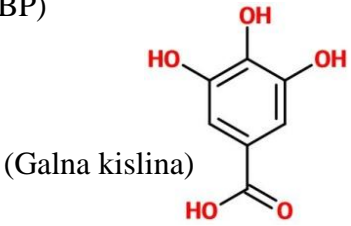
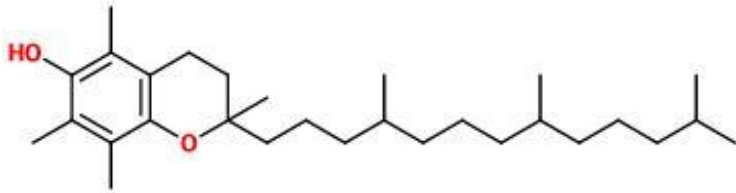
Telo je nenehno izpostavljeno oksidantom. Endogeni vir predstavlja metabolizem kot je celično mitochondrijsko dihanje. Eksogeni viri kot so dim, smog, UV-sevanje in hrana pa izhajajo iz okolja. Kot odgovor na pojav oksidantov, v telesu nastajajo (endogeni) antioksidanti kot sta glutation in sečna kislina. Običajno obstaja ravnotežje med nastalimi oksidanti in antioksidanti – homeostaza. Vendar pa se lahko v določenih primerih ravnotežje prevesi v prid oksidantom, kar imenujemo »oksidativni stres«, ki ima negativne učinke na celico oz. na njene komponente (4). Z uporabo kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo antioksidante lahko v koži povečamo koncentracijo le-teh, in tako preprečimo oksidativni stres.

Po mehanizmu delovanja antioksidante razdelimo v 3 skupine.

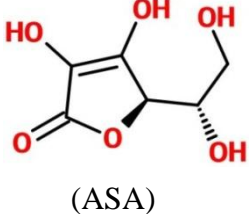
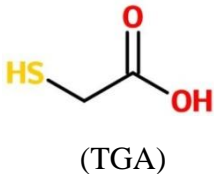
- Primarni ali pravi antioksidanti, ki zavirajo oksidacijo, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo potek verižnih reakcij (Slika 1). Predstavniki so alkil-galati, butil-hidroksianizol (BHA), butil-hidroksitoluen (BHT), nordihidrogvaiaretinska kislina (NDGA) in tokoferoli (12).
- Reducirajoči antioksidanti so substance z nižjim redoks potencialom od ostalih substanc prisotnih v kozmetični formulaciji. Posledično se lažje oksidirajo in tako pred oksidacijo zaščitijo ostale sestavine. Delujejo pa tudi tako, da reagirajo s prostimi radikali. Med nje uvrščamo askorbinsko kislino ter kalijeve in natrijeve soli žveplove kisline (12).
- Spojine, ki imajo same po sebi malo antioksidativnih lastnosti, vendar pa izboljšujejo delovanje primarnih antioksidantov, saj delujejo sinergistično, tako da reagirajo z ioni težkih kovin, ki katalizirajo oksidacije. Sinergistični antioksidanti so citronska kislina, EDTA in njene soli ter lecitinska in vinska kislina (12).

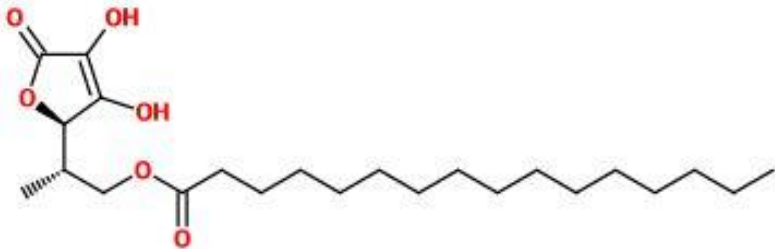
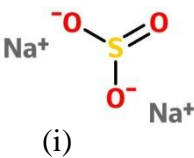
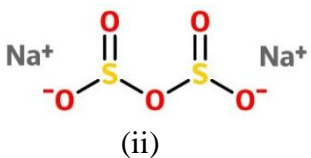
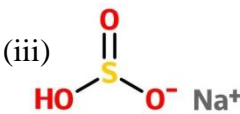
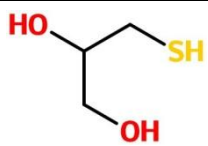
V spodnjih preglednicah 1 – 3 so s strukturnimi formulami prikazani tipični predstavniki posameznih skupin antioksidantov (12).

Preglednica 1: Primarni oz. pravi antioksidanti – fenolni antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).

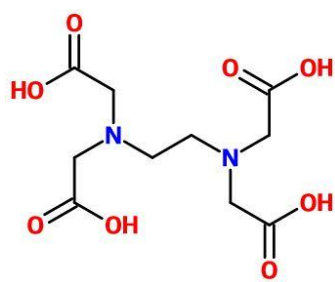
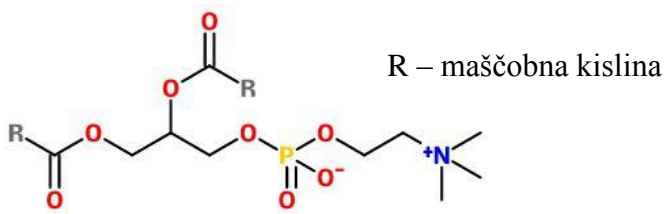
Vrsta antioksidantov	Strukturne formule
butil-hidroksitoluen (BHT)	
butil-hidroksianizol (BHA)	
terc-butil-hidrokinon (TBHQ)	
4-hidroksimetil-2,6-di-terc-butilfenol (HMBP)	
2,4,5-trihidroksibutirofenon (THBP)	
Propil-galat (PG)	
Galna kislina	
alfa-Tokoferol	

Preglednica 2: Reducirajoči antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).

Vrsta antioksidantov	Strukturne formule
Askorbinska kislina (ASA)	
Tioglikolna kislina (TGA)	

Vrsta antioksidantov	Strukturne formule
Askorbil palmitat (ASP)	
Natrijev sulfid (i)	
Natrijev metabisulfit (ii)	
Natrijev bisulfit (iii)	
Tioglicerol	

Preglednica 3: Sinergistični antioksidanti (12, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).

Vrsta antioksidantov	Strukturna formula
EDTA	
Lecitin	

Po izvoru pa delimo antioksidante na naravne in sintezne. Viri naravnih antioksidantov so poleg sadja in zelenjave še oreščki, žitarice, ribe in piščančje meso (13). Mednje štejemo:

- antioksidantne minerale kot so selen, baker, železo, cink in mangan, ki so kofaktorji antioksidantnih encimov (13);

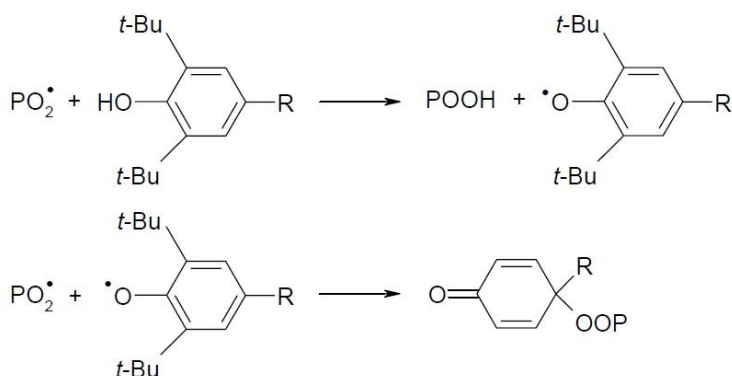
- vitamine C, E in B. Vitamin E (tokoferol) je v veliki meri proizveden sintezno (13);
- fitokemikalije, ki niso ne vitamini in ne minerali. Predstavniki so flavonoidi, katehini, karotenoidi, likopen, itd (13).

Med sintezne antioksidante pa uvrščamo butil-hidroksitoluen (BHT), butil-hidroksianizol (BHA), terc-butil-hidrokinon (TBHQ), propil-galat (PG), nordihidrogvaiaretska kislina (NDGA), itd (13).

V kozmetičnih izdelkih naj bi se antioksidanti uporabljali v (optimalnih) količinah od 0,02% do 0,1% (14). Naj pogosteje uporabljeni so BHT, BHA, propil-galat in vitamin E (tokoferol). Masovna produkcija sinteznih antioksidantov (nekaj tisoč ton letno) in ugodna cena sta glavna razloga za najpogostejšo uporabo v kozmetičnih izdelkih (15), seveda, pa morajo biti ti antioksidanti tudi učinkoviti.

1.3.1 Fenolni antioksidanti

Fenolni antioksidanti (Preglednica 1) vsebujejo v svoji kemijski strukturi fenolno skupino (hidroksi substituiran aromatski obroč). Po mehanizmu delovanja jih uvrščamo med primarne oz. prave antioksidante, ki zavirajo oksidacijo tako, da reagirajo z radikali in zaustavijo potek verižne reakcije (Slika 1). Lahko so naravnega ali sinteznega izvora in spadajo med najpogosteje uporabljene antioksidante v kozmetičnih izdelkih.



Slika 1: Primer reakcije fenolnega antioksidanta z radikalom. P – predstavlja (polimerno) verigo (16).

1.4 KOŽA

Koža pokriva celotno zunanjo površino človeškega telesa. Služi kot zaščita telesa (notranjih organov in tkiv) pred zunanjimi vplivi, sodeluje pri regulaciji telesne temperature in omogoča čutno zaznavanje (dotik, bolečina, toplota, mraz) (17).

Vrhni del je sestavljen iz dveh medsebojno odvisnih plasti povrhnjice (epidermis) in usnjice (dermis), ki ležita na podkožni maščobni plasti. Povrhnjica je v pretežni meri sestavljena iz keratinocitov, ki stalno nastajajo, se pomikajo proti zunanji roženi plasti (stratum corneum) kjer se spremenijo v korneocite in se odluščijo. Prav tako pa se v njej nahajajo melanociti, ki vsebujejo pigment melanin in ščitijo kožo pred UV-žarki, Langerhansove celice, ki sodelujejo pri imunskem odgovoru in Merkelove celice, ki so občutljive za dotik. Usnjico sestavljajo kolagen, elastična vlakna, krvne žile (kapilare) in fibroblasti (17, 18), podkožje pa je sestavljeno iz krvnih in limfnih žil, živcev, žlez in adipocitov (maščobne celice) (19).

1.4.1 Dermalna (perkutana) absorpcija

Večino kozmetičnih izdelkov apliciramo na kožo. Posledično mora biti varna uporaba le-teh obravnavana tudi z vidika (potencialne) dermalne absorpcije, saj pri aplikaciji prihaja do absorpcije posameznih sestavin v kožo in nadalje tudi v sistemski krvni obtok.

Obstajajo trije glavni načini dermalne absorpcije (20).

- **Transcelularna absorpcija** – substanca prehaja skozi korneocite s porazdeljevanjem v in iz celične membrane (20).
- **Intercelularna absorpcija** – pri kateri substanca prehaja med korneociti v zunajcelična področja bogata z maščobami (20).
- **Transfolikularna absorpcija** – substanca obide korneocite in vstopi v pore lasnih mešičkov (foliklov), žlez znojnic in lojnic (20).

Prehod substance iz zunanje površine kože do vstopa v sistemski krvni obtok pa lahko razdelimo na tri stopnje (20).

- Penetracija – vstop substance v posamezno plast kože (20).
- Permeacija – prehod substance iz ene v drugo plast kože (20).
- Resorpcija – vstop substance v limfni in lokalni ter sistemski krvni obtok (20).

Na hitrost in obseg dermalne absorpcije določene substance vpliva veliko število faktorjev kot so fizikalno-kemijske lastnosti substanc oz. sestavin kozmetičnega izdelka, hidratacija in poškodbe rožene plasti, zdravstveno stanje kože, mesto aplikacije, krvni in limfni pretok v koži, itd (20).

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je ugotoviti prisotnost in oceniti varno uporabo fenolnih antioksidantov in njihovih derivatov v kozmetičnih izdelkih. S pregledom ustrezne literature bomo v uvodnem delu predstavili kozmetične izdelke – njihovo uporabo, sestavo in funkcijo posameznih sestavin. Predstavili bomo zakonodajo s področja kozmetičnih izdelkov in izpostavili pomembnejše spremembe. Opisali bomo funkcijo in delovanje fenolnih antioksidantov uporabljenih v kozmetičnih izdelkih. Nato bomo pregledali različne vrste kozmetičnih izdelkov prisotnih na slovenskem trgu, z namenom ugotavljanja kateri fenolni antioksidanti in kako pogosto se v njih pojavljajo. Izbrali bomo izdelke tako s področja negovalne kot s področja dekorativne kozmetike. S pomočjo razpoložljive literature bomo posamezne fenolne antioksidante toksikološko okarakterizirali. Na koncu pa bomo na podlagi izdelanih toksikoloških profilov in ostalih zbranih podatkov ocenili varno uporabo fenolnih antioksidantov in njihov vpliv na uporabnike kozmetičnih izdelkov.

3 MATERIALI IN METODE

Z namenom ugotavljanja prisotnosti fenolnih antioksidantov smo pregledali 80 kozmetičnih izdelkov dostopnih na slovenskem trgu. S področja negovalne kozmetike smo pregledali 20 krem za obraz in 20 losjonov oz. mlek za telo, medtem ko smo v kategoriji dekorativne kozmetike pregledali 20 šmink in 20 maskar. Pri pregledu posamezne vrste kozmetičnega izdelka (krema za obraz, šminka, ...) smo za vsak posamezen izdelek izbrali drugega proizvajalca. Tako smo npr. pri pregledu 20 različnih maskar, izbrali maskare 20 različnih proizvajalcev.

3.1 KREME ZA OBRAZ

- Green Line Basic, vlažilna krema: *tokoferil acetat*
- Afrodita Cosmetics, natural lift, marine collagen & amazonian complex, long term moisturizing: *tokoferil acetat, BHT*
- Kozmetika Kancilja, krema za obraz oliva: *tokoferil acetat, BHT*
- Kozmetika Kahne, aloe vera cream: *tokoferil acetat*
- L'Oreal Paris, triple active day hydrating cream, dry and sensitive skin: *tokoferil acetat, pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinaamat*
- Garnier skin naturals, ultralift complete beauty, night cream, anti-age, regenerating, radiance boosting: *tokoferol*
- Mojdan, dnevna vlažilna krema, mandljevo oje & vitamin E: *tokoferil acetat*
- Nivea, aqua effect, moisturizing day cream, normal to mixed skin, vitamin E & hydra IQ: *tokoferil acetat, BHT*
- Dr. Scheller, natural & effective, distelöl & chiasamen, intensive aufbaupflege tag: *tokoferol*
- CMD Naturkosmetik, tea tree oil moisturizing cream: *tokoferol*
- Benecos natural beauty, natural BB cream 8 in 1: *tokoferol*
- Oriflame, ecollagen wrinkle correcting day cream SPF 15: *pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinaamat, BHT*
- Lavera naturkosmetik, bio-aloe vera & bio- kakaobutter, schützende pflegecreme: *tokoferil acetat, tokoferol*
- l'Occitane, žlahtna krema immortelle: *tokoferol, tokoferil acetat*

- Eubos, sensitive regenerativna strukturna krema: *tokoferol, tokoferil acetat*
- 100% Pure, vlažilna krema iz granatnega jabolka s SPF20: *tokoferol*
- Sanctum, organska hranljiva nočna krema: *tokoferol*
- Natura Siberica, nočna krema za obraz: *tokoferol*
- LA ROCHE-POSAY, hydreane BB krema: *tokoferil acetat, BHT*
- Melvita, žametna krema za obraz: *tokoferol*

3.2 LOSJONI IN MLEKA ZA TELO

- Eco cosmetics, vlažilni losjon z listi vinske trte in granatnim jabolkom, nežna nega normalne in mastne kože: *tokoferol*
- Cattier Paris, cosmétiques & nature, regenerativni losjon za telo, okrepljena nega s čudovitim vonjem citrusov: *tokoferol*
- PHB Ethical Beauty, pomlajevalni losjon za telo, razvaja kožo in čute - s hijacinto in šipkom: *tokoferol*
- Bentley organic, pomirjevalni losjon za telo, pomiri utrujeno in nadraženo kožo: *tokoferol*
- MaterNatura, ecobiorganic, losjon za telo z rimsko kamilico, podari vaši koži sijaj in svežino: *tokoferol*
- Lavera, naturkosmetik, losjon za telo chocolate fantasy, čokoladna nega za normalno in suho kožo: *tokoferol*
- Biofiscina Toscana, čili losjon za telo, revitaliziran losjon z aromatičnim timijanom in sivko: *tokoferol*
- Dr. Bronner's, losjon – sivka/kokos, naravna vlažilna nega s pomočjo bio-olj: *tokoferol* (naravni vir)
- Bioturm, losjon z lipidi 200 ml, bogat losjon - primeren za zelo suho kožo: *tokoferol, tokoferil acetat*
- Benecos natural care, naravni losjon za telo, nežen losjon za telo z nežnim vonjem citrusov: *tokoferol*
- SantaVerde Naturkosmetik, aloe vera losjon za telo classic, vlažilna nega telesa primerna za vse tipe kože: *tokoferol*
- Burt's Bees, losjon za telo s karitejevim maslom za vsak tip kože, hipoalergen losjon za telo z vitaminom E - brez vonja: *tokoferol*

- Kneipp®, mleko za telo z jasmino in arganom, s čudovito čutnim vonjem - za vse tipe kože: *tokoferol*
- Pilogen Carezza, mleko za telo z grenivko, razvaja in neguje s čudovitim vonjem: *tokoferil acetat*
- Moj dan, mleko za telo, karitejevo maslo & olus olje: *tokoferol, tokoferil acetat*
- Dhalia, body milk, intensive hydration, dry skin, apricot oil, cupuacu and shea butter: *tokoferol, tokoferil acetat*
- Dvorec Trebnik, mleko za telo, ognjič: *tokoferol*
- SO'BiO étic, svilnato mleko za telo z mlekom oslice, za trajnostno zaščiteno kožo: *tokoferol*
- Melvita, svilnato nežno mleko za telo s čutno dišavo dehtečih vrtnic: *tokoferol*
- naturalia, mleko za telo, aloe vera: *tokoferil acetat*

3.3 ŠMINKE

- The Balm cosmetics, The Balm Girls šminka - Mia Moore: *tokoferil acetat*
- Sleek MakeUP, Sleek šminka - Brown Velvet: *tokoferil acetat*
- Revolution, Makeup Revolution London, Makeup Revolution šminka – Mystify: *tokoferil acetat, BHT*
- I Heart Makeup, šminka - Heart is Pumping: *tokoferol, tokoferil acetat, BHT*
- Barry M, šminka – Peach: *BHA, propil-galat*
- Beauty UK, šminka – Naughty: *BHA, propil-galat*
- Catrice Cosmetics, šminka Ultimate Stay: *pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocينات*
- SO'BiO étic, šminka: *tokoferol*
- NYX Round Lipstick / šminka 501 Iris: *tokoferil acetat, BHA*
- P2 Pure Color Lipstick 040 Wall Street: *tokoferol, BHT*
- Zoeva Lip Crayon 03 Second Chance, šminka v obliki svinčnika: *tokoferol, tokoferil acetat, pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocينات*
- SANTE Naturkosmetik, šminka: *tokoferol*

- Oriflame Pure Colour, šminka: *tokoferol, tokoferil acetat, BHT*
- Giordani Gold, Jewel šminka: *tokoferol, BHT*
- The ONE, 5-v-1 Colour Stylist šminka: *tokoferol, tokoferil acetat, BHT*
- Very Me, Lip Addict šminka z leskom: *tokoferol, tokoferil acetat, BHT*
- Alva naturkosmetik, kremna šminka: *tokoferol*
- Essence, dolgoobstojna šminka, 02 all you need is red: *pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocina mat*
- Wet n Wild, Mega Last Matte šminka: *tokoferil acetat, BHT*
- Etude House, Sweet Recipe Dear My Jelly Lips Talk šminka: *pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocina mat, BHT*

3.4 MASKARE

- Very Me, Fat Lash maskara: *BHT*
- The ONE, Volume Blast maskara: *tokoferil acetat, BHT*
- Oriflame, Hyper Stretch maskara: *tokoferil acetat, BHT*
- Giordani Gold, Supreme Length maskara: *tokoferil acetat, BHT*
- Catrice Cosmetics, Allround Waterproof maskara, 010 Blackest Black: *tokoferol, BHT*
- Lavera Naturkosmetik, intenziven volumen maskara: *tokoferol*
- SANTE, Perfect Definition maskara: *tokoferol*
- Paul Penders, naravna maskara: *tokoferil acetat*
- Avril, maskara: *tokoferol*
- SO'BiO étic, Triple action maskara: *tokoferol*
- Benecos, Natural Mascara Super Long Lashes: *tokoferol*
- Barry M maskara - Lash Vegas: *tokoferol*
- Makeup Revolution maskara - Amazing Curl Waterproof – Black: *tokoferil acetat*
- Feyst maskara: *tokoferil acetat*
- Deborah, 24h Absolute Volume maskara – črna: *tokoferol*

- MUD, kremna maskara: *tokoferil acetat*
- Revlon, Grow Luscious Maskara – Blackened Brown: *tokoferil acetat*
- 100% Pure, naravna maskara – odtenek črn čaj: *tokoferol*
- être belle, Lash x-treme vodoodporna maskara: *tokoferil acetat, BHT*
- essence, get BIG! Lashes volume curl maskara: *tokoferol, tokoferil acetat, BHT*

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Ponudba kozmetičnih izdelkov je na slovenskem trgu zelo široka in praktično vsi izdelki vsebujejo vsaj en fenolni antioksidant, ki pa lahko nastopa skupaj z drugimi antioksidanti fenolnega ali drugega nefenolnega tipa. V nadaljevanju bomo obravnavali le fenolne antioksidante prisotne v pregledanih kozmetičnih izdelkih.

4.1 FENOLNI ANTIOKSIDANTI V IZBRANIH KOZMETIČNIH IZDELKIH

Po pregledu kozmetičnih izdelkov smo zaznali prisotnost šestih različnih fenolnih antioksidantov, ki so navedeni v preglednici 4. Ugotovili smo, da je tokoferol najpogosteje zastopan fenolni antioksidant v izbranih kozmetičnih izdelkih, ki mu sledijo tokoferil acetat (derivat tokoferola), BHT, pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat (PTHHC), BHA in propil-galat (PG). Stolpec »Delež (%)« v preglednici 4 podaja delež od skupno 80 pregledanih kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo posamezen antioksidant.

Preglednica 4: Pregled zastopanosti fenolnih antioksidantov v izbranih kozmetičnih izdelkih.

Antioksidant/Izdelek	Krema za obraz	Losjon oz. mleko za telo	Šminka	Maskara	Skupaj	Delež (%)
Tokoferol	11	18	10	10	49	61,3
Tokoferil acetat	11	5	10	10	36	45
BHT	5	/	9	7	21	26,3
Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat	2	/	4	/	6	7,5
BHA	/	/	3	/	3	3,8
Propil-galat	/	/	2	/	2	2,5

Določeni izdelki vsebujejo 2 oz. 3 fenolne antioksidante (Preglednica 5). Tako v primeru dveh uporabljenih fenolnih antioksidantov skupaj najpogosteje nastopata tokoferol in tokoferil acetat, pri izdelkih, ki vsebujejo 3 fenolne antioksidante, pa se skupaj s tokoferolom in tokoferil acetatom pojavlja še BHT. V vseh izdelkih, ki so vsebovali BHT se je ta le pri enem (maskara) pojavil kot edini prisotni fenolni antioksidant, v vseh ostalih izdelkih pa je nastopal skupaj s še vsaj enim fenolnim antioksidantom. Tako so izdelki skupaj z BHT največkrat vsebovali še tokoferol ali tokoferil acetat, redkeje pa PTHHC.

BHT skupaj s tokoferolom izkazuje sinergistično delovanje (21). Propil-galat pa je v obeh kozmetičnih izdelkih (šminkah) nastopal skupaj z BHA. To je skladno z literaturo, ki navaja, da se propil-galat zaradi sinergističnega učinka uporablja skupaj z BHA (22).

Preglednica 5: Število kozmetičnih izdelkov, ki vsebujejo 1, 2 oz. 3 fenolne antioksidante.

Št. antioksidantov / Izdelek	Krema za obraz	Losjon oz. mleko za telo	Šminka	Maskara	Skupaj	Delež (%)
1	11	17	7	14	49	61,3
2	9	3	8	5	25	31,2
3	/	/	5	1	6	7,5

4.2 TOKSIKOLOŠKI PROFILI FENOLNIH ANTIOKSIDANTOV PRISOTNIH V IZBRANIH KOZMETIČNIH IZDELKIH

Kozmetičnim izdelkom je v največji meri izpostavljena koža, kjer lahko prihaja do najrazličnejših lokalnih neželenih učinkov oz. reakcij. V kolikor sestavina preko kože vstopa v sistemski krvni obtok in se posledično porazdeljuje po celotnem organizmu, pa lahko pride tudi do sistemskih neželenih učinkov. Vstop posameznih sestavin kozmetičnega izdelka v organizem lahko poteka tudi preko dihal, ust (oralno, peroralno) in sluznic. Tako je sistemska izpostavljenost največkrat posledica absorpcije v in preko kože, ki predstavlja najpogostejšo pot vstopa kozmetičnih substanc. V primeru uporabe izdelkov kot so šminke kjer le-te nanašamo na ustnice lahko pride do vstopa sestavin preko ust oz. sluznic. Preko dihal smo najpogosteje izpostavljeni sestavinam kozmetičnih izdelkov, ki so v obliki prahov ali pršil. Pri uporabi maskar in črtal za oči, pa lahko sestavina vstopa preko očesne veznice oz. očesa. Maskare in črtala za oči lahko zaradi nanosa v bližino očesa povzročijo draženje le-tega.

4.2.1 Tokoferol

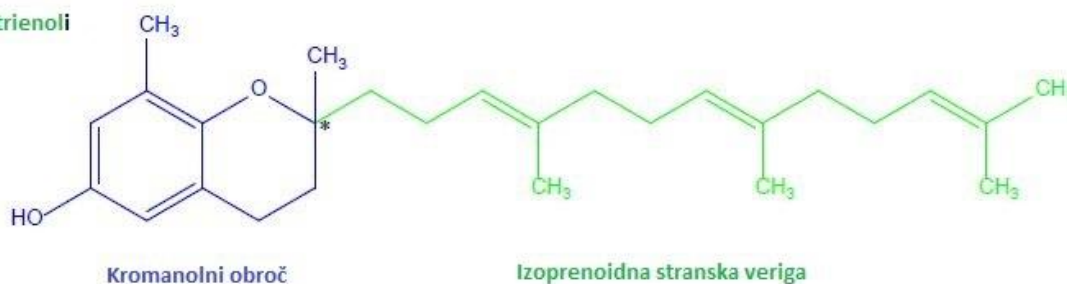
Tokoferoli so vključno s tokotrienoli v maščobah topni antioksidanti. Njihovo skupno ime je vitamin E, ki ga sestavlja osem različnih oblik (molekul) – štiri oblike tokoferolov in štiri oblike tokotrienolov. Vse oblike vitamina E imajo v svoji strukturi hidroksiliran kromanski obroč (kromanolni obroč) in hidrofobno stransko verigo (fitinska oz. izoprenoidna veriga) (Slika 2). Hidroksilna skupina z oddajo vodikovega atoma sodeluje

pri reakcijah z radikali (antioksidativno delovanje), hidrofobna stranska veriga pa poveča lipofilnost molekule in omogoča prehajanje oz. sidranje v biološke membrane (23, 24).

Tokoferoli

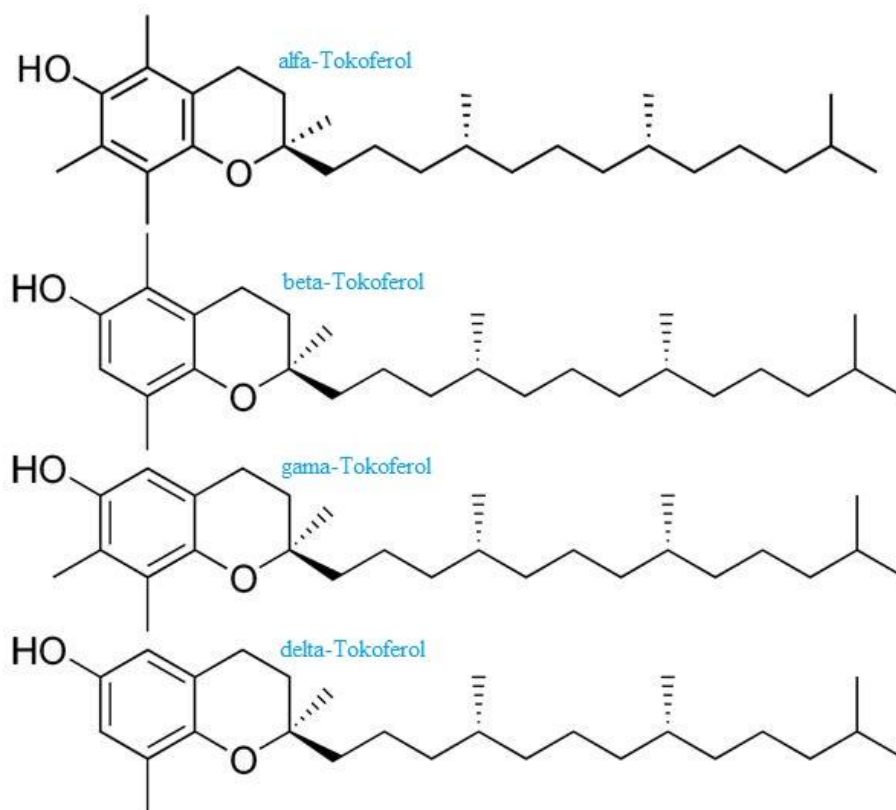


Tokotrienoli



Slika 2: Strukturni formuli tokoferolov in tokotrienolov. Kiralni centri so označeni z zvezdico (*) (24).

Štiri oblike tokoferolov oz. tokotrienolov imenujemo α (alfa), β (beta), γ (gama) in δ (delta) oblika tokoferola oz. tokotrienola. Med seboj se razlikujejo v odsotnosti / prisotnosti in mestu dodatno vezanih metilnih skupin na aromatskem obroču, ki je del kromanskega jedra (Slika 3) (23, 24).



Slika 3: Strukturne formule α (alfa), β (beta), γ (gama) in δ (delta) tokoferola (23).

V naravi se tokoferol nahaja v štirih oblikah, in sicer v d - α , d - β , d - γ in d - δ obliki. Naravni viri tokoferolov so rastlinska olja predvsem olje pšeničnih kalčkov, sončnično olje, rdeče palmovo olje in oljčno olje ter ostali viri kot so arašidi, orehi, sezam, koruza in soja. Najdemo pa jih tudi v mesu, jajcih in žitaricah. Izdelki, ki vsebujejo naravno mešanico tokoferolov odražajo koncentracijsko razmerje tokoferolov v materialu (rastlinskem olju) iz katerega so bili ekstrahirani. V takih izdelkih je običajno njihova koncentracija 10% – 20% α -, 1% – 3% β -, 55% – 66% γ -, 18% – 33% δ - tokoferola. V komercialne namene se tokoferoli pridobivajo z izolacijo iz rastlinskih olj ali sintezno s kondenzacijo izofitol-a in tri-, di-, ali mono-metilhidrokinona, pri čemer nastane racemna zmes osmih stereoizomerov (24, 25, 26, 27).

Naravni vir α -tokoferola se navaja kot »*RRR*- α -tokoferol« oz. »*d*- α -tokoferol«, ki zajema en stereoizomer najden v rastlinah. Medtem ko se sintezno pridobljeni α -tokoferol navaja kot »*all-rac*- α -tokoferol« oz. »*dl*- α -tokoferol«, ki zajema 8 stereoizomerov α -tokoferola v enakih razmerjih. Tako je zmes 8 stereoizomerov *all-rac*- α -tokoferola sestavljena iz *RRR*, *RRS*, *RSR*, *RSS*, *SRR*, *SRS*, *SSR* in *SSS* oblike (stereoizomera) α -tokoferola, pri čemer je

vsebnost / delež vsake od oblik 12,5%. Enako velja za α -tokoferil acetat, le da se za imenom doda beseda »acetat« (28, 29).

S študijami, ki so jih izvedli na podganah in kokoših so ugotovili razmerje bioloških aktivnosti med *all-rac*- α -tokoferolom in *RRR*- α -tokoferolom, ki znaša 1 : 1,36 (29). To razmerje ustreza uradno določenim vrednostim tokoferol ekvivalentov, ki so v nadaljevanju navedeni v preglednici 7.

Za posamezne stereoizomere pa so s študijo fetalne resorpcije/brejsosti na podganah določili relativne biološke aktivnosti, ki za α -tokoferil acetat (aktivna oblika je α -tokoferol) znašajo 90% – *RRS*, 73% – *RSS*, 60% – *SSS*, 57% – *RSR*, 37% – *SRS*, 31% – *SRR* in 21% – *SSR*. Vse navedene relativne biološke aktivnosti so določili v razmerju do biološke aktivnosti *RRR* stereoizomera, ki znaša 100% (29).

Z *in vitro* študijo so ugotovili, da je antioksidativni potencial vseh 8 stereoizomerov praktično enak (29).

Pri pregledanih kozmetičnih izdelkih, ki vsebujejo tokoferol je le-ta naveden z INCI imenom »tokoferol« (ang. »tocopherol«) ter v izdelkih, ki vsebujejo tokoferil acetat je le-ta, prav tako naveden z INCI imenom »tokoferil acetat« (ang. »tocopheryl acetate«). Posledično je na podlagi navedenih imen, nemogoče ugotoviti ali je naravnega oz. sinteznega izvora in kakšno je razmerje vsebnosti posameznih oblik oz. izomerov. V literaturi se pri različnih študijah in testih, v katerih ni nedvoumno specificirana vrsta (stereoizomer) tokoferola, le-ta velikokrat navaja kot α -tokoferol oz. α -tokoferil acetat, lahko pa je kot sinonim za tokoferol ali tokoferil acetat uporabljena beseda »vitamin E« pri čemer pa je zopet nemogoče sklepati za katero obliko oz. kombinacijo oblik tokoferola dejansko gre.

V bazi podatkov o sestavinah kozmetičnih proizvodov (CosIng), ki jo upravlja Evropska komisija, je pod INCI imenom »tokoferol« navedeno IUPAC ime »3,4-dihidro-2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-2H-benzopiran-6-ol«, ki ustreza α -tokoferolu. Prav tako pa je pod INCI imenom »tokoferil acetat« navedeno IUPAC ime »3,4-dihidro-2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-2H-benzopiran-6-il acetat«, ki ustreza α -tokoferil acetatu (30, 31, 32, 33).

Sicer pa so v CosIng bazi pod INCI imenom »tokoferol« navedena naslednja CAS števila: 54-28-4, 16698-35-4, 10191-41-0, 119-13-1, 1406-18-4, 1406-66-2, 2074-53-5, 59-02-9, 7616-22-0 in pod INCI imenom »tokoferil acetat«, CAS števili: 7695-91-2, 58-95-7 (30, 31).

Na podlagi prej omenjenih podatkov in dejstva, da je v telesu v največji meri oz. skoraj izključno prisotna le oblika α -tokoferola smo v nadaljevanju tokoferol obravnavali kot α -tokoferol in tokoferil acetat kot α -tokoferil acetat.

- **Uporaba**

Tokoferol, ki ima v kozmetičnih izdelkih funkcijo antioksidanta in/ali negovalne sestavine, najdemo v skoraj vseh vrstah kozmetičnih izdelkov. Po podatkih FDA se je pogostost uporabe tokoferolov občutno povečala, in sicer se je uporaba od leta 1998 do leta 2014 povečala za 619% (6-kratno povečanje). Po podatkih študije izvedene s strani Sveta za izdelke namenjene osebni negi (PCPC) se je povečala tudi vsebnost oz. koncentracija tokoferola v kozmetičnih izdelkih, in sicer v izdelkih, ki ostanejo na koži in se ne izperejo, se je le-ta povečala iz 2% v letu 1999 na 5,4% v letu 2013 (Preglednica 6) (24).

Preglednica 6: Primerjava koncentracij tokoferola v kozmetičnih izdelkih z načini oz. mesti izpostavitve v letih 2013 in 1999 (24).

Način oz. mesto izpostavitve / leto	2013	1999
Področje oči	0,00002% – 3%	0,02% – 0,6%
Možno zaužitje	0,0005% – 2%	0,05% – 0,9%
Nanos na kožo	0,0000009% – 5,4%	0,001% – 2%
Stik z mukoznimi membranami	0,0000009% – 3%	0,01% – 0,9%

α -Tokoferol, ki se v skladu z dobro proizvodno prakso v prehrani uporablja kot nutrient in kot konzervans, ima dodeljen status »splošno znan kot varen« (GRAS). Vitamin E je ovrednotil tudi Znanstveni odbor za prehrano (SCF), ki je določil dopustno zgornjo mejo vnosa (UL) vitamina E (kot *d*- α -tokoferol) za odrasle osebe do 300 mg α -tokoferol ekvivalentov/dan (Preglednica 7). JECFA pa je opredelila sprejemljiv dnevni vnos (ADI), ki znaša 0,15 – 2 mg/kg TT/dan, izračunan kot α -tokoferol (24, 27).

V študiji, ki so jo izvedli na 88 zdravih osebah starejših od 65 let katerim so 4 mesece dajali 55, 182 oz. 727 mg all-rac- α -tokoferola/dan, niso zaznali nobenih neželenih učinkov

(34). Ob predpostavki, da je bila telesna teža oseb 70 kg, lahko iz podatkov o količini apliciranega α -tokoferola izračunamo dnevni vnos na kg TT, kar za najvišji odmerek znaša 10,39 mg all-rac- α -tokoferola/kg TT/dan in z upoštevanjem tokoferol ekvivalentov (preglednica 7) 7,69 mg α -tokoferola/kg TT/dan. Iz omenjenih podatkov je razvidno, da tudi odmerki višji od UL in ADI niso povzročili neželenih učinkov.

Preglednica 7: Tokoferol ekvivalenti (običajno) izraženi v mg (28).

Oblika tokoferola	Tokoferol ekvivalenti
RRR- α -tokoferol oz. <i>d</i> - α -tokoferol	1,00
<i>all-rac</i> - α -tokoferol oz. <i>dl</i> - α -tokoferol	0,74
RRR- α -tokoferil acetat oz. <i>d</i> - α -tokoferil acetat	0,91
<i>all-rac</i> - α -tokoferol acetat oz. <i>dl</i> - α -tokoferil acetat	0,67
RRR- γ -tokoferol	0,10

- **Fizikalno - kemijske lastnosti**

Preglednica 8: Fizikalno-kemijske lastnosti α -tokoferola (35).

Lastnost	Vrednost
CAS št.	59-02-9
Molekulska masa	430,7 g/mol
Gostota	0,950 g/cm ³ pri 25 °C
Temperatura tališča	2,5 – 3,5 °C
Temperatura vrelišča	200–220 °C pri 0.1 mmHg

- **Toksikokinetika**

Izvedli so številne študije s peroralno aplikacijo tako na miših oz. podganah kot tudi na človeških prostovoljcih. Večina študij je pokazala, da se tokoferol po peroralni aplikaciji porazdeljuje v skoraj vsa tkiva (predvsem v maščobna tkiva), pri čemer pa se obseg porazdelitve in metabolizem v posameznih tkivih razlikujeta (24).

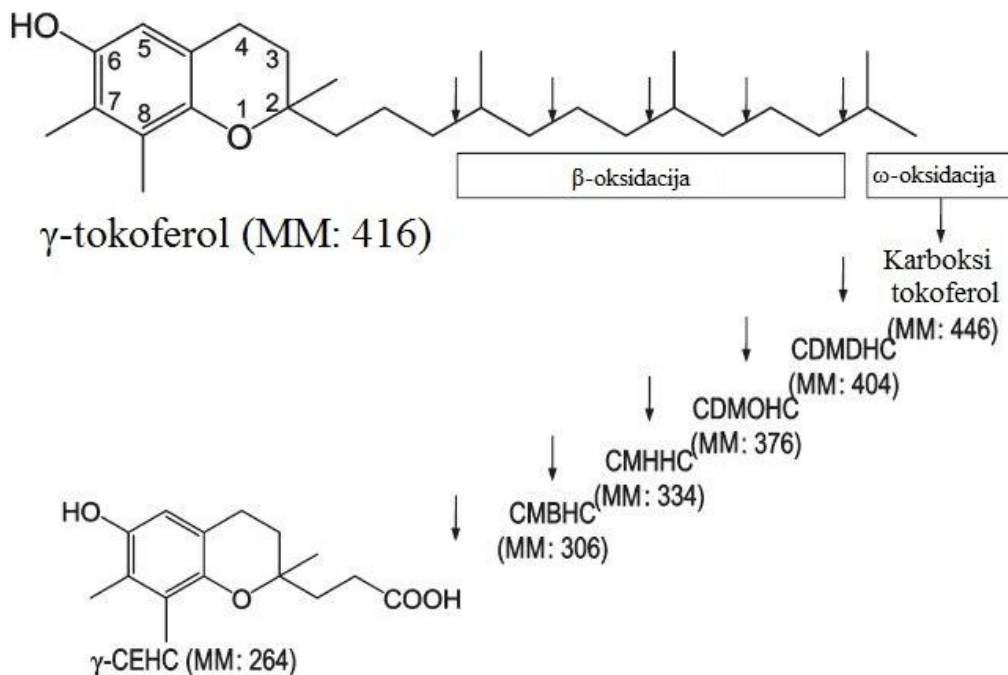
Najvišjo biološko uporabnost in bioakumulacijo tako v ljudeh kot v živalih dosega α -tokoferol, pri čemer je sistemska razpoložljivost α -tokoferola naravnega izvora približno dvakrat večja kot pri sintezni obliki tokoferola. α -Tokoferol predstavlja 85% – 95% vseh sistemsko razpoložljivih tokoferolov (24, 26).

Tokoferoli se v največji meri izločajo z blatom. S študijo izvedeno na miših so v blatu in urinu ugotovili prisotnost 18-tih različnih metabolitov (Preglednica 9) vključno z nespremenjenimi α -, γ -, in δ - tokoferoli. Pri študiji, ki so jo izvedli na človeških prostovoljcih pa so zaznali karboksietil-hidroksikromane (CEHC) in karboksimetilbutil-hidroksikromane (CMBHC) kot glavne metabolite prisotne v urinu (Preglednica 9). Večina metabolitov identificiranih v mišjem in človeškem urinu se je nahajala v obliki glukuronidov (konjugatov z glukuronsko kislino) (24, 36).

Preglednica 9: Metaboliti tokoferola (36).

Metaboliti prisotni v mišjem blatu in/ali urinu	Razlaga okrajšav	Prisotnost v človeškem blatu	Prisotnost v človeškem urinu
α -CEHC	karboksietil-hidroksikroman (CEHC)	✓	✓
γ -CEHC		✓	✓
δ -CEHC		✓	✓
α -CMBHC	karboksimetilbutil-hidroksikroman (CMBHC)	✓	✓
γ -CMBHC		✓	✓
δ -CMBHC		✓	✓
α -CMHHC	karboksimetilheksil-hidroksikroman (CMHHC)	✗	✗
γ -CMHHC		✓	✗
δ -CMHHC		✓	✗
α -CDMOHC	karboksidimetiloktil-hidroksikroman (CDMOHC)	✗	✗
γ -CDMOHC		✓	✗
δ -CDMOHC		✓	✗
α -CDMDHC	karboksieimetildecil-hidroksikroman (CDMDHC)	✗	✗
γ -CDMDHC		✓	✗
δ -CDMDHC		✓	✗
karboksi- α -tokoferol	/	✓	✗
karboksi- γ -tokoferol		✗	✗
karboksi- δ -tokoferol		✗	✗

Na podlagi dobljenih rezultatov so avtorji predlagali metabolne poti, ki so za primer γ -tokoferola ponazorjene na sliki 4 (36).



Slika 4: Predlagane metabolne poti (36).

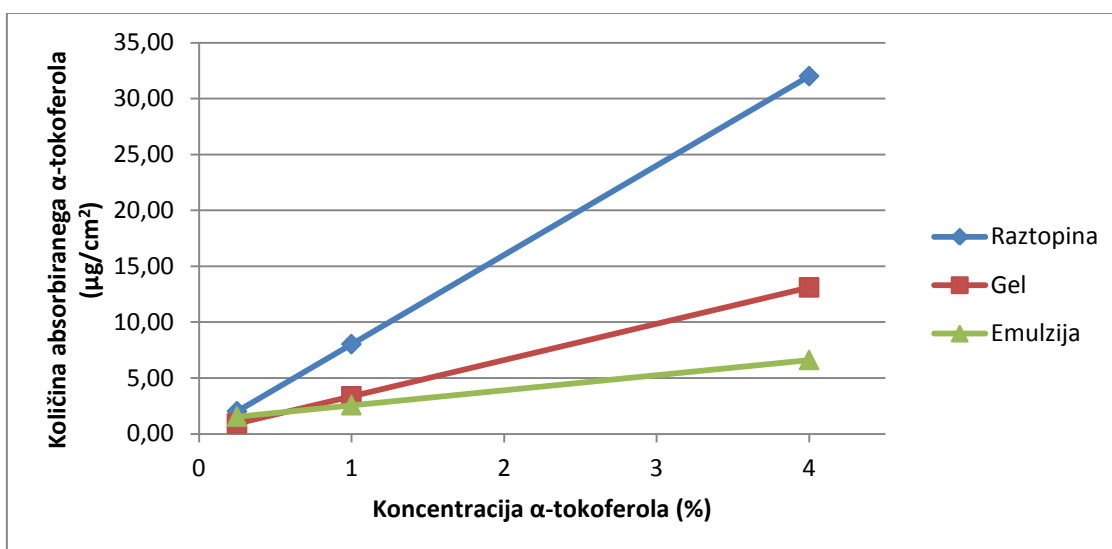
Študije dermalne absorpcije so zajemale tako *in vitro* metode na izoliranih delih kože, kot *in vivo* metode na živalih. Pri *in vitro* študiji, ki so jo izvedli na prašičji koži (opisana v nadaljevanju – glej preglednico 10) je prišlo do dermalne penetracije (permeacije) α -tokoferola, katere obseg pa je bil odvisen od vrste uporabljenega vehikla oz. dostavnega sistema (emulzija, raztopina, gel). Prav tako je tokoferol penetriral skozi kožo pri poskusih na izolirani človeški koži nameščeni v Franz-ovo difuzijsko celico. Pri *in vivo* študiji kjer so na kožo na hrbtne strani miši aplicirali 5 mg α -tokoferola/cm², je po 24 urah prišlo do 62-kratnega povečanja koncentracije α -tokoferola v povrhnjici (epidermis) in do 22-kratnega povečanja v usnjici (dermis) (24, 26).

Pri eni od *in vitro* študij so na površino 0,636 cm² prašičje kože nanесли 5 μ l (ekvivalentno cca. 4 mg) 0,25%, 1% in 4% raztopino (v izopropil miristatu), gel (hidroalkoholni gel) in emulzijo (o/w mikroemulzija) *d*- α -tokoferola. V preglednici 10 so zbrane količine α -tokoferola, ki se je absorbiral v žive plasti kože (brez rožene plasti). V preglednici 11 pa so zbrane količine α -tokoferola, ki je po 24 urah penetriral skozi kožo (v receptorski medij) (37).

Preglednica 10: Absorpcija α -tokoferola v žive plasti kože (37).

Formulacija/vsebnost	0,25% <i>d</i> - α -tokoferola	1% <i>d</i> - α -tokoferola	4% <i>d</i> - α -tokoferola
Raztopina	2,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	8,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	32,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Gel	0,92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	3,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	13,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Emulzija	1,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	2,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	6,61 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Opazna je linearna odvisnost med absorbirano količino in koncentracijo α -tokoferola v apliciranih formulacijah (Graf 1) (37).



Graf 1: Količina absorbiranega α -tokoferola v odvisnosti od aplicirane koncentracije (37).

Preglednica 11: Penetracija α -tokoferola skozi kožo (37).

0,25% razt. α -tokoferola	1% razt. α -tokoferola	4% razt. α -tokoferola
0,071 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,326 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	1,07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

- **Akutna toksičnost**

Akutna dermalna toksičnost tokoferola ugotovljena na podganah znaša $> 3\text{g}/\text{kg}$ TT (LD50). Akutna peroralna toksičnost prav tako ugotovljena s študijo na podganah znaša $> 4\text{g}/\text{kg}$ TT (LD50), ter s študijo izvedeno na miših $> 25\text{ ml}/\text{kg}$ TT (LD50), kar je z upoštevanjem gostote $0,950\text{ g}/\text{cm}^3$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, enako $> 23,75\text{ g}/\text{kg}$ TT (LD50) (24).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

Pri 60-dnevni študiji na podganah, kjer so 6 podganih samcev hranili s 400 mg vitamina E (domnevno v obliki tokoferola)/kg TT/dan, se je tokoferol izkazal kot netoksičen (24, 26). Ker se tokoferil acetat po peroralni aplikaciji hidrolizira do tokoferola, so za toksičnost tokoferola pri ponavljajočih odmerkih relevantni tudi podatki pridobljeni pri študijah tokoferil acetata (glej poglavje o tokoferil acetatu).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

Izvedli so študijo na podganah (samčkah in samičkah) katere so 20 dni pred paritvijo in v dobi brejosti hranili z 0,75; 7,5 oz. 75 mg α -tokoferola/dan. Vse podgane, ki so hranili z 0,75 mg α -tokoferola/dan so bile breje, medtem ko je bilo v skupini hranjeni z 7,5 mg α -tokoferola/dan brejih 90% in v skupini hranjeni z 75 mg α -tokoferola/dan brejih le 50% podgan. Prav tako je bilo število živih fetusov v skupini hranjeni z 75 mg α -tokoferola/dan nekoliko nižje kot v skupini hranjeni z 0,75 mg α -tokoferola/dan, medtem ko je bila teža fetusov v vseh skupinah skoraj enaka (26).

V drugi študiji, ki so jo prav tako izvedli na podganah, pa so zaznali blagodejno delovanje vitamina E (predvideno tokoferola) saj je vplival na zmanjšanje števila deformacij pri potomcih (mladičih) diabetičnih samic (26).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

Testi kromosomskih aberacij, Amesovi testi in mikrojedrni testi so pokazali, da tokoferol nima mutagenega potenciala. Tokoferol prav tako ni imel vpliva na z UV-inducirano mutagenost. Tudi test na ovarijskih celicah kitajskega hrčka je pokazal, da tokoferol ni genotoksičen (24, 26).

- **Kancerogenost**

V študijah izvedenih na podganah in miših pri katerih so tokoferol aplicirali peroralno so ugotovili, da le-ta ne izkazuje kancerogenega potenciala. Nasprotno pa je v študiji, ki so jo izvedli na mišjih samčkah po subkutani aplikaciji α -tokoferola v sojinem olju prišlo do nastanka neoplazem (pri 17 od 22 živali), pri čemer subkutana aplikacija čistega α -tokoferola ali čistega sojinega olja nastanka neoplazem ni povzročila (24, 26, 38).

Enake oz. podobne rezultate so dobili še v eni študiji izvedeni na dveh vrstah (NFS/N in 6HF1) mišjih samic, v kateri so prav tako subkutano aplicirali čisti (naravni) vitamin E (z vsebnostjo 8,9% α -tokoferola, 0,9% β -tokoferola, 41% γ -tokoferola, 49,2% δ -tokoferola), vitamin E v sojinem olju in čisto sojino olje. Tako je tudi tukaj vitamin E v sojinem olju induciral nastanek neoplazem (v 85,6% pri NFS/N miših in v 60% pri 6HF1 miših), medtem ko čisti vitamin E ali čisto sojino olje nastanka neoplazem nista povzročila (26). Navedeni podatki nakazujejo na sinergistično delovanje α -tokoferola oz. vitamina E in sojinega olja, ki je ob subkutani aplikaciji rezultiralo v povzročitvi nastanka neoplazem.

Pri študiji na miših pa je dermalno apliciran *dl*- α -tokoferol v acetonu izkazoval celo blagodejno delovanje, saj je zaviral fotokancerogenezo (26).

- **Okularna iritacija**

Izvedenih je bilo več študij okularne iritacije (Draize-ov test) na kuncih. Nekatere študije so pokazale, da je tokoferol lahko zelo blag (minimalni) okularni iritant (povprečna skupna ocena okularne iritacije 6,0 od 110), pri drugih študijah pa tokoferol ni povzročil draženja očesa. V primerih, ko se je tokoferol izkazal kot blag okularni iritant, je prišlo na konjunktivi do pojava blage rdečice (24, 26).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

Klinične študije na ljudeh so pokazale, da tokoferol ni iritant in ni senzitivizator, saj so pri večjem številu študij le zelo redki imeli pozitivno reakcijo na tokoferol. Tako je npr. le 0,7% od 4454 pacientov v HPT (ang. Human Patch Test) študiji, izvedeni s strani NACDG v letih 2005-2006 imelo pozitivno reakcijo na tokoferol. Pri eni HPT študiji, ki so jo izvedli na 55 prostovoljcih so na podlaket za dobo 24 ur aplicirali 0,05 mL 1% raztopine tokoferola v tekočem parafinu (paraffinum liquidum). Izkazalo se je, da 1% raztopina tokoferola ni primarni kožni iritant. V drugi študiji so raziskovali iritacijski in senzitivizacijski potencial kreme, ki je vsebovala 5% tokoferola. Pri 113 prostovoljcih so s ponovljivimi aplikacijami 0,2 ml kreme na zgornji del hrbta in aplikacijo na notranjo stran podlakti ugotovili, da krema, ki vsebuje 5% tokoferola ni iritant in ni senzitivizator. *dl*- α -Tokoferol se je pri maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (GPMT) izkazal kot zmeren senzitivizator. Prav tako se je *dl*- α -tokoferol, pri testu na lokalnih limfnih vozlih miši (LLNA) izkazal kot zmeren senzitivizator, saj so določili koncentracijo pri kateri je

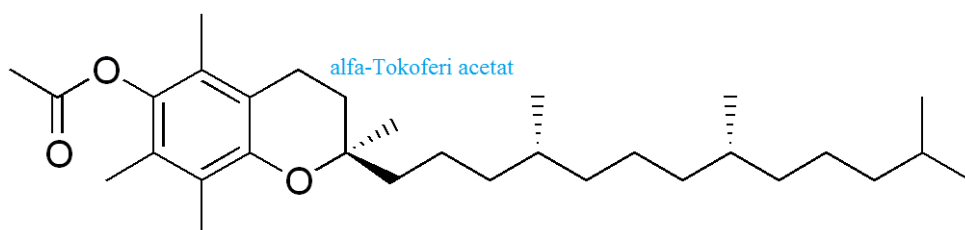
prolifracija limfocitov glede na kontrolo trikratna (EC_3) 7,4%. Pri tej študiji se kot zmerni senzitivator šteje substanca z EC_3 vrednostmi $\geq 1\%$ do $< 10\%$ (24, 26, 39).

- **Ostali toksikološki podatki**

Študije so pokazale, da topikalno apliciran tokoferol deluje fotoprotektivno, saj je zaviral peroksidacijo lipidov in dimerizacijo timidinskih baz, do katerih pride po izpostavitvi UV sevanju (24).

4.2.2 Tokoferil acetat

Tokoferil acetat predstavlja skupino molekul – estre očetne kisline in tokoferolov (Slika 5). Pridobivamo ga z esterifikacijo tokoferola z očetno kislino (23, 24, 40).



Slika 5: Strukturna formula α (alfa) – tokoferil acetata (40).

Tokoferil acetat je bolj stabilen in se uporablja kot alternativa tokoferolov. Blokirana oz. zaestrena fenolna hidroksilna skupina ima za posledico manjšo kislost in daljši rok uporabe tokoferil acetata v primerjavi s tokoferolom (23, 24, 40). Tokoferil acetat sam po sebi nima antioksidativnih lastnosti temveč se po hidrolizi estrske vezi pretvori v aktivno obliko – tokoferol, ki deluje kot antioksidant.

- **Uporaba**

V kozmetičnih izdelkih se tokoferil acetat uporablja kot antioksidant in/ali negovalna sestavina. Najdemo ga v skoraj vseh kategorijah izdelkov od negovalne do dekorativne kozmetike. Po podatkih FDA se je pogostost uporabe tokoferil acetata od leta 1998 do leta 2014 povečala za 732% (7-kratno povečanje). Tokoferil acetat se v izdelkih, ki ostanejo na koži in se ne izperejo, uporablja tudi v koncentracijah do 36% (izdelki za mehčanje povrhnjice), medtem ko se v izdelkih za otroke uporablja v koncentraciji 0,1% (24).

V izdelkih, pri katerih lahko pride do nenamernega zaužitja kot so npr. šminke, pa je koncentracija tokoferil acetata do 3% (Preglednica 12) (24).

Tokoferil acetat, ki se uporablja, v skladu z dobro proizvodnjo prakso, v prehrani kot nutrient in kot konzervativ ima dodeljen status GRAS (24). Za ADI vrednosti glej poglavje o tokoferolu – Uporaba in preglednica 7.

Preglednica 12: Primerjava koncentracij tokoferil acetata v kozmetičnih izdelkih z načini oz. mesti izpostavitve v letih 2013 in 1999 (24).

Način oz. mesto izpostavitve / leto	2013	1999
Področje oči	0,000045 % – 4,9 %	0,01 % – 1 %
Možno zaužitje	0,0035 % – 3 %	0,1 % – 3 %
Nanos na kožo	0,000045 % – 5 %	0,0001 % – 25 %
Stik z mukoznimi membranami	0,0003 % – 3 %	0,05 % – 3 %

- **Fizikalno - kemijske lastnosti**

Preglednica 13: Fizikalno kemijske lastnosti α -tokoferil acetata (41).

Lastnost	Vrednost
CAS št.	58-95-7
Molekulska masa	472,74 g/mol
Gostota	0,96 g/cm ³ pri 20 °C
Temperatura tališča	-28 °C
Temperatura vrelišča	224 °C pri 0,3 mm Hg

- **Toksikokinetika**

Po peroralni aplikaciji se tokoferil acetat z esterazami prisotnimi v črevesju pred absorpcijo delno hidrolizira do tokoferola (glej poglavje o tokoferolu), pri čemer med procesom absorpcije ne pride do ponovne esterifikacije tokoferola. Tako se del tokoferil acetata absorbira v obliki tokoferola, preostali del pa v obliki tokoferil acetata (26).

Rezultati *in vitro* študij dermalne absorpcije tokoferil acetata izvedenih na človeški in prašičji koži kažejo, da le-ta prehaja v kožo, pri čemer prihaja do pretvorbe (hidrolize tokoferil acetata) v tokoferol, kar nakazuje na aktivnost esteraz prisotnih v koži. Tudi *in*

vivo študiji, ki so ju izvedli na miših sta pokazali, da se tokoferil acetat absorbira v kožo in (v določenem obsegu) pretvori v tokoferol (24, 26).

Kot smo že omenili je aktivna oblika tokoferil acetata, ki ima antioksidativne lastnosti, tokoferol.

V eni od *in vitro* študij pri kateri so na površino 0,636 cm² »žive« prašičje kože nanесли 5 μl (ekvivalentno 4 mg) 5% m/m raztopino *d*-α-tokoferil acetata v izopropil miristatu in ugotovili, da se je po 24 urah v žive plasti kože (ne vključuje rožene plasti) absorbiralo ~3,2% aplicirane količine *d*-α-tokoferil acetata (~10,06 μg/cm²). V sklopu iste študije se je po nanosu 5% m/m o/w emulzije *d*-α-tokoferil acetata in preteku 24 ur, v žive plasti kože (ne vključuje rožene plasti) absorbiralo ~5,6% aplicirane količine *d*-α-tokoferil acetata (~17,61 μg/cm²). Delež α-tokoferil acetata, ki je kožo penetriral (v receptorskem mediju) je bil pod mejo zaznavnosti. Po aplikaciji obeh formulacij je v koži prišlo do metabolizma oz. hidrolize *d*-α-tokoferil acetata do njegove aktivne oblike - *d*-α-tokoferola (Preglednica 14) (42).

Preglednica 14: Delež (%) v živih plasteh kože prisotnega α-tokoferola glede na celokupno količino v koži prisotnega α-tokoferil acetata in njegovega metabolita α-tokoferola (42).

Čas / formulacija	Raztopina	Emulzija
2 h	100 %	100 %
6 h	85,4 %	62,6 %
12 h	65,5 %	76,5 %
24 h	80,2 %	44,1 %

Daljši čas (24h), kot je razvidno iz preglednice 14, ni doprinesel k povišanju deleža metabolita, kar je lahko posledica zasičenosti encimov (esteraz) v koži ali pa zmanjšanja njihove »aktivnosti« po 24h saj so poskus izvedli *in vitro* (42). Prav tako je opazna razlika v deležu nastalega metabolita v istem času po apliciranju raztopine oz. emulzije, kar je (verjetno) posledica razlik v hitrosti absorpcije *d*-α-tokoferil acetata iz različnih formulacij.

- **Akutna toksičnost**

Izvedli so več študij v katerih so določili akutno peroralno toksičnost, in sicer >4 g/kg TT – >16 g/kg TT (LD50) za podgane in >4 g/kg TT (LD50) za miši. S študijo izvedeno na albino podganah pa so za tokoferil acetat določili akutno dermalno toksičnost >3 g/kg TT

(LD50). Posamezni skupini petih živalim so aplicirali 1 oz. 3 g/kg TT tokoferil acetata v rastlinskem olju za dobo 24 ur pod okluzijskimi pogoji. Po 24 – 48 urah je bil opazen blag eritem (rdečica). Blago abrazijo kože so opazili pri eni samički pri kateri so aplicirali 1 g/kg TT in pri dveh samičkah ter dveh samcih na katere so aplicirali 3 g/kg TT (24, 26).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

Pri prvi študiji so podgane (vrsta: Charles River CD) 104 tedne hranili z odmerki 500, 1000 oz. 2000 mg *all-rac- α* - tokoferil acetata/kg TT/dan, pri drugi so podgane (vrsta: Fischer) 13 tednov hranili s 125, 500 oz. 2000 mg *RRR- α* -tokoferil acetata/kg TT/dan in v tretji študiji so podganje samce (vrsta: Sprague-Dawley) 7 dni hranili s 600 oz. 1000 mg *RRR- α* -tokoferil acetata/kg TT/dan. Iz podatkov pridobljenih na podlagi omenjenih treh študij so opredelili LOAEL vrednost, ki znaša 500 mg α -tokoferil acetata/kg TT/dan. Pri LOAEL vrednosti je pri prvi študiji prišlo do pojava krvavitev in povišanja protrombinskega časa. V drugi študiji pa so pri isti vrednosti (500 mg/kg TT/dan) zaznali minimalno povečanje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa, medtem ko so se pri najvišjih odmerkih pojavili še drugi neželeni učinki kot so povišanje protrombinskega časa, retikulocitoza, znižanje hematokrita in koncentracij hemoglobina ter krvavitve. Pri tej (drugi) študiji je 7 od 10 samčkov med 9. in 11. tednom, zaradi notranjih krvavitev poginilo oz. so bili v umirajočem stanju usmrčeni. Visoki odmerki tokoferola oz. tokoferil acetata namreč lahko povzročijo hemoragične učinke. Z upoštevanjem najnižjega odmerka 125 mg α -tokoferil acetata/kg TT/dan, pri katerem niso zaznali nobenih neželenih učinkov in LOAEL vrednosti, so z ekstrapolacijo določili NOAEL vrednost 250 mg α -tokoferil acetata/kg TT/dan (24, 26, 43).

V 28-dnevni študiji izvedeni na psih pasme Beagle, katerim so peroralno aplicirali *dl- α* -tokoferil acetat v odmerkih 45, 90, 180 in 360 mg/kg TT/dan, so določili NOAEL ≥ 360 mg/kg TT/dan (44).

Na podlagi 28 dnevne študije s peroralno aplikacijo *dl-* oz. *all-rac- α* -tokoferil acetata, ki so jo izvedli na podganah (vrsta: Wistar) so določili NOAEL vrednost 2000 mg/kg TT/dan. Enako NOAEL vrednost 2000 mg/kg TT/dan so določili tudi pri 90 dnevni študiji s peroralno aplikacijo *RRR- α* -tokoferil acetata, ki so jo izvedli na mini prašičih pasme Göttingen (44).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

α -Tokoferil acetat generalno ni imel nobenih reproduktivnih in razvojnih toksičnih učinkov pri kuncih, hrčkih, podganah in miših. Dejansko je imel prav tako kot tokoferol celo blagodejen vpliv na zmanjšanje števila deformacij pri potomcih (mladičih) diabetičnih samic (26).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

Pri dveh Amesovih testih izvedenih z in brez metabolne aktivacije se je tokoferil acetat izkazal kot nemutagen. Prav tako se je pri testu kromosomskih aberacij na humanih limfocitih z in brez metabolne aktivacije, α -tokoferil acetat izkazal kot negenotoksičen. (24).

- **Kancerogenost**

Negativne rezultate so dobili pri študiji kancerogenosti, ki so jo izvedli na podganah, pri čemer so *dl*- α -tokoferil acetat aplicirali peroralno. Nasprotno pa je pri študijah izvedenih na miših in podganah pri katerih so subkutano aplicirali čisti *dl*- α -tokoferil acetat ali *dl*- α -tokoferil acetat v sojinem oz. v palmovem olju, pri določenem odstotku živali prišlo do nastanka neoplazem (Preglednica 15). Medtem ko čisto sojino oz. palmovo olje ni povzročilo nastanka neoplazem. Podobne učinke je izkazoval tudi α -tokoferol s to razliko, da pri subkutani aplikaciji čistega α -tokoferola ni prišlo do pojava neoplazem (glej poglavje o tokoferolu – kancerogenost). V študiji na miših je dermalno apliciran *dl*- α -tokoferil acetat v acetonu promoviral fotokancerogenezo, kar je ravno nasprotno od *dl*- α -tokoferola, ki je fotokancerogenezo zaviral (24, 26, 45).

Preglednica 15: Pojav neoplazem po subkutani aplikaciji (26).

Substance / Žival	Miš	Podgana
čisti <i>dl</i> - α -tokoferil acetat	20% (samčki)	82,4%
<i>dl</i> - α -tokoferil acetat + sojino olje	20% (samčki) / 40% (samičke)	66,7%
<i>dl</i> - α -tokoferil acetat + palmovo olje	20% (samčki)	22,2%

- **Okularna iritacija**

V študiji okularne iritacije izvedeni na kuncih, se je tokoferil acetat izkazal kot nedražeč, medtem ko je v drugi študiji, prav tako izvedeni na kuncih, povzročil blago do zmerno draženje očesne veznice (konjunktive) (24).

Tako so pri prvi študiji nerazredčen tokoferil acetat aplicirali v konjunktivalne vrečice treh kuncev in v 1 – 48 ur po aplikaciji je prišlo do blage iritacije, ki pa je po 72 urah izzvenela. V drugi študiji pa so nerazredčen *dl*- α -tokoferil acetat aplicirali v očesa 7 kuncev, pri čemer je prišlo do blagega oz. zmernega draženja konjunktive (očesne veznice), ki pa je do 7 dne izzvenelo (24).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

Rezultati kliničnih študij na ljudeh so pokazali, da tokoferil acetat ni iritant in ne senzitivizator. Pri študijah na kuncih tokoferil acetat ni izkazoval iritacijskih učinkov. Prav tako se je tokoferil acetat pri maksimizacijskem testu na morskih prašičkih (GPMT) izkazal kot nesenzitivizator. Tudi druge študije so pokazale, da tokoferil acetat ni iritant oz. senzitivizator (24, 26).

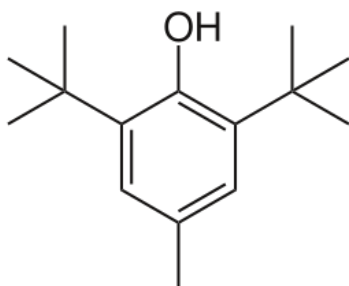
Alergijske reakcije (kontaktni alergijski dermatitis) na tokoferil acetat so možne, vendar se le-te pojavijo v zelo redkih primerih (24, 46).

- **Ostali toksikološki podatki**

Študija izvedena na 11 prostovoljcih je pokazala, da tokoferil acetat ni fototoksičen. Prav tako se je pri študiji izvedeni na 20 morskih prašičkih izkazalo, da tokoferil acetat ni fotoalergen (24, 26).

4.2.3 Butil-hidroksitoluen (BHT)

BHT je lipofilna organska spojina – derivat fenola, ki se pridobiva sintezno (Slika 6). Ugotovili pa so, da so tudi fitoplankton, zelene alge in nekatere cianobakterije, sposobni sinteze oz. produkcije butil-hidroksitoluena (47).



Slika 6: Strukturna formula butil-hidroksitoluena (47).

BHT prav tako kot vitamin E deluje kot primarni antioksidant, saj preprečuje oz. zavira potek avtooksidacije (Slika 1).

- **Uporaba**

Uporaba BHT je zelo pogosta / razširjena, saj se uporablja oz. dodaja v številne izdelke kot so hrana, kozmetični in farmacevtski izdelki, transformatorska in motorna olja ter goriva. V Evropski uniji ga kot dodatek k hrani vodimo pod imenom E321. FDA prav tako dovoljuje uporabo BHT kot dodatek k hrani – npr. v rižu je dovoljena uporaba do 0,0033 masnih %, v perutninskih izdelkih se ga lahko doda do 0,01% glede na vsebnost maščob. Kot dodatek k hrani ima dodeljen status GRAS (47, 48).

Na podlagi najnovejših toksikoloških podatkov je Svet EFSA za živilske aditive in hranilne vire, dodane živilom (ANS) opredelil ADI, ki znaša 0,25 mg BHT/kg TT/dan (49).

V kozmetičnih izdelkih ima funkcijo antioksidanta in se je v preteklosti uporabljal tudi v koncentracijah do 1%. Podatki posredovani s strani industrije v letu 1999 kažejo uporabo BHT v kozmetičnih izdelkih v koncentracijah od 0,0002% oz. 0,01% do 0,5%. Številni drugi viri pa navajajo uporabo BHT v kozmetičnih izdelkih v koncentracijskem območju od 0,01% do 0,1% (48).

- **Fizikalno - kemijske lastnosti**

Preglednica 16: Fizikalno-kemijske lastnosti butil-hidroksitoluena (47).

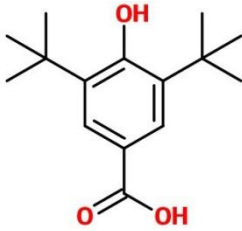
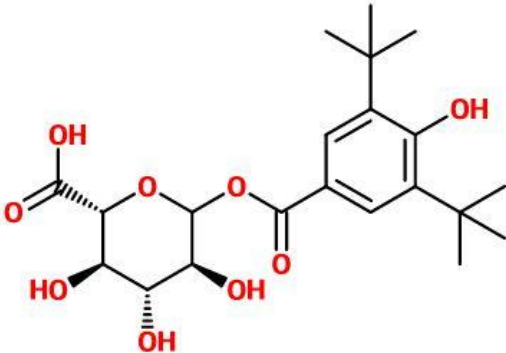
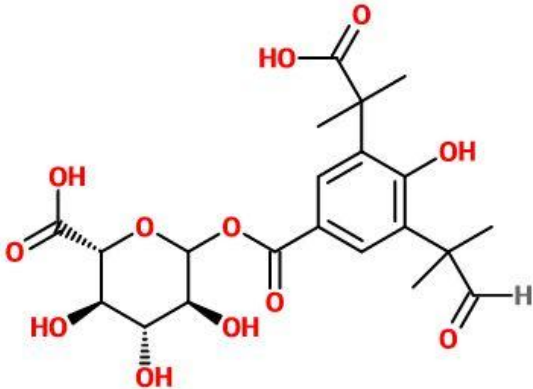
Lastnost	Vrednost
CAS št.	128-37-0
Molekulska masa	220,35 g/mol
Gostota	1,048 g/cm ³ v trdnem stanju
Temperatura tališča	70 – 73 °C
Temperatura vrelišča	265 °C pri 100 kPa

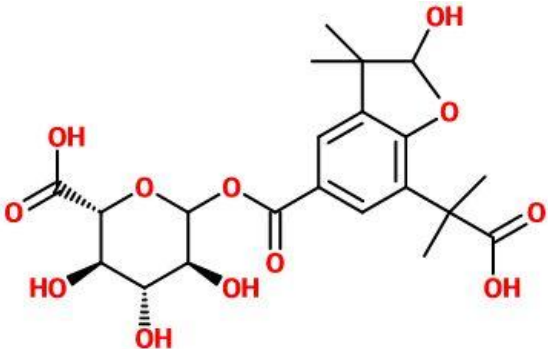
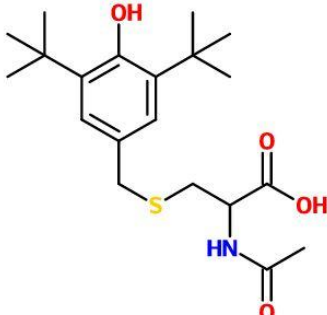
- **Toksikokinetika**

Študije ADME procesov BHT so bile izvedene na miših, podganah, kuncih, piščancih, opicah in ljudeh. Vse študije so pokazale dobro absorpcijo BHT iz gastrointestinalnega trakta. Po absorpciji se BHT porazdeljuje in akumulira predvsem v maščobnih tkivih, v

manjšem obsegu pa tudi v jetrih. Tako za BHT v maščobnih tkivih kot v jetrih, velja eliminacijski razpolovni čas od 7 do 10 dni, pri čemer se v največji meri eliminira z urinom in v manjši meri z blatom. Eliminacija preko jeter (z žolčem) poleg omenjenega pri človeku ni tako izrazita kot pri podganah, kuncih in psih. Identificiranih je bilo več metabolnih poti in metabolitov, ki se v različnih živalskih vrstah in človeku razlikujejo. V preglednici 17 so navedeni metaboliti BHT najdeni v človeškem urinu (48, 49, 50).

Preglednica 17: BHT metaboliti v človeškem urinu (48, 51, strukturne formule izdelane na spletni strani www.emolecules.com).

Metabolit in izločen delež glede na apliciran odmerek (%)	Kemijska struktura
<p><i>3,5-di-terc-butil-4-hidroksibenzojska kislina</i></p> <p>»BHT-kislina«</p> <p>0,3% oz. 1% apliciranega odmerka</p>	
<p><i>3,5-di-terc-butil-4-hidroksibenzojska kislina zaestrena z glukuronsko kislino</i></p> <p>»BHT-kislina-glukuronid«</p> <p>2% apliciranega odmerka</p>	
<p><i>4-karboksi-2-(1-karboksi-1-metiletil)-6-(1-formil-1-metiletil)fenol zaestren z glukuronsko kislino*</i></p> <p>»BHT-(kislina)₂(aldehid)-glukuronid«</p> <p>35% apliciranega odmerka</p>	

Metabolit in izločen delež glede na apliciran odmerek (%)	Kemijska struktura
<p>5-karboksi-7-(1-karboksi-1-metiletil)-3,3-dimetil-2-hidroksi-2,3-dihydrobenzofuran zaestren z glukuronsko kislino*</p> <p>»BHT-(kislina)₂(hemi)-glukuronid«</p> <p>21% apliciranega odmerka</p>	
<p><i>S</i>-(3,5-di-<i>tert</i>-butil-4-hidroksibenzil)-<i>N</i>-acetilcistein</p> <p>»BHT-merkapturna kislina«</p> <p>V sledovih (skoraj nič)</p>	

* Esterifikacija z glukuronsko kislino lahko poteče tudi preko druge karboksilne skupine prisotne na metabolitu BHT.

Ker kozmetične izdelke v največji meri nanašamo/apliciramo na kožo, so v okviru toksikokinetike pomembne tudi študije dermalne absorpcije.

Pri *in vitro* študiji dermalne absorpcije so na 0,79 cm² prašičje kože za 30 min aplicirali 158 µl raztopine BHT v koruznem olju s koncentracijo 1 mg/ml. Nato so raztopino iz kože izprali in jo pustili v testni celici nadaljnjih 72 ur. Ugotovili so, da se je po 72 urah v žive plasti kože absorbiralo 0,29 % aplicirane količine (0,54 µg/cm²) in penetriralo 0,07 % aplicirane količine (0,13 µg/cm²) (48).

- **Akutna toksičnost**

V študiji izvedeni na podganah v skladu s smernico OECD 402, pri kateri so dermalno aplicirali 10% m/v raztopino BHT, so določili LD₅₀ > 2.000 mg BHT/kg TT. Opazili niso nobenih kliničnih znakov, prav tako ni prišlo do spremembe telesne teže (50).

Pri določitvi akutne peroralne toksičnosti so izvedli študijo na podganah v skladu s smernico OECD 401. Peroralno so aplicirali do 2.930 mg BHT/kg TT v obliki 10% m/v raztopine, pri čemer niso opazili nobenih sprememb oz. učinkov. Prav tako niso opazili

nobenih sprememb pri podganah moškega in ženskega spola, katerim so v enkratnem odmerku peroralno aplicirali 10.000 mg BHT/kg TT v obliki suspenzije (50).

Zaključili so, da je BHT zelo nizko akutno toksičen tako po dermalni kot tudi peroralni aplikaciji (50).

Nekatere druge študije akutne peroralne toksičnosti poročajo vrednosti LD50 1.700 – 1.970 mg BHT/kg TT pri podganah, 2.100-3.200 mg BHT/kg TT pri kuncih, 10.700 mg BHT/kg TT pri morskih prašičkih, 940-2.100 mg BHT/kg TT pri mačkah in 2.000 mg BHT/kg TT pri miših (49).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

Študije toksičnosti pri peroralno apliciranih ponavljajočih odmerkih na podganah nakazujejo na prizadetost jeter in ščitnice. Odmerki večji od 25 mg BHT/kg TT/dan so povzročili hiperaktivnost ščitnice, povečanje jeter in indukcijo številnih jetrnih encimov, tako so predlagali vrednost NOAEL 25 mg BHT/kg TT/dan. Pri nekaterih vrstah podgan in miši je pri ponavljajočih visokih odmerkih > 500 mg BHT/kg TT/dan, prišlo do krvavitev. Predpostavili so, da BHT vpliva oz. interagira s protrombinom in vitaminom K (50).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

V študiji, ki je vključevala tri generacije miši, sta F0 in F1 generaciji v prehrani prejemale 0, 23, 68, 203 oz. 608 mg BHT/kgTT/dan, tako v času pred parjenjem, med parjenjem, nosečnostjo in dojenjem. Pri nobeni od F1 in F2 skupin živali niso zaznali učinkov na velikost, težo in število zarodov oz. legel. Prav tako ni bilo nobenih vplivov na število mladičev, na razmerje med spoloma ali na nevrološko-vedenjske parametre F1 in F2 generacij (50).

Pri dveh izvedenih študijah, ki sta vključevali dve generaciji podgan, so pri prvi študiji za maternalno toksičnost (F0 živali), določili NOAEL 100 mg BHT/kg TT/dan, saj je pri višjih odmerkih prišlo do občutnega zmanjšanja pridobljene teže F0 živali. Pri podganah, ki so dobivale odmerke 100 mg BHT/kg TT/dan in več, je prišlo do občutnega zmanjšanja zarodov oz. legel, ki bi običajno vsebovala 10 ali več mladičev. Prav tako so pri teh mladičih zaznali, od odmerka odvisno znižanje telesne teže, ki so jo mladiči pridobili v času do prenehanja laktacije. Posledično so določili NOAEL 25 mg BHT/kg TT/dan. Pri

drugi izvedeni študiji, ki je vključevala dve generaciji podgan iste vrste kot v prejšnji študiji, pa so zaznali nekoliko manjšo maternalno toksičnost, kjer so določili NOAEL 500 mg BHT/kg TT/dan in manjšo toksičnost pri mladičih, kjer so določili NOAEL 100 mg BHT/kgTT/dan (50).

Študija teratogenosti na miših, pri kateri so le-te hranili z odmerki do 800 mg BHT/kg TT/dan, ni pokazala teratogenega potenciala BHT, tako so za razvojno toksičnost določili NOAEL 800 mg BHT/kg TT/dan. Zaznali pa so učinek na mater (povečana teža vranice in znižana teža ledvic) pri odmerkih višjih od 240 mg BHT/kg TT/dan (50).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

Pri številnih izvedenih Amesovih testih z in brez metabolne aktivacije BHT ni povzročil mutacij. Prav tako so bili negativni testi mutagenosti na sevih *E. coli*. Hipoksantin-gvanin fosforibozil transferazni (HPRT) test izveden na podganjih jetrnih celicah je bil negativen pri koncentracijah 50, 60, 70, 80, 90 µg BHT/ml. Drugi HPRT test, izveden na V79 celicah kitajskega hrčka, pa je bil pozitiven le pri citotoksičnih koncentracijah, vendar pa trend, ki se kaže pri tem testu ne omogoča nedvoumnih zaključkov. Zaključili so, da BHT ne kaže potenciala za povzročitev točkovnih mutacij v bakterijskih in sesalskih celicah (50, 52).

Testi kot so metoda izmenjave sestrskih kromatid (SCE) in test kromosomskih aberacij so pokazali, da BHT *in vitro* nima klastogene aktivnosti (50).

Študije *in vivo* so potrdile rezultate *in vitro* testov in pokazale, da BHT nima klastogene aktivnosti ter potenciala za povzročitev točkovnih mutacij (50).

- **Kancerogenost**

Izvedene so bile številne študije, pri čemer je pri enih prišlo do povišanega pojava tumorjev, pri drugih pa vpliva na pojavnost tumorjev ni bilo opaziti oz. je bila le-ta zmanjšana. V dvo-generacijski študiji izvedeni na podganah so bile le-te izpostavljene odmerkom od 0 do 250 mg BHT/kg TT/dan. Študija je trajala 144 tednov, pri čemer so bile podgane izpostavljene BHT že v *in utero* fazi. Pri študiji so zaznali kancerogene učinke – pojav hepatocelularnega karcinoma, le-te pa so pripisali k specifičnim testnim pogojem, vendar pa niso popolnoma ovrgli možnosti, da hepatotoksični učinki visokih odmerkov BHT, lahko rezultirajo v trajni celični proliferaciji, ki je znan možen mehanizem delovanja

negenotoksičnih kancerogenov. Za možen kancerogeni in tumor promotorski učinek BHT so predlagali mejno vrednost 100 mg BHT/kg TT/dan, pri kateri po kronični izpostavitvi niso zaznali povečanja pojava jetrnega karcinoma, ampak le rahlo povečanje pojavnosti jetrnih adenomov. Kasneje so bile izvedene tri študije na podganah, ki pa niso potrdile rezultatov pridobljenih s predhodno navedeno študijo. Poleg omenjenega so študije pokazale, da lahko BHT deluje kot anti-kancerogen ali pa kot tumor promotor, odvisno od odmerka in časa izpostavitve. V zaključku so navedli, da BHT ni genotoksični kancerogen, in da lahko pri visokih odmerkih pri nekaterih živalskih modelih učinkuje kot tumor promotor. Zaključili so, da na podlagi študij kancerogenosti na podganah in miših, NOAEL vrednosti ni mogoče določiti (49, 50).

V študijah na živalskih modelih (miši) pri kateri so le-te hranili z BHT obogateno hrano, so ugotovili, da BHT preprečuje oz. zavira fotokancerogenezo (53).

Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC) BHT uvršča v skupino 3 – snovi, ki se jih ne da klasificirati kot kancerogene za ljudi (54).

- **Okularna iritacija**

Pri Draize-ovem testu na šestih kuncih je BHT pri vseh živalih v 24 urah po aplikaciji 100 mg BHT (nerazredčen), povzročil blag konjunktivitis (vnetje očesne veznice). Simptomi so po 72 urah popolnoma izzveneli, zato so BHT karakterizirali kot blag okularni iritant (50).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

Izvedena je bila študija na kuncih, pri kateri so pod semi-okluzijskimi pogoji aplicirali 500 mg nerazredčenega BHT na nepoškodovano in na poškodovano kožo. Na nepoškodovani koži so pri 3/6 živali po 24 urah in pri 2/6 živali po 72 urah opazili eritem. Do pojava edema je prišlo pri 1/6 živali po 24 urah in pri nobenem kuncu po 72 urah. Na poškodovani koži sta se po 24 urah pri 1/6 živali pojavila eritem in edem in pri nobenem kuncu po 72 urah. Zaključili so, da ima BHT rahlo dražeč učinek na kožo kuncev (50). Omenjena študija je nekoliko kontradiktorna, saj je do pojava eritema prišlo pri večjem številu živali z nepoškodovano kožo kot pri živalih s poškodovano kožo.

V starejši študiji (leta 1952) izvedeni z obližem na 15 osebah se je BHT izkazal kot blag iritant in senzitivizator. Vendar pa so bili rezultati novejših študij pri katerih so prav tako

uporabili teste z obližem na večjem številu oseb negativni. Sicer pa pojava senzitivacije kože v posameznih primerih ni mogoče izključiti (50).

- **Ostali toksikološki podatki**

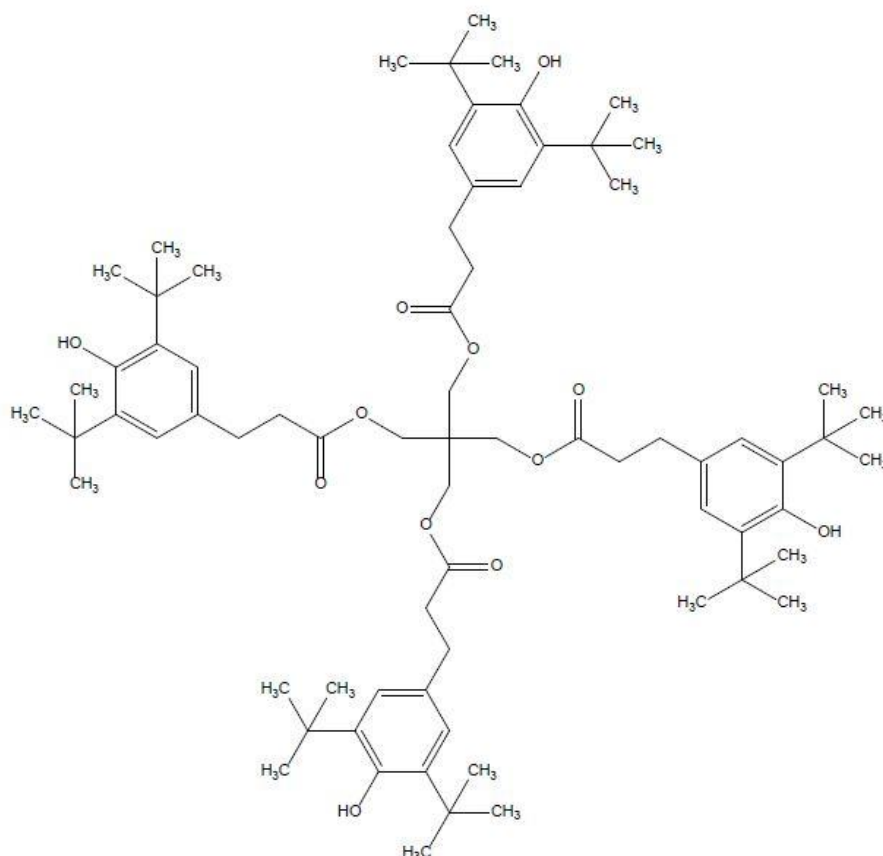
Čeprav je BHT v razširjeni uporabi že vrsto let, obstajajo le redki primeri senzitivacije kože. Občasno so poročali o pojavu kontaktnega dermatitisa po dermalni izpostavitvi in o alergijskih reakcijah po zaužitju BHT in BHA (50).

Študije so tudi pokazale, da BHT ne povzroča fotosenzitivacije (48).

Študija, ki so jo izvedli na podganah nakazuje možen potencial BHT, da pri odmerkih 75 mg BHT/kg TT apliciranih peroralno, deluje kot endokrini motilec, saj je izkazoval sposobnost znižanja relativne teže maternice kar je bila verjetno posledica znižanja debeline epitelija na endometriju (maternični sluznici). Povzročil je tudi nastanek minimalnega edema strome na endometriju. Nasprotno pa je študija *in vitro* pokazala, da BHT nima estrogenega ali anti-estrogenega delovanja (55, 56).

4.2.4 Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat (PTHHC)

PTHHC je cinamatni tetra-ester pentaeritritola, ki ga uvrščamo med fenolne antioksidante (Slika 7). Je lipofilna spojina, ki je zelo slabo topna in relativno dobro stabilna v vodi. Razpolovni čas v vodi znaša 2 leti pri 25 °C kot posledica hidrolitičnega razpada. Kot prisotno nečistoto so identificirali metil 3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksifenil) propionat (57, 58).



Slika 7: Strukturna formula pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroksihidrocinamat (57).

V primeru hidrolize estrskih vezi nastanejo 4 molekule, ki so po strukturi podobne BHT.

- **Uporaba**

Uporablja se v večih vrstah kozmetičnih izdelkov, ki se nanašajo na kožo, ustnice, lasišče in predele okoli oči. S strani proizvajalca je navedena najvišja dovoljena koncentracija 0,3% PTHHC v končnih izdelkih, ki ostanejo na koži (leave – on) in 0,5% v izdelkih, ki se izperejo (rines – off) (58).

Študija iz leta 2013 nakazuje, da se PTHHC v kozmetičnih izdelkih uporablja v koncentracijah do 0,8%, njegova uporaba pa je razširjena tudi na nekozmetične izdelke, saj se uporablja tudi kot antioksidant oz. stabilizator v različnih polimerih in lubrikantih uporabljenih pri embalaži namenjeni za uporabo v prehrabeni industriji. Ker lahko v teh primerih prihaja do stika s hrano, veljajo za PTHHC določene omejitve vsebnosti. Vsebnost PTHHC je omejena na 0,1% m/m, 0,5% m/m ali 1% m/m, odvisno od vrste uporabljenega polimera (57, 58).

- **Fizikalno - kemijske lastnosti**

Preglednica 18: Fizikalno-kemijske lastnosti PTHHC (57).

Lastnost	Vrednost
CAS št.	6683-19-8
Molekulska masa	1177,8 g/mol
Gostota	1,15 g/cm ³
Temperatura tališča	115 – 118 °C
Temperatura vrelišča	281 °C pri 101,3 kPa
Log K _{ow}	> 8 pri 25 °C

- **Toksikokinetika**

Relevantnih oz. verodostojnih podatkov o toksikokinetiki oz. ADME procesih PTHHC še ni na voljo (57).

- **Akutna toksičnost**

Pri študiji izvedeni na podganah so peroralno aplicirali 25% m/v suspenzijo PTHHC v koruznem olju, v odmerkih 4.556, 6.834 in 10.250 mg PTHHC/kg TT. Nobena od živali ni poginila, prav tako niso zaznali nobenih signifikantnih neželenih učinkov. Po koncu študije so določili LD50 > 10.250 mg PTHHC/kg TT. Pri drugih študijah, ki so vključevale podgane oz. miši pa so določili LD50 > 5.000 mg PTHHC/kg TT (57).

Študija akutne dermalne toksičnosti je bila izvedena na kuncih s 24-urno aplikacijo PTHHC v koruznem olju na abdominalni predel pod okluzijskimi pogoji. Uporabljeni so bili odmerki 100, 316, 1000 in 3.160 mg PTHHC/kg TT, nobena od živali ni poginila. Na

koncu študije ni bilo opaznih znakov iritacije, tako so določili $LD_{50} > 3.160$ mg PTHHC/kg TT. Prav tako ni bilo nobenih znakov sistemske toksičnosti kot posledice perkutane absorpcije (57).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

V študiji, katere protokol je bil podoben smernici OECD 409, ki so jo izvedli na psih pasme Beagle, so le-te hranili s koncentracijami do 10.000 ppm. Ugotovili so, da ni prišlo do nobenih neželenih učinkov, ki bi bili posledica izpostavljenosti PTHHC. Tako so določili NOAEL vrednost 10.000 ppm, kar je ekvivalentno 301,8 mg PTHHC/kg TT/dan za samčke in 343 mg PTHHC/kg TT/dan za samičke (57, 59).

Pri študiji izvedeni na podganah so le-te hranili s hrano, ki je vsebovala 1.000, 3.000 in 10.000 ppm PTHHC. Študija je trajala 2 leti in je bila izvedena po podobnem protokolu kot ga navaja smernica OECD 453. Opazili niso nobenih očitnih kliničnih znakov povezanih s testno substanco, a so vseeno zaključili, da zaradi minimalnih učinkov na pridobitev telesne teže, porabo hrane in teže ščitnice, NOAEL vrednost znaša 3.000 ppm, kar je ekvivalentno 135 mg PTHHC/kg TT/dan za samčke in 166 mg/kg TT/dan za samičke (57, 59).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

Pri Amesovem testu z in brez metabolne aktivacije so uporabili koncentracije do 250 µg PTHHC/0,1 ml (brez metabolne aktivacije) in do 100 µg PTHHC/0.1 ml (z metabolno aktivacijo). V nobenem primeru ni prišlo do povišanja reverzних mutacij. Tako so določili, da PTHHC ne povzroča reverzних mutacij. Negativne rezultate so dobili tudi pri drugem Ames-ovem testu z in brez metabolne aktivacije, pri katerem so uporabili koncentracije do 5.000 µg PTHHC/petrijevko (57).

Pri *in vivo* študiji so izvedli dominantni letalni test genotoksičnosti na miših po podobnem protokolu kot ga navaja smernica OECD 478. Rezultati so bili negativni, vključno z najvišjim uporabljenim odmerkom 3.000 mg PTHHC/kg TT. Za negativnega se je izkazal tudi test kromosomskih aberacij izveden na hrčkih, katerim so peroralno aplicirali 500, 1.000 oz. 2.000 mg PTHHC/kg TT. Rezultati so prav tako bili negativni pri mikro-jedrnem testu izvedenem na miših, katerim so peroralno aplicirali 5.000 mg PTHHC/kg TT (57).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

Pri dvo- oz. tri- generacijski študiji so podgane hranili s hrano, ki je vsebovala 1.000, 3.000 oz. 10.000 ppm PTHHC. Nobena od F0 in F1 podgan ni poginila, prav tako pa niso zaznali nobenih z aplikacijo PTHHC povezanih učinkov. Pri obravnavi potomcev podgan F0 in F1 niso opazili nobenih učinkov, ki bi bili posledica izpostavitve staršev PTHHC-ju. Za F0 starše in njihove F1 ter F2 potomce so določili NOAEL vrednost, ki znaša 10.000 ppm PTHHC (57).

V drugi študiji, ki so jo izvedli na miših so v obdobju od 6. do 15. dne brejosti le-te hranili s 150, 500 oz. 1.000 mg PTHHC/kg TT/dan. Študija ni pokazala nobenih učinkov, tako na mater kot na plod, povezanih z aplikacijo PTHHC, zato so za mater in za plod določili NOAEL 1.000 mg PTHHC/kg TT/dan. PTHHC ni povzročil nobenih toksičnih učinkov na mater in ni izkazal nobenih teratogenih učinkov (57).

- **Kancerogenost**

Študijo kronične peroralne toksičnosti so izvedli na podganah, pri kateri so le-te 2 leti hranili s hrano, ki je vsebovala 1.000, 3.000 oz. 10.000 ppm PTHHC. Zaznali niso nobenih očitnih kliničnih oz. drugih znakov povezanih s testno substanco. Na koncu so zaradi minimalnih učinkov na pridobivanje telesne teže, porabo hrane in težo ščitnice, vseeno določili NOAEL vrednost 3.000 ppm. V razmerju do negativne kontrolne skupine živali prav tako ni bilo opaziti razlike v pojavnosti tumorjev oz. neoplazm (57).

V drugi študiji kancerogenosti so miši 2 leti hranili s hrano, ki je vsebovala 100, 300 oz. 1.000 ppm PTHHC. V povezavi s testno substanco niso zaznali nobenih kliničnih znakov, prav tako le-ta ni vplivala na smrtnost živali. Zaključili so, da PTHHC pri miših v predhodno navedenih koncentracijah ni kancerogen (57).

- **Okularna iritacija**

V študiji izvedeni v skladu s smernico OECD 405 so šestim kuncem v levo oko aplicirali 100 mg PTHHC. Opazili so blago prehodno iritacijo veznice, ki pa je v času 48 ur po aplikaciji izzvenela. Zaključili so, da testna substanca ni dražeča za očesa kuncev. Pri drugi študiji, ki je potekala po enakem protokolu in kjer so aplicirali 3 mg testne substance pa okularne iritacije niso opazili (57).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

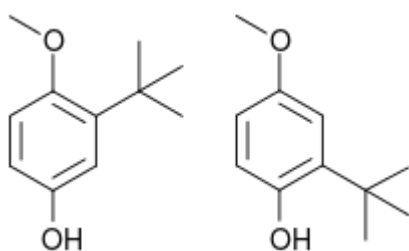
Kuncem so pod semi-okluzijskimi pogoji na poškodovano oz. nepoškodovano kožo hrbta aplicirali 500 mg PTHHC v koruznem olju. V nobenem primeru ni prišlo do pojava eritema (rdečice) ali edema (otekline). Rezultati druge študije, kjer so kuncem pod semi-okluzijskimi pogoji na kožo hrbta aplicirali 500 mg PTHHC v vodi, so bili enaki (57).

Dve študiji sta bili izvedeni na morskih prašičkih. Pri eni študiji so 0,1% PTHHC v propilen glikolu aplicirali intradermalno in dermalno, pri drugi pa 0,1% PTHHC v dimetil sulfoksidu (DMSO) intradermalno. Študiji sta pokazali, da PTHHC ne povzroča kontakte alergije oz. senzitivizacije kože (57).

HRIPT (ang. Human Repeated Insult Patch Test) študija, ki so jo izvedli na 50 osebah, kjer so aplicirali 0,5% m/v raztopino PTHHC v dimetil ftalatu, je pokazala, da testna substanca ni senzitivizator, saj v nobenem primeru ni prišlo do pojava reakcij (57).

4.2.5 Butil-hidroksianizol (BHA)

Sintezni antioksidant BHA je mešanica dveh izomerov 2-terc-butil-4-hidroksianizola in 3-terc-butil-4-hidroksianizola (Slika 9). Pri sobni temperaturi se nahaja v obliki voskaste trdne snovi, proizvaja pa se s sintezo iz 4-metoksifenola in terc-butil alkohola pri 150 °C z uporabo katalizatorja kot je silicij ali aluminijev oksid (60, 61).



Slika 8: Strukturni formuli dveh izomerov BHA (60).

- **Uporaba**

Že od leta 1947 se BHA uporablja kot antioksidant v živilih, ki vsebujejo maščobe, z namenom zaščite le-teh pred oksidacijo. V Evropi ima kot aditiv k živilom dodeljeno število E320. S strani EFSA zadnji določeni ADI znaša 1,0 mg BHA/kg TT/dan. Poleg omenjenega pa se uporablja kot antioksidant oz. konzervativ v embalaži namenjeni za

živila, v živalski krmi, kozmetičnih izdelkih, zdravilih, izdelkih iz gume in naftnih derivatih (60, 61).

Po podatkih, ki jih je leta 1981 kozmetična industrija predložila FDA se je BHA v največji meri uporabljal oz. dodajal v šminke in senčila za oko. Najpogosteje se oz. se je BHA v kozmetičnih izdelkih uporabljal v koncentracijah $\leq 0,1\%$ oz. 0,1 – 1% (62).

- **Fizikalno - kemijske lastnosti**

Preglednica 19: Fizikalno – kemijske lastnosti BHA (60).

Lastnost	Vrednost
CAS št.	25013-16-5
Molekulska masa	180,24 g/mol
Gostota	1,0587 g/cm ³ pri 20 °C
Temperatura tališča	48 – 55 °C
Temperatura vrelišča	264 – 270 °C pri 101,3 kPa

- **Toksikokinetika**

Študije procesov ADME so bile izvedene na podganah, miših, kuncih, psih, opicah in ljudeh. Rezultati so pokazali, da se BHA dobro absorbira v gastrointestinalnem traktu, metabolizira in v največji meri izloči z urinom in blatom.

Najbolj pogosti metaboliti BHA so glukuronidi, sulfati in »prosti« fenoli vključno s terc-butil-hidrokinon-om (TBHQ). TBHQ se prav tako uporablja kot antioksidant, posamezno ali v kombinaciji z drugimi antioksidanti kot so galati, BHA in BHT. JECFA in nato še EFSA sta določili ADI tudi za TBHQ, ki znaša 0,7 mg/kg TT/dan. Razmerja med pojavnostjo posameznih metabolitov se razlikujejo oz. so odvisna od živalske vrste in odmerka oz. količine apliciranega BHA (61).

Pri *in vitro* študiji dermalne absorpcije so na 1,77 cm² človeške kože nanegli 10 mg mazila z vsebnostjo BHA 0,07 %. V žive plasti kože se je po 16 urah absorbiralo 50,8 % aplicirane količine BHA (1,84 µg/cm²) in penetriralo (v receptorski medij) 2,68 % aplicirane količine BHA (0,10 µg/cm²) (63).

- **Akutna toksičnost**

Študije akutne peroralne toksičnosti so izvedli na podganah in miših. Na podganah so določili LD50 v območju 2.000 – 5.000 mg/kgTT. Pri miših pa je bila določena LD50 nekoliko nižja, in sicer v območju 1.100 – 2.000 mg/kgTT (61, 62).

Študijo akutne dermalne toksičnosti make-upa za oči z vsebnostjo BHA 0,1%, so izvedli na kuncih, in sicer po protokolu navedenemu v smernici 16 CFR 1500.40 – *Method of testing toxic substances* (CFR – Code of Federal Regulations). Za akutno dermalno toksičnost so določili LD50 > 2 g BHA/kg TT (62).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

Večje število študij peroralne toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih so izvedli na različnih živalskih modelih, kot so podgane, miši, hrčki, morski prašički, kunci, kokoši, psi in opice. V teh študijah so spremljali vpliv BHA na preživetje, rast, hematološke parametre, težo, velikost in delovanje organov, itd. Pogosto ugotovljene spremembe so bile povečanje jeter in/ali povišanje teže jeter, vendar pa teh sprememb običajno ni spremljala trajna hepatotoksičnost. Tako so spremembe na jetrih opazili pri opicah, ki so jih 4 tedne hranili s 500 mg BHA/kg TT/dan in pri psih, ki so jih 15 mesecev hranili z odmerki 250 mg BHA/kg TT/dan (62).

Pri podganah, ki so jih 110 dni hranili s hrano, ki je vsebovala 1,35% BHA, so zaznali nekrozo ledvic, povečanje ledvične votline in otekanje epiteljskih celic v tubulih (62).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

BHA v *in vitro* testih izvedenih, z in brez metabolne aktivacije, na *S. typhimurium* in *S. cerevisiae* ni deloval mutageno. Prav tako pri *in vivo* gostiteljskem testu na miših s *S. typhimurium* z apliciranimi odmerki 15, 150 in 1.500 mg BHA/kg TT ni prišlo do nastanka mutacij. Dominantni letalni test na podganah, ki so jim peroralno aplicirali 15, 150 in 1.500 mg BHA/kg TT, je prav tako pokazal, da BHA ni mutagen. Tudi *in vitro* test kromosomskih aberacij izveden na človeških embrionalnih pljučnih celicah in fibroblastih kitajskega hrčka je bil za BHA negativen (61, 62).

Izvedeni so bili še številni drugi testi, ki so podali negativne rezultate za genotoksičnost BHA. Pozitiven rezultat pa so pokazali *in vitro* testi kromosomskih aberacij na ovarijskih

in pljučnih celicah kitajskega hrčka z metabolno aktivacijo, medtem ko so bili enaki testi brez metabolne aktivacije negativni, kar nakazuje na genotoksičnost metabolitov. Rezultati študij izvedenih na hepatocitih in celicah epitelija predželodca podgan s katerimi so preučevali prelome in popravilo DNK verig, so bili negativni. Nasprotno pa so pozitivne rezultate dobili v študiji na miših, ki so jim enkratno peroralno aplicirali 2.000 mg BHA/kg TT in nato izvedli kometni test na celicah mišjega želodca in debelega črevesja (61).

Tudi druge študije v katerih so raziskovali genotoksičen potencial metabolitov BHA so pokazale, da le ti povzročajo kromosomske aberacije in druge poškodbe DNK. Tako so ugotovili, da sta TBHQ in TBQ (*terc*-butilkinon) le z metabolno aktivacijo povzročila kromosomske aberacije, medtem ko so BHA-OH (3-*terc*-butil-4,5-dihidroksianizol), BHA-o-O (3-*terc*-butilanizol-4,5-kinon) in TBQO (*terc*-butilkinon-oksid) povzročili kromosomske aberacije brez metabolne aktivacije. Tudi v *in vivo* študiji, ki so jo izvedli na podganah se je izkazalo, da TBQ povzroča poškodbe DNK. Prav tako se je v še eni študiji, ki so jo izvedli na človeških limfocitih izkazalo, da TBQ in TBHQ povzročata oksidacijske poškodbe DNK (61).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

Študije so izvedli na miših, podganah, kuncih, prašičih in opicah. S študijo reproduktivne in razvojne toksičnosti na podganah, so določili NOAEL vrednost 100 mg BHA/kg TT/dan. Pri odmerkih višjih od NOAEL so zaznali zaostanek pri rasti, povečano umrljivost in vedenjske spremembe mladičev (61).

Na podlagi študije izvedene na kuncih, ki so jih hranili z odmerki do 400 mg BHA/kg TT/dan, so določili NOAEL vrednost enako najvišjim odmerkom, saj v študiji niso zaznali nobenih vplivov BHA (61).

- **Kancerogenost**

Izvedene so bile številne študije dolgoročne toksičnosti in kancerogenosti BHA, tako na živalih s predželodcem (podgane, miši, hrčki) kot tudi na živalih brez predželodca (morski prašički, psi).

S študijami so ugotovili, da je pri živalih hranjenih z do 1.000 mg BHA/kg TT/dan (2% BHA v hrani), ki imajo predželodec prišlo do proliferacijskih sprememb le-tega. Tako so hiperplazije epitelija, papilome in karcinome odkrili le pri živalih s predželodcem. (61).

V številnih drugih študijah kancerogenosti pa so bili rezultati negativni, tako so bili rezultati negativni pri študijah izvedenih na miših katerim so:

- s subkutanim injiciranjem aplicirali enkratni odmerek 10 mg BHA v trioktanoinu;
- s intraperitonealnim injiciranjem, 8 tednov 3x tedensko, aplicirali 1,2 oz. 6,0 g BHA/kg TT;
- topikalno aplicirali 0,1 ali 10 mg BHA v acetonu 1x tedensko za dobo 323 oz. 509 dni;
- prav tako topikalno aplicirali 1 mg BHA v acetonu 2x tedensko za dobo 30 tednov (62).

Rezultati so bili negativni tudi v študij na podganah, ki so jih 21 do 22 mesecev hranili s hrano, ki je vsebovala do 0,12% BHA, in v študiji na podganah, ki so jih 2 leti hranili s hrano, z vsebnostjo BHA do 0,1%. Negativni so bili tudi rezultati študije izvedene na psih, ki so jih 15 mesecev hranili z do 250 mg BHA/kg TT/dan (62).

S strani Mednarodne agencije za raziskovanje raka (IARC) se BHA uvršča v skupino 2B – možne kancerogene snovi za ljudi (54).

- **Okularna iritacija**

V dveh študijah izvedenih na kuncih, so ugotavljali iritacijski potencial obraznega pudra oz. senčila za oko, ki posamično vsebujeta 0,2% BHA. Kuncem so v levo oko aplicirali 0,1 ml testnega materiala in spremljali ter na koncu ocenili stopnjo iritacije. V obeh študijah so dobili podobne rezultate. Pri nekaterih kuncih ni prišlo do okularne iritacije, pri drugih pa je bila zaznana okularna iritacija, ki je bila pri maksimalni vrednosti ocenjena z oceno okularne iritacije 2, pri čemer je najvišja vrednost ocene 110. Zaključili so z ugotovitvijo, da je BHA minimalen oz. blag okularni iritant (62).

V še eni študiji izvedeni na kuncih v skladu s smernico 16 CFR 1500.42 – *Test for eye irritants* so ugotavljali, ali očesni make-up, ki vsebuje 0,1% BHA, povzroča okularno iritacijo. Tako so v eno oko kuncev aplicirali 0,1 ml testnega materiala, v nobenem primeru ni prišlo do okularne iritacije (62).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

V treh študijah iritacije kože, izvedenih na kuncih, so testirali kremo za sončenje z vsebnostjo 0,1% BHA, ter senčilo za oko in obrazni puder, ki sta vsak vsebovala 0,2% BHA. Pri vsaki študiji so na kožo na hrbtni strani kuncev pod okluzijskimi pogoji aplicirali 0,1 ml testne formulacije. Ob zaključku študij so ocenili intenzivnost iritacij z indeksom primarne iritacije od 0 (ni iritacije) do 4 (močna iritacija). Ugotovili so pojav blage iritacije z ocenami 0,46 pri kremi za sončenje, 0,4 pri senčilu za oko in 0,11 pri obraznem pudru (62).

Številne študije izvedene na ljudeh so pokazale, da BHA v koncentracijah do 0,2% ne povzroča iritacije in/ali senzitivizacije kože, ali pa ima minimalni oz. blag iritacijski in/ali senzitivizacijski učinek na kožo (62).

- **Fototoksičnost in fotosenzitivizacija**

Več kliničnih študij je pokazalo, da BHA v kozmetičnih izdelkih v večini primerov ni fotosenzitivizator (62).

- **Endokrino delovanje**

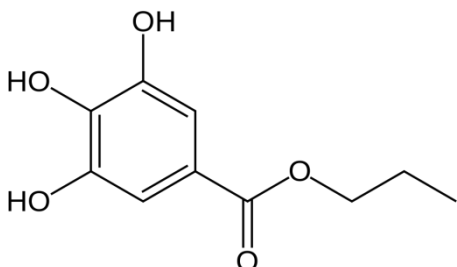
Študija, ki so jo izvedli na podganah nakazuje možen potencial BHA, da pri odmerkih 300 mg/kg TT apliciranih peroralno, poseduje estrogeni učinek, saj so zaznali povišanje debeline epitelija na endometriju. Nasprotno pa so v tej študiji kot posledico prejemanja BHA zaznali znižanje relativne teže maternice (55).

V *in vitro* študiji BHA ni izkazoval estrogenega delovanja, je pa deloval anti-estrogeno (antagonistično delovanje $IC_{50} = 170,91 \mu M$) (56).

Evropska Unija BHA uvršča v kategorijo 1 endokrinih motilcev. To je kategorija endokrinih motilcev za katere obstajajo dokazi o vplivu na endokrini sistem (64).

4.2.6 Propil-galat (PG)

Propil-galat je ester n-propanola in galne kisline. Njegove prisotnosti v naravi do sedaj še niso zaznali, komercialno pa se ga proizvaja z esterifikacijo propanola in galne kisline, čemu sledi destilacija, s katero se odstrani presežek propanola (22, 65).



Slika 9: Strukturna formula propil-galata (65).

- **Uporaba**

Že od petdesetih let dvajsetega stoletja dalje se propil-galat uporablja kot antioksidant v živilih, ki vsebujejo olja in maščobe. Kot aditiv v hrani ima dodeljen status GRAS. V Evropi se vodi pod številom E310. EFSA je za propil-galat določila ADI 0,5 mg/kg TT/dan. Prav tako se kot antioksidant uporablja v kozmetičnih izdelkih, lepilih in mazivih ter v fluorescenčni mikroskopiji. V kozmetičnih izdelkih ima lahko tudi vlogo dišave, poglavitna vloga pa je stabilizacija oz. preprečevanje oksidacije vitaminov, eteričnih olj, parfumov, maščob in drugih olj. Oksidacijo preprečuje tako, da reagira z radikali – deluje kot primarni antioksidant. Zaradi sinergističnega delovanja se uporablja tudi v kombinaciji z drugimi fenolnimi antioksidanti kot je BHA (65, 22, 66).

Glede na podatke, ki jih je kozmetična industrija posredovala FDA se je v letu 1981 propil-galat v večini kozmetičnih izdelkov uporabljal v koncentracijah do 0,1%, pri čemer je bila maksimalna koncentracija 5% uporabljena v dišavah. Podobno podatki iz leta 2002 navajajo najvišjo uporabljeno koncentracijo 0,1% (65).

- **Fizikalno – kemijske lastnosti**

Preglednica 20: Fizikalno – kemijske lastnosti propil-galata (65).

Lastnost	Vrednost
CAS št.	121-79-9
Molekulska masa	212,20 g/mol
Temperatura tališča	150 °C
Temperatura vrelišča	Predhodno razpade

- **Toksikokinetika**

Pri podganah se propil-galat apliciran peroralno v glavnini izloči z urinom v obliki 4-metoksi galne kisline, v manjših količinah pa so v urinu prisotni še drugi metaboliti – 2-metoksi pirogalol, galna kislina in glukuronidi metoksiliranih produktov (22).

S študijo izvedeno na kuncih, pri katerih so propil-galat aplicirali peroralno, so ugotovili, da se 79% odmerka izloči z urinom, pri čemer je 72% v urin izločenega propil-galata v obliki glukuronida 4-metoksikalne kisline in 6,7% v obliki nekonjugiranih fenolnih komponent. Preostali v urinu prisotni metaboliti pa so konjugiran in nekonjugiran pirogalol ter nekonjugirana 4-metoksikalna kislina (22).

- **Akutna toksičnost**

Akutne peroralne toksičnosti propil-galata so določili s študijami izvedenimi na različnih živalskih modelih, tako so določili akutno peroralno toksičnost (LD50) na miših 1,70 – 3,50 g PG/kg TT, podganah 2,1 – 7 g PG/kg TT, hrčkah 2,48 g PG/kg TT in kuncih 2,75 g PG/kg TT. Pri prašičih niso zaznali nobenih očitnih akutnih toksičnih učinkov pri odmerkih do 6 g PG/kg TT (22, 66).

Prav tako so s študijami akutne peroralne toksičnosti, ki so jih izvedli na podganah, ocenili tri formulacije šminke, katere so aplicirali s pomočjo intubacije. Pri dveh formulacijah z vsebnostjo 0,005% propil-galata, so aplicirali odmerke do 5 g šminke/kg TT. V primeru tretje formulacije z vsebnostjo <1% propil-galata pa so aplicirali odmerke do 10 ml/kg TT. Vsi odmerki so po aplikaciji formulacije z vsebnostjo <1% propil-galata pri živalih povzročili diarejo. V nobenem primeru ni prišlo do pogina živali, prav tako pri obdukciji pri nobeni živali niso našli poškodb oz. ran (22).

- **Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih**

Izvedli so študije na živalskih modelih, ki so zajemale podgane, miši, pse in prašiče. V študiji izvedeni na podganah so le-te 13 tednov hranili s hrano, ki je vsebovala 0, 490, 1.910 oz. 7.455 mg PG/kg hrane, kar je ekvivalentno 0, 35, 135, 527 mg PG/kg TT/dan. Pri samčkah, ki so prejeli najvišje odmerke so bili neželeni učinki izraženi kot znižanje določenih hematoloških parametrov (Hb – hemoglobina, HCT – hematokrita in RBC – št. eritrocitov) in znižanje ekstramedularne hematopoeze v vranici. Tako so določili NOAEL vrednost 135 mg PG/kg TT/dan. Ta študija je služila tudi kot osnova za določitev ADI (66).

Pri študiji izvedeni na 53 samčkah morskih prašičkov so 5x na teden 6 tednov dermalno aplicirali 20% raztopino propil-galata v lanolinu, in zaznali reverzibilno hiperplazijo epidermisa (22).

V drugi študiji izvedeni na črnih morskih prašičkih so ugotavljali vpliv propil-galata na depigmentacijo. Tako so dnevno za dobo 1 do 6 mesecev dermalno aplicirali propil-galat v območju koncentracij od 0,1% do 10%. Ugotovili so, da je propil-galat povzročil nekaj iritacije, medtem ko do depigmentacije ni prišlo (22).

- **Genotoksičnost/mutagenost**

Izvedli so večje število študij genotoksičnosti propil-galata. Pri testu mutagenosti na bakterijah *Salmonella typhimurium*, na sevu TA102, ki je občutljiv na oksidativne poškodbe DNK, se je propil-galat izkazal kot šibak mutagen, tako z kot tudi brez metabolne aktivacije. Testi na drugih sevih so bili negativni. Propil-galat je v *in vitro* testih z in brez metabolne aktivacije na celicah glodavcev deloval klastogeno, saj je prišlo do nastanka mikrojedrov in kromosomskih aberacij ter do izmenjave sestrskih kromatid. Dvomljiv pozitiven rezultat so dobili pri testu genskih mutacij na celicah mišjega limfoma, izvedenega brez metabolne aktivacije. Nasprotno pa so bili rezultati pridobljeni s citogenetskimi testi na človeških celicah negativni (66).

Pri *in vivo* študijah izvedenih na podganah katerim so propil-galat aplicirali peroralno, se je le-ta izkazal za negenotoksičnega. Propil-galat ni izkazoval genotoksičnosti tudi pri *in vivo* študiji na miših, katerim so le-tega aplicirali z intraperitonealnim injiciranjem, vse do smrtnih odmerkov (66).

Na podlagi teh podatkov je EFSA zaključila, da propil-galat *in vivo* ni genotoksičen (66).

- **Reproduktivna in razvojna toksičnost**

V dvo-generacijski študiji reproduktivne toksičnosti izvedene na podganah so le-te hranili z 18,2, 104 oz. 260 mg PG/kg TT/dan. Zaznali niso nobenih učinkov na reprodukcijo podgan. Prav tako ni bilo opaziti nobenih sprememb na organih in tkivih. Še nekaj študij so izvedli na podganah, miših, morskih prašičkih in prašičih s podobnimi izsledki (66).

Pri študiji prenatalne razvojne toksičnosti izvedeni na miših so le-tem v času od 6. do 15. dne brejosti peroralno aplicirali od 3 do 300 mg PG/kg TT/dan. Propil-galat pri nobenem odmerku ni izkazoval vplivov na plod ali na mater. Podobne oz. enake rezultate so pridobili pri študijah razvojne toksičnosti izvedenih na podganah, kuncih in morskih prašičkih. Kot NOAEL vrednost so določili 300 mg PG/kg TT/dan, saj je bil to najvišji apliciran odmerek, pri katerem ni prišlo do nobenega neželenega učinka (66).

- **Kancerogenost**

V študiji na miših, kjer so testirali sposobnost propil-galata, da inducira nastanek pljučnih tumorjev, so le-tega 8 tednov 3x na teden aplicirali z intraperitonealnim injiciranjem v odmerkih 0,6 oz. 2,4 g PG/kg TT. Rezultati so pokazali, da propil-galat ne inducira nastanka tumorjev (22).

Na podlagi številnih drugih študij izvedenih na miših, podganah in morskih prašičkih, kjer so propil-galat aplicirali peroralno, so zaključili, da le-ta ni kancerogen (22, 66).

- **Okularna iritacija**

Študijo akutne okularne iritacije so izvedli na šestih kuncih, pri kateri so ugotavljali iritacijski učinek formulacije šminke z vsebnostjo propil-galata <1%. Pri testu so v levo oko kuncev aplicirali 0,1 ml testne formulacije in le pri enem kuncu zaznali zelo blag eritem. Zaključili so, da formulacija šminke ni okularni iritant. V številnih enakih oz. podobnih študijah, pri katerih so testirali različne kozmetične izdelke, ki vsebujejo propil-galat, se je prav tako izkazalo, da propil-galat ni okularni iritant (22).

- **Iritacija in senzitivizacija kože**

Izvedli so večje število študij na človeških prostovoljcih. V večini primerov ni prišlo do senzitivizacije oz. iritacije kože. Nekaj pozitivnih reakcij na propil-galat je bilo zaznanih predvsem v primeru koncentracij višjih od 0,5% oz. 1% (22).

V dveh študijah senzitivizacije kože, ki so ju izvedli na morskih prašičkih, so v prvi fazi le-te senzitivizirali. Nato so po določenem času pod okluzijskimi pogoji na kožo aplicirali različne koncentracije propil-galata. Pri koncentracijah od 0,5% do 5% je prišlo do senzitivizacije kože, medtem ko koncentracija 0,1% propil-galata, ni povzročila senzitivizacije kože (22).

Propil-galat je blag oz. zmeren senzitivizator pri topikalni aplikaciji, odvisno od koncentracije. Je pa močan senzitivizator v primeru intradermalne aplikacije (22).

- **Fototoksičnost in fotosenzitivizacija**

V študiji so na roke 25 belopoltih oseb aplicirali 10% raztopino propil-galata v alkoholu in nato mesto aplikacije posušili ter osvetlili s svetlobo v območju valovnih dolžin od 280 do 370 nm. Pri nobeni osebi ni prišlo do fotosenzitivizacije, kontaktne senzitivizacije ali primarne iritacije (22).

Kozmetične formulacije, ki so vsebovale 0,003% propil-galata, so bile uporabljene pri študijah, ki so skupno vključevale 371 oseb. Propil-galat v teh študijah ni izkazoval fototoksičnosti ali fotosenzitivizacije (22).

- **Endokrino delovanje**

Pri *in vitro* študiji se je propil-galat izkazal kot modulator aktivnosti estrogenskega receptorja, in sicer je izzval tako estrogene (agonistično delovanje $EC_{25} = 2,57 \mu M$) kot tudi anti-estrogene (antagonistično delovanje $IC_{50} = 45,03 \mu M$) učinek. V *in vivo* študiji, ki so jo izvedli na podganah, pa je propil-galat izkazoval le anti-estrogeno delovanje pri odmerkih 405 mg/kg TT apliciranih peroralno. Kot posledico aplikacije propil-galata so zaznali zmanjšanje teže maternice, kar je verjetno posledica, z morfolometrično analizo ugotovljenega zmanjšanja debeline strome endometrija in signifikantnega zmanjšanja debeline miometrija (srednje, najdebelejše plasti maternice). Zaznali so tudi zmanjšanje debeline epitelija na endometriju. Nasprotno so pri živalih katerim so aplicirali estradiol (agonist estrogenskih receptorjev) zaznali občutno večjo debelino strome endometrija in debelino miometrija (55, 56).

4.3 OCENA VARNOSTI FENOLNIH ANTIOKSIDANTOV

V pregledanih kozmetičnih izdelkih smo zasledili 6 različnih fenolnih antioksidantov, ki smo jih s pomočjo pridobljenih podatkov in toksikoloških profilov, ovrednotili s stališča varne uporabe. V preglednici 21 so povzete vrednosti LD50 (akutna toksičnost), NOAEL (toksičnost pri ponovljivih odmerkih) in ADI. Vrednosti ADI za tokoferol in tokoferil acetat so izračunane s pomočjo tokoferol ekvivalentov navedenih v preglednici 7 – poglavje o tokoferolu.

Preglednica 21: Vrednosti LD50, NOAEL in ADI.

Antioksidant / parameter	LD50* (g/kg TT) (peroralno)	LD50* (g/kg TT) (dermalno)	NOAEL (mg/kg TT/dan)	ADI (mg/kg TT/dan)
Tokoferol	> 23,75 (miš)	> 3 (podgana)	400 (podgana – 60 dni)**	0,15 - 2 (<i>d-α</i> -) 0,20 - 2,7 (<i>dl-α</i> -)
Tokoferil acetat	> 16 (podgana)	> 3 (podgana)	≥ 360 (pes – 28 dni)***	0,17 - 2,2 (<i>d-α</i> -) 0,22 - 3,0 (<i>dl-α</i> -)
BHT	10,7 (morski prašiček)	> 2 (podgana)	25 (podgana)	0,25
PTHHC	> 10,25 (podgana)	> 3,16 (kunec)	135 (podgana)	Ni podatka
BHA	5 (podgana)	> 2 (kunec)	100 (podgana)	1,0
Propil-galat	7 (podgana)	Ni podatka	135 (podgana)	0,5

* Ker so bile na različnih živalih določene različne akutne toksičnosti (vrednosti LD50), smo v preglednici navedli najvišje določene vrednosti le-teh.

** NOAEL vrednost smo izbrali na podlagi edine študije, ki smo jo zasledili, v kateri so (predvidoma) uporabili tokoferol in ne tokoferil acetat. Čeprav za izračun meje varne uporabe (MoS), le pri ekstrapolaciji iz 28 dnevne študije na (zahtevano) 90 dnevno, smernice SCCS navajajo uporabo korekcijskega faktorja 3 za NOAEL (10), smo enak korekcijski faktor uporabili tudi za naš primer - 60 dnevno študijo (krajšo od 90 dnevne).

*** NOAEL vrednost, določeno s študijo na psih, smo izbrali zato, ker so le-ti z vidika razlike med vrstami bližje človeku kot pa podgane. Ker študija ni trajala 90 dni, temveč le 28 dni smo v skladu s smernicami SCCS (10) za izračun MoS, pri NOAEL vrednosti upoštevali korekcijski faktor 3.

V primeru tokoferola in tokoferil acetata je SCF določil dopustno zgornjo mejo vnosa vitamina E (kot *d-α*-tokoferol) za odrasle osebe, ki znaša do 300 mg *α*-tokoferol

ekvivalentov/dan. V preglednici 22 so na podlagi tokoferol ekvivalentov izračunane vrednosti UL za različne oblike α -tokoferola oz. α -tokoferil acetata.

Preglednica 22: Dopustne zgornje meje vnosa (UL).

Oblika tokoferola	Tokoferol ekvivalenti	UL (mg α -tokoferol ekvivalentov/dan)
RRR- α -tokoferol oz. <i>d</i> - α -tokoferol	1,00	300
<i>all-rac</i> - α -tokoferol oz. <i>dl</i> - α -tokoferol	0,74	405
<i>d</i> - α - oz. RRR- α -tokoferil acetat	0,91	330
<i>dl</i> - α - oz. <i>all-rac</i> - α -tokoferil acetat	0,67	448

Za izračun MoS potrebujemo v preglednici 23 navedene vrednosti dermalne absorpcije (DA) in vsebnosti (C) fenolnih antioksidantov v formulacijah uporabljenih pri testih dermalne absorpcije.

Vrednosti DA navajajo količino absorbirane substance v določeni površini kože ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) oz. delež (%) substance (glede na vsebnost v aplicirani formulaciji), ki se je po aplikaciji absorbiral v kožo. Količina (delež) substance, ki se absorbira le v roženo plast kože (stratum corneum) in ne penetrira v globlje plasti, se pri vrednosti DA ne upošteva.

Tako je v vrednost DA vključena vsa količina substance, ki preide iz rožene plasti v žive plasti kože in se kot taka šteje za sistemske razpoložljivo (10).

Smernice SCCS navajajo, da se v primeru, ko so za določeno substanco podatki o dermalni absorpciji neuporabni oz. niso na voljo, uporabi vrednost DA 100 % oz. v primeru, ko ima substanca molekulska masa večja od 500 Da in $\log P_{ow}$ manjši od -1 oz. večji od 4, uporabi za DA vrednost 10% (10). Ker podatkov o dermalni absorpciji za PTHHC in za propil-galat nismo našli, smo v skladu s smernicami SCCS za PTHHC določili DA 10% in za propil-galat DA 100%. Prav tako smo za vsebnosti (C) v formulacijah, pri obeh fenolnih antioksidantih, vzeli podatke o najvišjih koncentracijah uporabljenih v kozmetičnih izdelkih.

Preglednica 23: Dermalna absorpcija (DA) fenolnih antioksidantov.

	<i>d</i> - α -Tokoferol	<i>d</i> - α -Tokoferil acetat	BHT	PTHHC	Propil-galat	BHA
DA	8,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10,06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,67 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10%	100%	1,94 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
C	1%	5%	1 mg/ml	0,8%	0,1%	0,07%

V preglednicah 24 – 27 so navedene izračunane vrednosti MoS fenolnih antioksidantov vsebovanih v različnih vrstah pregledanih kozmetičnih izdelkov. Z uporabo enačbe 1 ali 2 smo izračunali raven sistemske izpostavljenosti (SED). V kolikor je podatek za dermalno absorpcijo (DA) naveden v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ uporabimo enačbo 1, če pa je vrednost DA v %, pa za izračun SED uporabimo enačbo 2. Nato z enačbo 3 za vsak posamezen fenolni antioksidant izračunamo MoS. V skladu s priporočili WHO mora biti vrednost MoS vsaj 100, da lahko substanco obravnavamo kot varno za uporabo (10).

$$\text{SED} = \frac{\text{DA}_a \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{g} \times \text{SSA} \times \text{F}}{60\text{kg}} \quad (\text{Enačba 1})$$

$$\text{SED} = \text{A} \times \frac{\text{C}}{100} \times \frac{\text{DA}_p}{100} \quad (\text{Enačba 2})$$

SED.....raven sistemske izpostavljenosti (ang. Systemic Exposure Dose) izražena v [mg/kg TT/dan]

DA_a.....dermalna absorpcija (ang. Dermal Absorption) izražena v [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

SSA.....površina kože izpostavljene kozmetičnemu izdelku (ang. Skin Surface Area) izražena v [cm^2]

F.....pogostost aplikacije kozmetičnega izdelka (ang. Frequency of application) izražena v [dan^{-1}]

A.....predvidena dnevna izpostavljenost kozmetičnemu izdelku izražena v [mg/kg TT/dan]

C.....koncentracija obravnavane substance v kozmetičnem izdelku izražena v [%]

DA_p.....dermalna absorpcija izražena v [%]

$$\text{MoS} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{SED}} \quad (\text{Enačba 3})$$

MoS.....meja varne uporabe (ang. Margin of Safety)

NOAEL.....raven brez opaznega škodljivega učinka (ang. No Observed Adverse Effect Level) izražena v [mg/kg TT/dan]

Pri izračunih vrednosti MoS smo predpostavili, da za NOAEL vrednosti, ki so določene na podlagi študij s peroralno aplikacijo, velja 100% biološka uporabnost obravnavane substance (fenolnega antioksidanta).

Prav tako smo za fenolne antioksidante za katere je določen ADI, izračunali %ADI (delež »pokoriščenega« ADI), ki je posledica izpostavljenosti organizma fenolnemu antioksidantu zaradi uporabe kozmetičnih izdelkov. Pri tokoferolu in tokoferil acetatu smo vzeli vrednost ADI in UL za *d*- α -tokoferol oz. *d*- α -tokoferil acetat, ker imata najvišjo biološko uporabnost.

Preglednica 24: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) fenolnih antioksidantov v obraznih kremah.

	SED (mg/kg TT/dan)	MoS	%ADI (%)
<i>d</i> - α -Tokoferol	0,168	794	8,4
** <i>d</i> - α -Tokoferil acetat	0,2027	592	9,2
BHT	0,0135	1852	5,4
*BHT (100%)	0,02414	1036	9,7
PTHHC	0,01931	6990	/

SSA = 565 cm², A = 24,14 mg/kg TT/dan, F = 2,14 dan⁻¹ (10).

* Zaradi *in vitro* študije dermalne absorpcije, ki v celoti ne odraža realne uporabe smo izračunali še za primer, če se iz kozmetičnega izdelka z vsebnostjo BHT 0,1% absorbira 100% aplicirane količine BHT. Velja tudi v nadaljevanju za preglednici 26 in 27.

** V izračunu vrednosti MoS je uporabljena vrednost NOAEL pridobljena v študiji pri kateri so peroralno aplicirali *dl*- α -tokoferil acetat (glej preglednico 21 in poglavje o tokoferil acetatu – Toksičnost pri ponavljajočih odmerkih). Velja tudi v nadaljevanju za preglednice 25, 26 in 27.

Preglednica 25: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) ter delež »pokoriščenega« UL (%UL) fenolnih antioksidantov v losjonih in mlekih za telo.

	SED (mg/kg TT/dan)	MoS	*MoS	%ADI (%)	%UL (%)
<i>d</i> - α -Tokoferol	4,9721	26,8	80,4	250	99,4
<i>d</i> - α -Tokoferil acetat	5,9903	20	60,1	270	109

SSA = 15670 cm², F = 2,28 dan⁻¹ (10).

* MoS vrednost izračunana brez upoštevanja korekcijskega faktorja za NOAEL vrednost (glej preglednico 21).

Preglednica 26: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) fenolnih antioksidantov v šminkah.

	SED (mg/kg TT/dan)	MoS	%ADI (%)
<i>d</i> - α -Tokoferol	$1,34 \times 10^{-3}$	100×10^3	0,067
<i>d</i> - α -Tokoferil acetat	$1,610 \times 10^{-3}$	75×10^3	0,073
BHT	$1,1 \times 10^{-4}$	230×10^3	0,044
BHT (100%)	$9,00 \times 10^{-4}$	28×10^3	0,36
PTHHC	$7,2 \times 10^{-4}$	188×10^3	/
BHA	$3,10 \times 10^{-4}$	323×10^3	0,031
Propil-galat	$9,00 \times 10^{-4}$	150×10^3	0,2

SSA = $4,8 \text{ cm}^2$, A = $0,90 \text{ mg/kg TT/dan}$, F = 2 dan^{-1} (10).

Preglednica 27: Izračunane vrednosti meje varne uporabe (MoS) in delež »pokoriščenega« ADI (%ADI) fenolnih antioksidantov v maskarah.

	SED (mg/kg TT/dan)	MoS	%ADI (%)
<i>d</i> - α -Tokoferol	$4,45 \times 10^{-4}$	300×10^3	0,022
<i>d</i> - α -Tokoferil acetat	$5,365 \times 10^{-4}$	224×10^3	0,024
BHT	$3,6 \times 10^{-5}$	690×10^3	0,014
BHT (100%)	$4,20 \times 10^{-4}$	60×10^3	0,17

SSA = $1,6 \text{ cm}^2$, A = $0,42 \text{ mg/kg TT/dan}$, F = 2 dan^{-1} (10).

Oceno varnosti sestavine kozmetičnega izdelka do določene mere opredeli vrednost MoS. Pri vseh obravnavanih vrstah kozmetičnih izdelkov z izjemo losjonov in mlek za telo, je izračunana vrednost MoS za vse uporabljene fenolne antioksidante precej višja od mejne vrednosti 100. To nakazuje na varno uporabo fenolnih antioksidantov v kremah za obraz, šminkah in maskarah. Prav tako pri navedenih kozmetičnih izdelkih ostane večji del ADI razpoložljiv za vnos v organizem iz drugih virov (hrane, pijače). V primeru šmink je potrebno vzeti v obzir tudi možnost peroralnega oz. oralnega vnosa sestavin v organizem in posledično vpliv na endokrini sistem, saj le-te vsebujejo fenolna antioksidanta BHA in propil-galat, ki delujeta kot endokrini motilca.

Nekoliko nižji vrednosti MoS (pod 100) sta izračunani za *d*- α -tokoferol in *d*- α -tokoferil acetat v losjonih in mlekah za telo. Prav tako sta ob predvideni uporabi losjonov oz. mlek za telo vrednosti ADI prekoračeni za približno faktor 2,5, tako za *d*- α -tokoferol kot za *d*- α -

tokoferil acetat. Nasprotno pa predvidena uporaba losjonov oz. mlek za telo ne preseže (za *d*- α -tokoferol) oz. le malenkostno preseže (v primeru *d*- α -tokoferil acetata) vrednosti UL določene s strani SCF (Preglednica 25). K nižji MoS vrednosti signifikantno doprinese velika površina kože izpostavljena izdelku (skoraj celotno telo) in predvidena pogostost uporabe (več kot 2x na dan). Vendar že če bi se pogostost uporabe (nekoliko) zmanjšala, bi vrednost MoS narastla nad 100. Pri izračunu smo uporabili podatke pridobljene z *in vitro* testi dermalne absorpcije, pri katerih so uporabili formulacije z vsebnostjo *d*- α -tokoferola 1% oz. *d*- α -tokoferil acetata 5%, kar odraža njuno vsebnost v komercialno dostopnih losjonih in mlekah za telo, ki se giblje v območju od 0,02% do 2% za tokoferol in od 0,001% do 5% za tokoferil acetat.

Pri obsegu dermalne absorpcije in posledično sistemske izpostavljenosti organizma je potrebno upoštevati tudi formulacijo v katero je fenolni antioksidant oz. sestavina vgrajena, saj lahko vsebuje snovi in/ali vehikle (liposomi), ki izboljšajo oz. pospešujejo penetracijo substance v kožo.

Z vidika akutne toksičnosti, toksičnosti pri ponovljivih odmerkih in ADI lahko kot najmanj toksična opredelimo tokoferol in tokoferil acetat. Sledijo jima PTHHC, propil-galat, BHA in BHT, ki ima najnižjo NOAEL vrednost in najmanjši določen ADI. Za PTHHC vrednosti ADI nismo našli oz. le-ta ni določena, verjetno zato, ker se PTHHC ne uporablja kot dodatek v hrani in pijači.

Preglednica 28: Primerjava fenolnih antioksidantov glede na genotoksičnost, kancerogenost, okularno iritacijo ter iritacijo in senzitivacijo kože.

Antioksidant / parameter	Genotoksičnost / mutagenost	Kancerogenost	Okularna iritacija	Iritacija in senzitivacija kože
Tokoferol	Ni genotoksičen in ni mutagen.	Peroralno ni kancerogen. Subkutana aplikacija tokoferola v sojinem olju je povzročila nastanek neoplazm.	Blag iritacijski učinek oz. iritacijskega učinka ni bilo.	Ni iritant in ne senzitivator za človeka. Zmeren senzitivator pri testih na živalih.

Antioksidant / parameter	Genotoksičnost / mutagenost	Kancerogenost	Okularna iritacija	Iritacija in senzitizacija kože
Tokoferil acetat	Ni genotoksičen in ni mutagen.	Peroralno ni kancerogen. Subkutana aplikacija čistega tokoferil acetata ali tokoferil acetata v sojinem oz. v palmovem olju je povzročila nastanek neoplazm. Pri dermalni aplikaciji na miših je promoviral fotokancerogenezo.	Blag do zmeren okularni iritant oz. opredeljen kot nedražoč.	Ni iritant in ne senzitizator tako za človeka kot za testne živali.
BHT	Ni genotoksičen in ni mutagen.	Ni mogoče klasificirat – izkazuje kancerogene kot anti-kancerogene učinke.	Blag okularni iritant.	Potencialen blag iritant in senzitizator.
PTHHC	Ni genotoksičen in ni mutagen.	Ni kancerogen.	Ni okularni iritant.	Ni iritant in ne senzitizator.
BHA	Pri večini študij so bili rezultati negativni. <i>in vitro</i> test z metabolno aktivacijo in <i>in vivo</i> študija sta pokazala klastogeno delovanje. Tudi druge študije so pokazale genotoksično delovanje metabolitov BHA.	Pri večini študij so bili rezultati negativni. Pozitivni rezultati so bili le pri študijah na živalih, ki imajo predželodec. IARC ga uvršča v skupino 2B – možne kancerogene snovi za ljudi.	Potencialen blag iritant.	Možen minimalni oz. blag iritacijski in senzitizacijski učinek na kožo.
Propil-galat	Pri <i>in vitro</i> študijah deloval klastogeno in kot šibak mutagen.	Ni kancerogen.	Ni okularni iritant.	Ni iritant. Senzitizator pri koncentracijah višjih od 0,5%

Ob upoštevanju ostalih toksikoloških parametrov lahko kot najmanj toksičnega klasificiramo PTHHC, saj so bili vsi toksikološki testi negativni (Preglednica 28). Prav tako je potencialna sistemska izpostavljenost PTHHC minimalna, saj se zaradi velikosti same molekule in visokega $\log P_{ow}$ lahko le zelo majhen del le-tega absorbira v oz. preko kože (57). Za potrditev te predpostavke bi bilo potrebno izvesti študijo dermalne absorpcije.

Temu sledi tokoferol, ki je v nekaterih primerih izkazoval blag okularni iritacijski učinek in v kombinaciji s sojinim oljem pri subkutani aplikaciji povzročil nastanek neoplazm. Po toksičnosti mu sledi tokoferil acetat, ki se je v študij izvedeni na miših pri dermalni aplikaciji izkazal kot promotor fotokancerogeneze ter pri subkutani aplikaciji v čisti obliki ali v kombinaciji s sojinim oz. palmovim oljem povzročil nastanek neoplazm. Nadalje jima sledi BHT, ki ga glede kancerogenosti ni mogoče klasificirati, saj izkazuje tako kancerogene kot anti-kancerogene učinke (Preglednica 28).

Z vidika genotoksičnosti in endokrinega delovanja sta problematična BHA in propil-galat, medtem ko je BHA uvrščen tudi v skupino substanc kot možna kancerogena snov za človeka. Tako *in vitro* kot *in vivo* študije so pokazale estrogeno oz. anti-estrogno delovanje BHA in propil-galata. Poleg omenjenega EU uvršča BHA v kategorijo 1 endokrinih motilcev. *In vivo* študija je nakazovala (potencialno) endokrino delovanje tudi za BHT, vendar se je v *in vitro* študiji izkazalo, da le-ta nima estrogenega ali anti-estrogenega delovanja. Omenjena fenolna antioksidanta (BHA in propil-galat) so vsebovale le šminke, kar pa predstavlja potencialno peroralno izpostavljenost in posledično vpliv na endokrini sistem uporabnic/kov.

5 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo preučevali vsebnost/prisotnost fenolnih antioksidantov in njihovo varnost pri uporabi v kozmetičnih izdelkih. Pregledali smo 80 kozmetičnih izdelkov prisotnih na slovenskem oz. evropskem trgu, dostopnih v drogerijah oz. v spletnih trgovinah. Izbrali smo dve kategoriji izdelkov s področja negovalne kozmetike (kreme za obraz, losjoni in mleka za telo) in dve kategoriji izdelkov s področja dekorativne kozmetike (šminke, maskare). Prisotne fenolne antioksidante smo toksikološko ovrednotili in pripravili oceno varne uporabe le-teh. Ugotovitve lahko povzamemo v naslednjih točkah:

- Za posamezno vrsto kozmetičnih izdelkov smo pregledali po 20 proizvodov različnih proizvajalcev. Ugotovili smo, da se v vseh izdelkih najpogosteje pojavlja tokoferol. Skupno ga je vsebovalo kar 61,3% vseh pregledanih izdelkov. Sledita mu tokoferil acetat (derivat tokoferola), ki je prisoten v 45% vseh pregledanih izdelkov in BHT katerega smo našli v 26,3% vseh izdelkov. PTHHC je vsebovalo 6 izdelkov, in sicer dve kremi za obraz in štiri šminke. BHA smo našli v treh izdelkih, propil-galat pa le v dveh izdelkih, in sicer sta se oba fenolna antioksidanta nahajala le v šminkah. Pri kozmetičnih izdelkih pri katerih je z INCI imenom navedeno, da vsebujejo tokoferol oz. tokoferil acetat, je nemogoče razbrati ali je le-ta naravnega oz. sinteznega izvora in kakšna je njuna sestava. Le v enem primeru (Losjon) je bilo poleg besede tokoferol navedeno, da je le-ta naravnega izvora. Za določitev sestave in/ali vrste tokoferola oz. tokoferil acetata bi bilo potrebno izvesti ustrezne analize.
- V največji meri (61,3%) so kozmetični izdelki vsebovali po en fenolni antioksidant. Izdelkov z dvema fenolnima antioksidantoma je bilo v našem primeru 25, kar predstavlja 31,2%. Tako je dva fenolna antioksidanta vsebovalo približno polovica krem za obraz, en losjon in dva mleka za telo, ter osem šminke in pet maskar. Manjši del, in sicer 7,5% izdelkov pa je vsebovalo tri fenolne antioksidante. Med njimi je bilo pet šminke in ena maskara. Propil-galat smo zasledili v dveh izdelkih pri čemer je v obeh primerih nastopal skupaj z BHA – sinergistično delovanje. Podobno se je BHT v največji meri pojavljal skupaj s tokoferil acetatom oz. tokoferolom s katerim izkazuje sinergistično delovanje.
- Opazili smo nekakšno korelacijo med zastopanostjo fenolnih antioksidantov v kozmetičnih izdelkih in njihovo ocenjeno toksičnostjo. Kot smo ugotovili je v največji meri zastopan tokoferol, ki je (skoraj) netoksičen oz. ima zelo nizko toksičnost z izjemo primera subkutane aplikacije kjer je v kombinaciji s sojinim oljem povzročil nastanek neoplazm. Sledi mu tokoferil acetat, ki je v študiji izvedeni na miših pri dermalni aplikaciji deloval kot promotor fotokancerogeneze ter pri subkutani aplikaciji v čisti obliki ali v kombinaciji s sojinim oz. palmovim oljem povzročil nastanek neoplazm. Nadalje jima sledi BHT, ki poleg možnega kancerogenega in/ali anti-kancerogenega delovanja, lahko deluje tudi kot blag iritant in senzitizer. Po pogostosti uporabe sledi PTHHC, ki je v uporabljenih koncentracijah praktično netoksičen, tudi sistemska izpostavljenost po aplikaciji na

kožo je zelo malo verjetna. V najmanjši meri pa sta zastopana BHA in propil-galat, ki edina poleg drugih toksičnih učinkov izkazujeta tudi klastogeno (genotoksično) delovanje in estrogeni oz. anti-estrogeni učinek.

Posebnih regulatornih omejitev oz. prepovedi uporabe obravnavanih fenolnih antioksidantov v kozmetičnih izdelkih v EU nismo zasledili. Morajo pa biti varni za uporabo v kozmetičnih izdelkih, tako kot vse ostale sestavine.

Vprašljiva je bila tudi smiselnost množičnega (nehumanega) testiranja kozmetičnih sestavin in/ali končnih kozmetičnih izdelkov na živalih, saj se je v določenih primerih izkazalo, da je substanca/sestavina pri študiji na živalih izkazovala neželen učinek, ki pa ga pri študiji na ljudeh niso zaznali. Prav tako so pri živalskih modelih ugotovili pojav oz. nastanek metabolitov, ki pri ljudeh ne nastajajo, saj se metabolizem med živalskimi vrstami in človekom razlikuje, tako po poteku kot po obsegu. Seveda pa obstajajo tudi podobnosti, ki jih skupaj z razlikami upoštevamo pri ekstrapolaciji na človeka. Kateri metaboliti in v kakšnem obsegu pri človeku dejansko nastajajo je ključnega pomena za ugotavljanje njihove toksičnosti, saj (lahko) različni metaboliti izkazujejo različen (toksikološki) vpliv na človeški organizem. Tako je področje študij, ki ugotavljajo kako človeški organizem vpliva na substance (tokosikokinetika) in kako substance oz. njihovi metaboliti vplivajo na človeški organizem (toksikodinamika) odprto za izboljšave.

Evropska unija je že uvedla popolno prepoved testiranja posameznih kozmetičnih sestavin in končnih kozmetičnih izdelkov na živalih, kar sili proizvajalce v iskanje in razvoj alternativnih (*in vitro*, *ex vivo*, *in silico*) toksikoloških testov. Prav tako v Evropski uniji velja prepoved trženja kozmetičnih izdelkov in/ali kozmetičnih sestavin, ki so bile preizkušene na živalih. Tudi druge države po svetu sledijo Evropi in uvajajo prepovedi na omenjenih področjih.

6 LITERATURA

1. UREDBA (ES) št. 1223/2009 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (prenovitev) (Besedilo velja za EGP)
2. <http://chemistscorner.com/the-10-different-types-of-cosmetic-formulas-you-must-know/> (dostop: 9.10.2014)
3. http://pharmaquest.weebly.com/uploads/9/9/4/2/9942916/formulation__evaluation_of_cosmetic_pds.pdf (dostop: 9.10.2014)
4. André O. Barel, Marc Paye, Howard I. Maibach: Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition 2009
5. T. Mitsui: New cosmetic science, Elsevier Science B.V., First edition 1997 (<http://www.slideshare.net/ivancastaneda925/new-cosmetic-science-t-mitsui-editor>)
6. http://cosmetictestlabs.com/five_most_common_types_of_preservatives_used_in_cosmetics.html (dostop: 25.11.2014)
7. <https://www.cosmeticseurope.eu/safety-and-science-cosmetics-europe/safety-in-cosmetics.html> (dostop: 13.10.2014)
8. http://ec.europa.eu/consumers/consumers_safety/cosmetics/legislation/index_en.htm (dostop: 13.10.2014)
9. http://ec.europa.eu/consumers/consumers_safety/cosmetics/ban_on_animal_testing/index_en.htm (dostop: 16.10.2014)
10. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 8th Revision, 11 December 2012
11. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant> (dostop: 14.10.2014)
12. <http://www.pharmainfo.net/reviews/analysis-preservatives-pharmaceutical-products> (dostop: 14.10.2014)

13. A. A. Hamid, O. O. Aiyelaagbe, L. A. Usman, O. M. Ameen, A. Lawal: Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. African Journal of Pure and Applied Chemistry Vol. 4(8), pp. 142-151. August 2010.
14. http://www.eastman.com/Literature_Center/C/CB9.pdf (dostop: 14.10.2014)
15. Dr. Asim Kumar Mukhopadhyay: Antioxidants - Natural and Synthetic. Amani Internacional Publishers. Kiel 2006.
16. Erik Klein, Vladimir Lukeš, Zuzana Cibulkova: On the energetics of phenol antioxidants activity. Petroleum & Coal 47 (1), 33 – 39, 2005.
17. <http://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#showall> (dostop: 14.10.2014)
18. [http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermis_\(skin\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermis_(skin)) (dostop: 14.10.2014)
19. http://en.wikipedia.org/wiki/Subcutaneous_tissue (dostop: 14.10.2014)
20. Kielhorn J, Melching-Kollmuß S, Mangelsdorf I: Environmental health criteria 235 - Dermal absorption. World Health Organization, 2006.
21. Clémentine Marteau, Dominique Favier, Véronique Nardello-Rataj, Jean-Marie Aubry: Dramatic solvent effect on the synergy between α -tocopherol and BHT antioxidants. Food Chemistry 160 (2014) 190–195.
22. Final Report on the Amended Safety Assessment of Propyl Gallate. International Journal of Toxicology, 26(Suppl. 3):89–118, 2007.
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tocopherol> (dostop: 21.10.2014)
24. Cosmetic Ingredient Review: Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics, Status: Final Amended Report, Release Date: April 4, 2014
25. http://sl.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E (dostop: 21.10.2014)

26. Reviewed by the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Prepared by Monice Zondlo Fiume: Final Report on the Safety Assessment of Tocopherol, Tocopheryl Acetate, Tocopheryl Linoleate, Tocopheryl Linoleate/Oleate, Tocopheryl Nicotinate, Tocopheryl Succinate, Dioleoyl Tocopheryl Methylsilanol, Potassium Ascorbyl Tocopheryl Phosphate, and Tocophersolan. *International Journal of Toxicology*, 21 (Suppl. 3) 51-116, 2002.
27. Scientific Opinion of the Panel on Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food: Opinion on mixed tocopherols, tocotrienol tocopherol and tocotrienols as sources for vitamin E added as a nutritional substance in food supplements. *The EFSA Journal* (2008) 640, 1-34.
28. Peter Weber, MD, Phd, Adrienne Bendich, Phd, And Lawrence J. Machlin, Phd: Vitamin E and Human Health: Rationale for Determining Recommended Intake Levels. *Nutrition* Vol. 13, No. 5, 1997.
29. Harald Weiser, Georges Riss, Alfred W. Kormann: Biodiscrimination of the eight α -tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2R forms in tissues and plasma of rats. *The Journal of Nutrition* 1996 126: 2539-2549.
30. http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=80273 (dostop: 24.11.2014)
31. http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=38627 (dostop: 24.11.2014)
32. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=3%2C4-Dihydro-2%2C5%2C7%2C8-tetramethyl-2-%284%2C8%2C12-trimethyltridecyl%29-2H-benzopyran-6-ol&Units=SI> (dostop: 24.11.2014)
33. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=3%2C4-Dihydro-2%2C5%2C7%2C8-tetramethyl-2-%284%2C8%2C12-trimethyltridecyl%29-2H-benzopyran-6-yl+acetate&Units=SI> (dostop: 24.11.2014)
34. Meydani SN., Meydani M., Bluymberg JB., Leka LS., Pedrosa M., Diamond R., Schaefer EJ.: Assessment of the safety of supplementation with different amounts of

vitamin E in healthy older adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 311-318, 1998.

35. <http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-Tocopherol> (dostop: 21.10.2014)

36. Zhao Y, Lee M-J, Cheung C, Ju J-H, Chen Y-K, Liu B, Hu L-Q, and Yang CS: Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58(8):4844-4852.

37. Meera Rangarajan and Joel L. Zatz: Effect of formulation on the topical delivery of α -tocopherol. *J. Cosmet. Sci.*, 54, 161-174 (March/April 2003).

38. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/DL-alpha-TOCOPHEROL.html> (dostop: 24.10.2014)

39. Petra S. Kern, G. Frank Gerberick, Cindy A. Ryan, Ian Kimer, Aynur Aptula, and David A. Basketter: Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: A second compilation. *Dermatitis*. 2010;21(1):8-32.

40. http://en.wikipedia.org/wiki/Tocopheryl_acetate (dostop: 21.10.2014)

41. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0459903.htm (dostop: 21.10.2014)

42. Meera Rangarajan and Joel L. Zatz: Kinetics of permeation and metabolism of α – tocopherol and α -tocopheryl acetate in micro-Yucatan pig skin. *J. Cosmet. Sci.*, 52, 35-50 (January/February 2001).

43. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine: Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington D.C., Copyright 2000 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.

44. European Chemicals Agency. Toxicological information on CAS No. 7695-91-2. <http://echa.europa.eu> (dostop: 19.11.2014)

45. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/DL-alpha-TOCOPHEROL%20ACETATE.html> (dostop: 24.10.2014)
46. Kentaro Ohko, Akiko Ito, Masaaki Ito: Allergic Contact Dermatitis Syndrome Due to Tocopherol Acetate, in Addition to Glycyrrhetic Acid. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 2012, 2, 38-40.
47. http://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene (dostop: 27.10.2014)
48. Reviewed by the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Prepared by Rebecca S. Lanigan and Torill A. Yamarik: Final Report on the Safety Assessment of BHT. *International Journal of Toxicology* October 2002 21: 19-94.
49. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal* 2012;10(3):2588.
50. OECD Screening Information Dataset (SIDS): 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT), March 2002. UNEP PUBLICATIONS.
51. J. W. Daniel, J. C. Gage and D. I. Jones: The metabolism of 3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxytoluene in the rat and in man. *Biochem. J.* (1968) 106, 783.
52. Yu.V. Paschin, L.M. Bahitova: Inhibition of the mutagenicity of benzo[a]pyrene in the V79/HGPRT system by bioantioxidants. *Mutation Research*, Volume 137, Issue 1, July 1984, Pages 57-59.
53. Black, H. S. and Mathews-Roth, M. M.: Protective Role Of Butylated Hydroxytoluene And Certain Carotenoids In Photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 53: 707–716, 1991.
54. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–111, Last update: 17 October 2014, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (dostop: 16.11.2014)

55. Anca Pop, Cristian Berce, Pompei Bolfa, Andras Nagy, Cornel Catoi, Ion-Bogdan Dumitrescu, Luminita Silaghi-Dumitrescu, Felicia Loghin: Evaluation of the possible endocrine disruptive effect of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate in immature female rats. *Farmacia* 02/2013; Vol. 61(1):202-211.
56. Anca Pop, Bela Kiss, Tudor Drugan, Julien Cherfan, Felicia Loghin: *in vitro* estrogenic/anti-estrogenic effects of certain food additives and cosmetic preservatives. *Farmacia*, 2014, Vol. 62, 5
57. Reviewed by the 2014 Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Prepared by Wilbur Johnson, Jr., M.S., Senior Scientific Analyst and Bart Heldreth, Ph.D., Chemist.: Safety Assessment of Pentaerythrityl Tetra-Di-*t*-Butyl Hydroxyhydrocinnamate as Used in Cosmetics, Status: Final Report, Release Date: April 4, 2014, Cosmetic Ingredient Review.
58. <http://www.personal-care.basf.com/ProductDetails?PRD=30483790> (dostop: 30.10.2014)
59. European Chemicals Agency. Toxicological information on CAS No. 6683-19-8. <http://echa.europa.eu> (dostop: 18.11.2014)
60. http://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxyanisole (dostop: 5.11.2014)
61. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food: Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal* 2011;9(10):2392.
62. Final Report on the Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole. *Journal Of The American College Of Toxicology* Volume 3, Number 5, 1984. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers.
63. Regina Schumann: In vitro absorption of butylated hydroxyanisole through human skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 335 - 340 (September/October 1991).
64. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm (download database: EDS_2003_DHI2006.mdb) (dostop: 23.11.2014)

65. http://en.wikipedia.org/wiki/Propyl_gallate (dostop: 2.11.2014)

66. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. EFSA Journal 2014;12(4):3642.