

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LAURA LAMBERGAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



LAURA LAMBERGAR

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA RAZLIČNIH SESTAVIN
NARAVNEGA IZVORA V DERMALNI FORMULACIJI Z IZZIVNIM
PREIZKUSOM IN DOLOČANJEM CELOKUPNEGA ŠTEVILA
MIKROORGANIZMOV**

**COMPARISON OF PRESERVATIVE EFFECTIVENESS OF VARIOUS
NATURAL INGREDIENTS IN DERMAL FORMULATION BY USING
CHALLENGE TEST AND TEST OF TOTAL VIABLE MICROBIAL COUNT**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Mojci Lunder, mag. farm., za strokovne nasvete, usmerjanje in pomoč pri pisanju magistrske naloge. Najlepša hvala tudi doc. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm., za pomoč pri izbiri teme magistrske naloge, vse strokovne nasvete ter dobro voljo. Hvala tudi članoma komisije za pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se svoji družini, ki me je ob času študija in med pisanjem magistrske naloge spodbujala in podpirala. Zahvala gre tudi vsem prijateljem in sošolcem, brez katerih leta na fakusu ne bi bila tako posebna. Posebej pa se zahvaljujem mojemu fantu Urošu, ki mi je stal ob strani in vedno verjel vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.

Laura Lambergar

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl

Član komisije: asist. dr. Rok Frlan

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	III
KAZALO ENAČB	IV
KAZALO PRILOG	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 TREND NARAVNE KOZMETIKE	1
1.2 CERTIFIKATI ZA NARAVNO KOZMETIKO	1
1.2.1 BDIH	2
1.2.2 ECOCERT	2
1.2.3 COSMEBIO	3
1.2.4 SOIL ASSOCIATION	3
1.2.5 ICEA	4
1.2.6 COSMOS STANDARD AISBL	4
1.2.7 NATRUE	4
1.3 KONZERVANSI V KOZMETIČNIH IZDELKIH	5
1.3.1 SPLOŠNO	5
1.3.2 UREDBA O KOZMETIČNIH IZDELKIH	6
1.3.3 NAJPOGOSTEJE UPORABLJANI KONZERVANSI	7
1.3.3.1 PARABENI	7
1.3.3.2 OSTALI SINTEZNI KONZERVANSI	8
1.4 NOVE ALTERNATIVE KONZERVIRANJA	8
1.4.1 NARAVNE SESTAVINE, KI IMAJO PROTIMIKROBNO DELOVANJE	9
1.4.1.1 ALKOHOLI	9
1.4.1.2 ORGANSKE KISLINE	9

1.4.1.3 GLICEROLNI MONOESTRI	11
1.4.1.4 PEPTIDI.....	11
1.4.1.5 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA	11
1.5 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA	12
1.6 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV	15
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO DERMALNE EMULZIJE.....	17
3.2 KEMIKALIJE IN REAGENTI.....	19
3.2.1 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO TESTU 2.6.12 Ph. Eur. 8.0	19
3.2.2 IZZIVNI TEST.....	19
4 EKSPERIMENTALNO DELO	23
4.1 IZDELAVA DERMALNE EMULZIJE Z RAZLIČNIMI SESTAVINAMI NARAVNEGA IZVORA	23
4.2 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO Ph. EUR. TESTU 2.6.12	24
4.3 IZZIVNI TEST PO STANDARDU ISO 11930	25
4.3.1 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA	25
4.3.2 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV.....	26
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO TESTU 2.6.12 Ph. Eur. 8.0.....	28
5.2 IZZIVNI TEST PO STANDARDU ISO 11930	31
5.2.1 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA	31
5.2.2 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV.....	33
6 SKLEP.....	42
7 LITERATURA	43
8 PRILOGE	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Oznaka BDIH	2
Slika 2: Oznaka Ecocert	2
Slika 3: Oznaka Cosmebio za ECO in BIO kozmetiko	3
Slika 4: Oznaka Soil Association	3
Slika 5: Oznaka ICEA	4
Slika 6: Oznake standarda Cosmos	4
Slika 7: Oznaka Natrue	4
Slika 8: »Po odprtju uporabno do«.....	6
Slika 9: Minimalni rok trajanja	6
Slika 10: Kemijska struktura parabenov	8
Slika 11: Prikaz postopka testa po Ph. Eur. 2.6.12 z metodo štetja kolonij v trdnem gojišču	24
Slika 12: Prikaz postopka izzivnega preizkusa	27
Slika 13: Vzorec z veliko vsebnostjo levulinske kisline ob času T_0	30
Slika 14: Vzorec z majhno vsebnostjo fenoksietanola ob času $T_{2\text{mes}}$	30
Slika 15: Vzorec dehidroacetne kisline in benzilalkohola v kombinaciji ob času T_7	38
Slika 16: Kolonijska enota <i>S.aureus</i> na plošči vzorca levulinske kisline v visoki koncentraciji	38
Slika 17: Kolonija <i>S. aureus</i> čez zelo ploščo	41
Slika 18: Slabo umešanje vzorca v gojišče	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Testi za preizkus ohranjanja učinkovitosti ter predpisani mikrorganizmi.....	12
Preglednica 2: Velikost vzorca, količina inokuluma, koncentracija inokuluma pri izzivnih testih .	13
Preglednica 3: Kriteriji sprejemljivosti za Ph. Eur.....	13
Preglednica 4: Kriteriji sprejemljivosti za standard ISO 11930.....	14
Preglednica 5: Kriteriji sprejemljivosti za Schülke Koko test	14
Preglednica 6: Kriteriji sprejemljivosti za USP	14
Preglednica 7: Kriteriji sprejemljivosti za ASEAN test.....	14
Preglednica 8: Pomožne sestavine v emulziji	17
Preglednica 9: Izbrane naravne protimikrobne spojine in sintezi konzervans paraben.....	18
Preglednica 10: Sestava dermalnih emulzij v 100 g.....	23
Preglednica 11: Priprava vzorcev za test učinkovitosti deaktivatorja.....	25
Preglednica 12: Ocena skupnega števila viabilnih mikroorganizmov v 1 mL emulzije ob času izdelave in po 2 mesecih	29

Preglednica 13: Rezultati kontrole učinkovitosti deaktivatorja.....	32
Preglednica 14: Kriteriji standarda ISO 11930 za <i>A. brasiliensis</i> in <i>S. aureus</i>	34
Preglednica 15: Rezultati izzivnega testa z <i>A. brasiliensis</i> za kozmetične izdelke z različnimi konzervansi	35
Preglednica 16: Rezultati izzivnega testa s <i>S. aureus</i> za kozmetične izdelke z različnimi konzervansi	36
Preglednica 17: Ustreznost kriterijev standarda ISO 11930 za vse predpisane mikroorganizme	39

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun logaritemskega zmanjšanja mikroorganizmov	33
---	----

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Sestava izdelanih dermalnih emulzij s podatki o koncentraciji konzervansov	48
Priloga 2: Število mikroorganizmov v kozmetičnih izdelkih tik po izdelavi in po dveh mesecih shranjevanja določeno po testu Evropske farmakopeje 2.6.12.....	49
Priloga 3: Povprečno število kolonij <i>A. brasiliensis</i> na dveh PDA gojiščih pri različnih redčitvah in različnih časovnih točkah izzivnega testa	50
Priloga 4: Povprečno število kolonij <i>S. aureus</i> na dveh TSA gojiščih pri različnih redčitvah in različnih časovnih točkah izzivnega testa	51
Priloga 5: Vrednosti zmanjšanja logaritemske vrednosti za <i>A. brasiliensis</i> in <i>S. aureus</i>	52
Priloga 6: Število kolonijskih enot v 1 mL kozmetičnega izdelka, ki smo ga ocenili iz štetja kolonij na petrijevkah ob različnih časovnih točkah	53

POVZETEK

V zadnjih letih je trend naravne kozmetike v porastu, ljudje se vse bolj zavedamo, kaj s kozmetičnimi izdelki vnašamo na telo. Naravne protimikrobne spojine iz rastlin, živali in mikrobnih virov imajo sposobnost, da izboljšajo varnost kozmetičnih izdelkov in spodbujajo idejo o naravnih konzervansih. Ti naj bi v večji meri zamenjali klasične, preizkušene, sintezne konzervanse, med katerimi so najpogostejši parabeni. Povpraševanje po naravnih konzervansih je vse večje, saj so konzervansi nujni za zaščito kozmetičnih izdelkov. So spojine, s katerimi preprečimo razvoj mikroorganizmov. V sklopu raziskave za magistrsko nalogu smo izdelali dermalne emulzije z različnimi sestavinami naravnega izvora, med katerimi jih nekaj že spada med konzervanse, druge pa izkazujejo protimikrobne lastnosti. To so dehidroocetna kislina in benzilalkohol v kombinaciji, dehidroocetna kislina, salicilna kislina, levulinska kislina, sorbinska kislina, glicerilkaprilat, janeževa kislina, fenoksietanol, filtrat fermenta korenine redkvice, benzojska kislina, etanol in ekstrakt semen grenivke. V izbranih kozmetičnih emulzijah smo z izzivnim testom ocenili protimikrobno učinkovitost teh protimikrobnih sestavin v primerjavi s parabeni, ki smo jih uporabili za pozitivno kontrolo. Za oceno mikrobiološke zaščite v kozmetičnih izdelkih smo uporabili standard ISO 11930, pri katerem mora za dokaz učinkovitosti konzerviranja protimikrobna snov v emulziji ustrezati zahtevam, določenim v standardu. Testne emulzije smo najprej okužili s predpisanim številom mikroorganizmov plesni *Aspergillus brasiliensis*, nato pa smo test ponovili še z bakterijo *Staphylococcus aureus*. V časovnih točkah v 28 dneh smo opazovali spreminjaњe njihovega števila. Ugotovili smo, da vsi konzervansi v obeh koncentracijah ustrezajo standardu ISO 11930. Prav tako ISO kriterijem v vseh treh koncentracijah ustrezajo tudi parabeni. Da lahko konzervanse označimo za učinkovite, moramo upoštevati še rezultate izzivnega testa z ostalimi predpisanimi mikroorganizmi standarda ISO 11930.

V drugem testu smo ovrednotili mikrobiološko kakovost emulzij po testu Evropske farmakopeje 8.0. S testom 2.6.12. Mikrobiološki pregled nesterilnih izdelkov: preskusi štetja mikroorganizmov, smo določili celokupno število živil aerobnih mikroorganizmov in celokupno število kvasovk in plesni. Na podlagi naših rezultatov so vse emulzije ustrezale predpisu. S testiranjem mikrobiološke kakovosti smo dokazali kvalitetno izdelavo kozmetičnih izdelkov.

Ključne besede: naravni konzervansi, ISO 11930, izzivni test, protimikrobna aktivnost.

ABSTRACT

In recent years, we are facing a positive trend of people awareness about the meaning of natural cosmetics and how it affects our body. Natural antimicrobial ingredients from plants, animals and microbial sources, have the potential of improving cosmetics safety and therefore encourage the idea about natural preservatives. These could mainly replace traditional and proven chemical preservatives, of which the parabens are most commonly used. Demand for natural preservatives is rising rapidly, as preservatives are essential components of cosmetic products. They are compounds intended to prevent growth of microorganisms. Within my master's thesis research, we prepared dermal emulsions, which contained different natural-sourced ingredients, some of them already belonging to the preservative classification, while others showing antimicrobial properties. These are combination of dehydroacetic acid and benzyl alcohol, dehydroacetic acid, salicylic acid, levulinic acid, sorbic acid, glyceryl caprylate, anisic acid, phenoxyethanol, radish root ferment, benzoic acid, ethanol and grapefruit seed extract. For the particular cosmetics emulsions we used the challenge test in order to estimate the antimicrobial effectiveness of these antimicrobial agents in comparison to parabens, which were used for positive control. Standard ISO 11930 has been used for evaluating cosmetics microbial protection, where certain criteria needs to be meet for demonstrating preservation efficacy. The test emulsions were initially inoculated with the prescribed number of mold *Aspergillus brasiliensis*, and then the test was repeated with bacteria *Staphylococcus aureus*. We observed changes in microorganism number in sampling times during 28 days. It was observed that all preservatives in both concentrations were compliant with the standard ISO 11930. ISO criteria were fulfilled as well by parabens in all three concentrations. To declare preservatives as efficient, we must as well consider results from challenge test done with other prescribed microorganisms of standard ISO 11930.

The second test was to evaluate the microbiological quality of emulsions according to Ph. Eur. 8.0. We determined the total aerobic microbial count and total yeast and moulds count with test 2.6.12 named Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests. Showed on our results, all emulsions met the regulation, with microbiological quality testing we proved quality preparation of cosmetic products.

Key words: natural preservatives, ISO 11930, challenge test, antimicrobial activity.

SEZNAM OKRAJŠAV

A. brasiliensis	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
ASEAN	Združenje jugovzhodnih azijskih narodov
CTFA	Združenje za kozmetiko, higieno in dišave
CFU	kolonijske enote (colony forming unit)
CosIng	Baza kozmetičnih sestavin (COSmetic INGredients database)
DPP	dobra proizvodna praksa (GMP good manufacturing practise)
INCI	Mednarodno poimenovanje spojin kozmetičnih proizvodov
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo
NCPF	tipski sev zbirke National Collection of Pathogenic Fungi
NCTC	tipski sev zbirke National Collection of Type Cultures
PDA	gojišče krompirjev glukozni agar (Potato glucose agar)
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja
R₇	zmanjšanje logaritemske vrednosti po 7 dneh izzivnega testa
R₁₄	zmanjšanje logaritemske vrednosti po 14 dneh izzivnega testa
R₂₈	zmanjšanje logaritemske vrednosti po 28 dneh izzivnega testa
SCCS	Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov
SDA	sabaraudovo gojišče z dekstrozo (angl. Sabouraud dextrose agar)
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
TAMC	skupno število aerobnih mikroorganizmov na mL (total aerobic microbial count)
TYMC	skupno število kvasovk in plesni na mL (total yeast/moulds count)
TSA	gojišče triptični soja agar (angl. Tryptone soya agar)
T₀	časovna točka ob času izdelave pri preskusu štetja mikroorganizmov
T_{2 mes}	časovna točka po 2 mesecih na sobni temperaturi pri preskusu štetja mikroorganizmov
T₇	časovna točka vzorčenja ob 7 dneh po inokulaciji pri izzivnem testu
T₁₄	časovna točka vzorčenja ob 14 dneh po inokulaciji pri izzivnem testu
T₂₈	časovna točka vzorčenja ob 28 dneh po inokulaciji pri izzivnem testu
USP	Ameriška farmakopeja (United States Pharmacopoeia)

1 UVOD

1.1 TREND NARAVNE KOZMETIKE

Trend vračanja k naravnemu je vse bolj prisoten in v porastu ter se opaža tudi v kozmetični industriji (1). Veliko potrošnikov meni, da je človeško telo bolj prilagojeno stikom z naravno prisotnimi sestavinami kot pa sinteznimi, kar naj bi bil rezultat dolgotrajnega evolucijskega procesa prilagoditve človeškega metabolizma snovem v okolju. Paziti moramo na dejstvo, da naravno ni nujno vedno varno, tudi naravne sestavine imajo neželene učinke. Zaradi lastnosti protimikrobnih snovi, da vplivajo na žive celice, jih moramo prav tako toksikološko vrednotiti kot sintezne snovi (2). Mnogo kozmetičnih izdelkov, ki so trenutno na trgu, ima oznake »naravno«, »ekološko« ali »organsko«. Izraz »naravno« se nanaša na izvor surovin ali zmes spojin (3). Pojem »ekološko« ali »organsko« ali »bio« pa pomeni, da so bile surovine v izdelku gojene in proizvedene v skladu s posebnimi pravili in predpisi ter da je proces od vzgoje do njihove uporabe povsem naraven in brez kemičnih dodatkov. V mnogih primerih je oglaševanje naravnega zelo zavajajoče, največkrat gre le za komercialni interes, ki poveča prodajo ali zviša ceno kozmetičnega izdelka. Da celoten kozmetični izdelek označimo kot »naraven«, ni nujno, da so vse sestavine izdelka naravne, dovolj je že, da vsebuje le nekaj naravnih sestavin, ostale pa so sintezne. Kakšna je lahko vsebnost sinteznih snovi oziroma kakšna mora biti vsebnost naravnih snovi, predpisujejo standardi naravne kozmetike, ki so jih razvile različne organizacije po Evropi in svetu (1). Standardi in sistemi certificiranja so trenutno edino zagotovilo, da je proizvod res naraven.

1.2 CERTIFIKATI ZA NARAVNO KOZMETIKO

Področje o označevanju naravnih kozmetičnih izdelkov zakonsko še ni urejeno, kriteriji niso točno določeni, sistem označevanja in poimenovanja pa prav tako še ni enoten. Kozmetične izdelke, ki imajo certifikat, prepoznamo po simbolih na njihovih vsebnikih. Te oznake nam povedo, da so sestavine v izdelku res naravnega in organskega izvora. Večinoma certifikati predpisujejo prepoved dodajanja sinteznih barvil in dišav, silikonov, etoksiliranih surovin, parafina in drugih naftnih derivatov ter gensko spremenjenih sestavin. Ovojnina mora biti iz biorazgradljivega materiala, proces proizvodnje pa mora biti okolju prijazen. Pomembna je osveščenost potrošnika, ki mora sam proučiti sestavine in kriterije ter glede na to presoditi, kateri kozmetični izdelek bo uporabljal. Najbolj

priznani in poznani standardi za naravno in ekološko kozmetiko so BDIH (slika 1), Ecocert (slika 2), Cosmebio (slika 3), Soil Association (slika 4) in ICEA (slika 5), ki so od letošnjega leta dalje združeni v enotni standard COSMOS (slika 6) in ne uporabljajo več svojih logotipov ter standard Natrue (slika 7) (4). Spodaj so kratki opisi certifikatov.

1.2.1 BDIH

BDIH je nemško neprofitno industrijsko in trgovsko združenje, ki izdaja certifikate izdelkom za zdravstveno in osebno nego, prehranskim dopolnilom ter farmacevtskim izdelkom. Standard BDIH je prvi oblikoval celovite smernice za certificirano naravno kozmetiko (5). Pridobijo ga izdelki, ki vsebujejo sestavine rastlinskega izvora s certifikatom. Pomožne snovi živalskega izvora, kot sta mleko in med, so dovoljene. Konzervansi, ki morajo biti označeni na deklaraciji in jih lahko uporabljamo, so benzojska, salicilna, sorbinska, dehidroocetna kislina in njihove soli ter benzilalkohol. Prav tako je v izdelkih dovoljena uporaba anorganskih in mineralnih soli, ne smejo pa vsebovati sestavin, preizkušenih na živalih, in pa parafinov, silikonov, naftnih derivatov, etoksiliranih surovin, sinteznih dišav ter barvil. Prav tako ni dovoljeno ionizirajoče obsevanje pomožnih snovi niti končnih proizvodov. Pogoj za pridobitev certifikata je tudi strogo nadzorovan postopek izdelave izdelka (6).



Slika 1: Oznaka BDIH

1.2.2 ECOCERT

ECOCERT je prvi akreditirani organ, ki je razvil standarde za naravno in tudi naravno ekološko kozmetiko. Za zagotovitev okolju prijaznega kozmetičnega izdelka standard določa uporabo sestavin, pridobljenih iz obnovljivih virov in proizvedenih v okolju prijaznih procesih. Ecocert preveri odsotnost gensko spremenjenih organizmov, parabenov, fenoksieteranola, nanodelcev, silikonov, polietilen glikola, sinteznih dišav in barvil ter sestavin živalskega izvora, razen naravno pridobljenih, kot sta mleko in med. Ovojnina mora biti biorazgradljiva ali z možnostjo reciklaže. Da izdelek pridobi certifikat, mora biti dosežena minimalna meja naravnih sestavin, pridobljenih iz ekološkega kmetovanja. Tako pri certifikatu za ekološko (»organic cosmetic«) kot naravno (»natural cosmetic«) kozmetiko mora biti najmanj 95 % vseh sestavin naravnega izvora. Izdelek, ki velja za naravnega, mora vsebovati vsaj 50 % vseh rastlinskih sestavin, pridelanih z ekološkim



Slika 2: Oznaka Ecocert

kmetovanjem, prav tako mora biti 5 % vseh sestavin ekološkega izvora. Pri ekološki kozmetiki pa mora biti vseh 95 % rastlinskih sestavin pridobljenih iz ekološkega kmetovanja, 10 % vseh sestavin v izdelku mora biti ekoloških. Na ovojnini morajo biti seznam in imena vseh sestavin navedeni v uporabniku razumljivem jeziku, obvezna so tudi mednarodna poimenovanja spojin kozmetičnih proizvodov (INCI) (7).

1.2.3 COSMEBIO

COSMEBIO je neprofitno združenje različnih podjetij in ustanov, ki je izdala standarde za ekološko kozmetiko (8). Te standarde običajno potrdi Ecocert, kar je tudi označeno na proizvodu, certifikate pa lahko dobijo le člani združenja. V »eco« certificiranem kozmetičnemu izdelku mora biti 95 % sestavin naravnega izvora. Vsaj 5 % celotne količine morajo predstavljati ekološko pridobljene sestavine, katerih 50 % mora imeti ekološki certifikat. V »bio« certificiranem kozmetičnem izdelku mora biti 95 % sestavin naravnega izvora. Vsaj 10 % celotne količine morajo predstavljati ekološko pridobljene sestavine, katerih 95 % mora imeti ekološki certifikat (9). Vse sestavine v izdelku morajo biti navedene na ovojnini po enotni nomenklaturi INCI v angleškem in potrošniku razumljivem jeziku (10).



Slika 3: Oznaka Cosmebio za ECO in BIO kozmetiko

1.2.4 SOIL ASSOCIATION

Organizacija je bila ustanovljena 1946 v Veliki Britaniji. Certifikate podeljuje izdelkom živilske, kozmetične in tekstilne proizvodnje (11). Da izdelki pridobijo certifikat »organic«, morajo vsebovati 95 % ekoloških sestavin, ki morajo biti biorazgradljive in z opravljenimi toksikološkimi testi. Sinteznih snovi je lahko le 5 %. Če izdelki vsebujejo 70–95 % surovin iz ekološke kmetijske pridelave, certifikat pridobijo, vendar vsebnost na izdelku ustrezno označijo (12). Standard teži k temu, da imajo izdelki čim večji delež ekoloških sestavin, niso škodljivi za zdravje ljudi in okolja, ne smejo biti testirani na živalih, biti morajo jasno označeni in dajati točne informacije potrošniku. Med konzervansi so dovoljeni benzilalkohol, benzojska, sorbinska kislina in njune soli, dehidroacetna kislina in njena natrijeva sol. Določene so dovoljene in nedovoljene pomožne sestavine in postopki (13).



Slika 4: Oznaka Soil Association

1.2.5 ICEA

ICEA (*Instituto per la certificazione etica e ambiente*) je inštitut, ki ga je ustanovilo AIAB (*Associazione Italiana per l'agricoltura biologica*). Ta akreditirani organ dodeljuje certifikate za naravno in ekološko kozmetiko, vendar ti certifikati ne predpisujejo točno določenih sestavin ekološkega izvora kot ostali, predpisujejo pa določene zahteve o dovoljenih ali prepovedanih sestavinah ter procesih (14, 15).



Slika 5: Oznaka ICEA

1.2.6 COSMOS STANDARD AISBL

Združenje COSMOS STANDARD AISBL obstaja od leta 2010, ustanovili so ga akreditirani organi BDIH, Cosmebio, Ecocert, ICEA in Soil Association. Vseevropski standard COSMOS je mednarodna neprofitna organizacija za ekološko in naravno kozmetiko, ki ima sedež v Bruslju. Njen namen je bil opredeliti skupne zahteve in definirati organsko in naravno kozmetiko (16). Pri naravni kozmetiki ni nujno, da so sestavine ekološkega izvora, ne smejo pa vsebovati več kot 2 % sinteznih sestavin. Pri ekološki kozmetiki pa mora biti 95 % naravnih sestavin ekološkega izvora, ki morajo glede na celoten izdelek predstavljati 20 % (17). Standard spodbuja uporabo sestavin ekološkega izvora, naravnih virov, uporabo neoporečnih postopkov in promovira koncept zelene kemije. Sestavljen je iz prilog, ki opisujejo dovoljene in nedovoljene sestavine, procese izdelave, kontrole končnih izdelkov, označevanja (18).



Slika 6: Oznake standarda Cosmos

1.2.7 NATRUE

NATRUE je standard, ki ga je ustanovila mednarodna zveza predstavnikov proizvajalcev in prodajalcev kozmetike. Gre za poenotenje standardov za naravno in ekološko kozmetiko. Ločimo tri ravni: naravno kozmetiko, naravno kozmetiko z deležem ekoloških sestavin in ekološko kozmetiko (19). Pri kozmetiki Natrue z oznako naravna kozmetika so določeni minimalni deleži naravnih sestavin ter maksimalni deleži sestavin naravnega izvora. Pri naravni kozmetiki z deležem ekoloških sestavin mora biti vsaj 70 % naravnih sestavin ekološkega porekla. Glede na celoten izdelek mora biti vsaj 15 %



Slika 7: Oznaka Natrue

kemično neobdelanih sestavin naravnega izvora in največ 15 %, ki so lahko kemično obdelane. Seveda mora ta stopnja zadostiti kriterijem opisanim pri naravni kozmetiki. Izdelek s certifikatom ekološka kozmetika mora zadostiti vsem kriterijem za naravno kozmetiko z deležem ekoloških sestavin, vsaj 70 % naravnih sestavin mora biti ekološke pridelave. Vsebovati mora vsaj 20 % kemično nespremenjenih naravnih sestavin in največ 15 % sestavin naravnega izvora, ki so lahko kemično spremenjene (20).

Kot smo opisali v zgornjih standardih, v naravni kozmetiki obstaja veliko omejitev in prepovedi glede sestavin, ki jih uporabljamo, med njimi tudi o uporabi emulgatorjev, barvil, dišav in konzervansov. Slednje bomo natančneje opisali v nadaljevanju (21).

1.3 KONZERVANSI V KOZMETIČNIH IZDELKIH

1.3.1 SPLOŠNO

Definicija konzervansov, navedena v Uredbi o kozmetičnih izdelkih št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 20. Novembra 2009, pravi: »Konzervansi pomenijo snovi, ki so izključno ali v glavnem namenjene zaviranju razvoja mikroorganizmov v kozmetičnem izdelku« (22). So protimikrobne snovi, ki jih dodajamo v kozmetični izdelek, da preprečimo mikrobiološko kvarjenje kozmetičnega izdelka, mu podaljšamo rok uporabnosti in zaščitimo potrošnika pred potencialno neželeno okužbo. Mikrobiološka varnost kozmetičnih izdelkov je že od nekdaj v posebnem interesu industrije, saj mikrobiološka okužba lahko povzroči nestabilnost proizvoda ali pa v primeru patogenih mikroorganizmov v stiku s poškodovano kožo, povzroči širjenje okužbe (23). Raznovrstne sestavine modernih kozmetičnih izdelkov skupaj z vodnim okoljem, shranjevanje kozmetike na sobni temperaturi, uporaba vsebnikov za večkratno uporabo in izpostavljenost izdelkov brez zaščite za dlje časa so idealno izhodišče za rast mikroorganizmov. Vsi našteti dejavniki pomenijo, da so učinkoviti konzervansi bistvenega pomena za mikrobiološko varnost kozmetičnih izdelkov (24). Pomembno je, da zagotovimo ustrezno konzerviranje med proizvodnjo, transportom, shranjevanjem in med celotno uporabo izdelka (25). Idealen konzervans mora biti stabilen in združljiv z drugimi sestavinami v kozmetičnem izdelku, brez vpliva na barvo in vonj izdelka, imeti mora širok spekter delovanja pri majhnih koncentracijah, biti učinkovit pri različnih pH-vrednostih ter se ustrezno vmešati v emulzijo. Ne sme povzročati draženja ali preobčutljivosti, ne sme biti toksičen in mora biti varen za uporabo. Konzervans mora ohranjati svoje

protimikrobeno delovanje v prisotnosti ostalih sestavin v izdelku. Da se zagotovi celovitost proizvoda, morata biti tako spekter aktivnosti kot uporabljeni koncentracija konzervansa natančno preverjena. Takšnih lastnosti še nima noben konzervans, se pa jim želimo čim bolj približati, največkrat s kombinacijo dveh ali več konzervansov (26).

1.3.2 UREDBA O KOZMETIČNIH IZDELKIH

V Evropi nova zakonodaja Uredba o kozmetičnih izdelkih 1223/2009, ki se uporablja v vseh državah članicah Evropske unije, zamenjuje Kozmetično direktivo Sveta evropskih skupnosti 76/768/EGS. Slovenska zakonodaja je na tem področju usklajena z evropsko. Evropska direktiva o kozmetičnih izdelkih 1223/2009 je v veljavi od 11. julija 2013. Gre za uskladitev in poenostavitev skupnih obveznosti za vse države. Zahteva poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka, ki mora vsebovati rezultate izzivnega preskusa in s tem poročilo o mikrobiološki kakovosti. Podrobnejša vsebina poročila je opisana v prilogi I te uredbe. V prilogi V je seznam 57 trenutno dovoljenih skupin konzervansov v kozmetičnih izdelkih. Navedene so dovoljene mejne koncentracije konzervansov v izdelkih, pripravljenih za uporabo, besedilo pogojev uporabe in posebna opozorila (22).

Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih določa kriterije glede mikrobiološke ustreznosti kozmetičnih proizvodov. Mikroorganizmi *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in *Candida albicans* se v 0,1 g ali 0,1 ml vzorca kozmetičnega izdelka ne smejo nahajati. Prav tako teh mikroorganizmov ne smejo vsebovati kozmetični izdelki v vzorcu 0,5 g ali 0,5 ml, namenjeni za nego otrok, mlajših od treh let, in pa tisti kozmetični izdelki, ki se uporabljajo na koži v območju oči in na sluznicah. Izdelki za otroke, mlajše od treh let, ali za uporabo na koži okoli oči in na sluznicah, v 1 g ali 1 ml vzorca ne smejo vsebovati več kot 100 aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. V ostalih kozmetičnih izdelkih, v vzorcu 1 g ali 1 ml, skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ne sme biti večje od 1000 (27).

Pri uporabi kozmetike moramo biti pazljivi tudi na dva simbola – simbol odprte posodice, ki označuje končne kozmetične izdelke, ki imajo minimalni rok trajanja več kot 30 mesecev (slika 8) ter peščeno uro, ki pove datum, do katerega izdelek shranjen pod ustreznimi pogoji ohrani prvotno funkcijo (slika 9) (22).

Slika 8: »Po odprtju uporabno do«



Slika 9: Minimalni rok trajanja

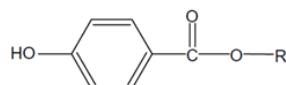


1.3.3 NAJPOGOSTEJE UPORABLJANI KONZERVANSI

1.3.3.1 PARABENI

Najpogosteje uporabljeni konzervansi ta hip so parabeni (23), derivati *para*-hidroksibenzojske kisline, pri katerih je karboksilna skupina zaestrena z različnimi alkoholi. Poznamo več različnih predstavnikov omenjene skupine konzervansov: metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben, izopropilparaben. Na sliki 11 je prikazana njihova kemijska struktura. Metilparaben in propilparaben sta najpogosteje uporabljana in pogosto prisotna v izdelkih v kombinaciji. Parabeni imajo že v majhnih koncentracijah baktericidno in fungicidno delovanje, zato jih v kozmetičnih izdelkih uporabljamo kot konzervanse. Z daljšanjem alkilne verige se veča njihova protimikrobnna aktivnost, manjša pa se njihova vodotopnost. Pridobivamo jih z esterifikacijo iz hidroksibenzojske kisline in primernega alkohola v prisotnosti kislinskega katalizatorja. Parabeni so relativno varni za uporabo, imajo širok spekter delovanja, so kemično stabilni, inertni, imajo nizko sistemsko toksičnost, redko povzročajo alergijske reakcije, so zadostno stabilni v vodnem mediju, so brez vonja in okusa, ob njihovem dodatku v konsistenci izdelka ni sprememb ter imajo nizke proizvodne stroške. Najvišja dovoljena koncentracija parabenov v kozmetičnih izdelkih je 0,4 % za posamezni ester in 0,8 % za mešanico estrov (28). Parabeni so v uporabi že več kot 80 let, veliko pozornosti pa so pritegnili v zadnjih letih. Njihovo varnost je zamajala možna povezava z rakom dojke in znanstvena poročila o možnosti estrogenega učinka ob sistemski izpostavljenosti (23). Leta 2004 so objavili študijo, kjer so v izrezanih tumorjih raka dojk dokazali povečano vsebnost parabenov (29). Predvidevali so, da je izvor v kozmetičnih izdelkih, ki jih uporabljamo na koži pod pazduho – antiperspirantov. Vendar znanstveni dokazi, ki so sledili, niso potrdili povezave med parabeni v kozmetiki in povečanjem raka na dojkah (30). Te učinke izkazujejo nemetabolizirane spojine, normalno pa se parabeni metabolizirajo do kisline, ki nima nobenih učinkov. Da bi lahko te učinke povzročili parabeni, bi morali iz kozmetičnega izdelka prodreti skozi kožo in preiti v sistemski krvni obtok (31). Trenutno velja, da sta metilparaben in etilparaben varna pri največjih dovoljenih koncentracijah. Je pa na osnovi številnih študij Znanstveni odbor za varnost potrošnikov pri Evropski komisiji sklenil, da so propilparaben in butilparaben, njune soli in izooblike prepovedani v kozmetičnih pripravkih za otroke, mlajše od treh let, zaradi morebitnega endokrincega učinka. Tanka otroška koža bi lahko povzročila njihovo prehajanje skozi kožo (32). Uredba št. 1004/2014 navaja, da je uporaba butilparabena in propilparabena v kozmetičnih izdelkih varna v

koncentraciji 0,19 %, mišljeno kot vsota posameznih koncentracij (33). V kozmetičnih izdelkih za odrasle, ki jih izpiramo s kože, je po novem dovoljena manjša koncentracija kot prej, in sicer v 0,14 % za posamezno koncentracijo in 0,8 % za mešanico. Prepovedani parabeni so izopropilparaben, izobutilparaben, fenilparaben, benzilparaben in pentilparaben, ki pa so sicer manj uporabljeni parabeni. Kljub negativnemu slovesu v zadnjem času so parabeni še vedno relativno varne spojine (34).



Slika 10: Kemijska struktura parabenov

1.3.3.2 OSTALI SINTEZNI KONZERVANSI

Konzervanse, ki so trenutno prisotni na trgu, razdelimo v nekaj glavnih skupin glede na njihovo strukturo. Vrste tradicionalnih sinteznih konzervansov so: organske kisline, njihove soli in estri, aldehydi in konzervansi, ki sproščajo formaldehyd, kvartarne amonijeve spojine: amini, amidi, piridini, benzalkonijeve soli, aromatske spojine in njihovi derivati, alkoholi in njihovi derivati, derivati gvanidina, organske živosrebrove spojine in ostali. Delujejo na več načinov, tarče delovanja pa so celična stena, citoplazemska membrana in citoplazma mikroorganizmov. Vse skupine, brez izjem, imajo določeno stopnjo tveganja za neželene reakcije, največkrat je to preobčutljivost (21). Obstajajo študije, ki mečejo sum tudi na druge kemijske razrede konzervansov, ne le na parabene. Za konzervanse, ki sproščajo formaldehyd, kot sta imidazolidinil in diazolidinilsečnina, menijo, da povzročajo kožne reakcije pri občutljivih posameznikih, pri uporabi izotiazolinonov pa največkrat pride do alergij (23).

1.4 NOVE ALTERNATIVE KONZERVIRANJA

Naraščajoči skepticizem potrošnikov, nanašajoč se na varnost sinteznih konzervansov, v kombinaciji z dejstvom, da je dolgoročno zdravje naše kože ponavadi povezano z uporabo naravnih sestavin, vodi do iskanja alternativnih pristopov konzerviranja v kozmetičnih izdelkih (35). Prizadevanja so usmerjena v razvoj naravnih spojin s protimikrobnou aktivnostjo, ki imajo manj toksičnih učinkov in predstavljajo možno naravno in varnejšo alternativo konzervansov, vse bolj pa narašča zanimanje tudi za razvoj izdelkov brez konzervansov (26). Vodne farmacevtske oblike brez dodatkov konzervansov lahko izdelamo mikrobiološko stabilne v aseptični proizvodnji in z ustreznim pakiranjem, vendar se moramo v takšnih primerih zavedati, da se rok uporabe občutno zmanjša, izdelek pa je

potrebno porabiti v nekaj dneh po odprtju. Edina možnost priprave kozmetike, ki je ni potrebno konzervirati, je brez dodatka vode, torej izdelava izdelkov, ki nimajo ugodnega medija za rast mikroorganizmov. To so na primer kozmetični pripravki, kot so mazila, olja za telo in balzami za ustnice na oljni osnovi (23).

1.4.1 NARAVNE SESTAVINE, KI IMAJO PROTIMIKROBNO DELOVANJE

V kozmetiki brez konzervansov klasične sintezne konzervanse nadomestimo z večnamenskimi protimikrobnimi sestavinami, ki jih v Uredbi še niso priznali kot konzervanse (23). Ogromno naravnih kozmetičnih izdelkov vsebuje sestavine, ki niso konzervansi, pač pa so druge pomožne snovi, ki delujejo kot le-ti, in bi morale biti na ovojnini ustrezno navedene z ustreznimi opozorili kot sta »Izdelek vsebuje naravne konzervanse neznane toksičnosti, Uporabljaljajte previdno in prenehajte z uporabo takoj, ko opazite kakšno neželeno reakcijo« (1). V naši magistrski nalogi smo obravnavali naslednje naravne sestavine, ki imajo protimikrobno delovanje: alkoholi, organske kisline,glicerolni monestri, peptidi ter rastlinski izvlečki in eterična olja.

1.4.1.1 ALKOHOLI

Alkoholi dosežejo protimikrobni učinek z denaturacijo membranskih proteinov in encimov. Veliko jih izkazuje protimikrobno delovanje. V našem testu smo uporabili benzilalkohol (v kombinaciji) in fenoksietanol, ki spadata med dovoljene konzervanse, in etanol (2). Etanol je hlapna, vnetljiva, brezbarvna tekočina z močnim vonjem, ki ima antisepetično delovanje. Učinkovit je proti večini bakterij in gliv (36). Kot konzervans deluje v dovoljenih koncentracijah 10–30 %, v višjih odstotkih (30–40 %) pa izsuši kožo in je neustrezen za uporabo v dermalnih izdelkih (37). Fenoksietanol je monoester etilenglikola in fenola in je brezbarvna organska tekoča spojina s šibko aromo vrtnice (38). Zelo dobro učinkuje protimikrobno, najboljše delovanje ima proti gramnegativnim bakterijam (39). Je dobro topen v glikolih in alkoholih, zmerno topen v vodi. Stabilen je v širokem območju pH in temperature (40).

1.4.1.2 ORGANSKE KISLINE

Vse bolj priljubljene kot konzervansi v kozmetičnih izdelkih postajajo organske kisline. Delujejo tako, da zmotijo funkcijo membrane. Celice mikroorganizmov skozi membrano privzamejo organsko kislino v nedisociirani obliki. V plazmi kislina disociira, odda

vodikov proton in v celici se spremeni pH. Celica na zmanjšanje pH odgovori z izločanjem vodikovih protonov in privzemanjem natrijevih ionov v celico. Bakterija s tem potroši ogromno energije in mikroorganizem se ne more razmnoževati, zaradi česar nastopi smrt celice. Da so organske kislina čim bolj učinkovite, morajo biti primerno topne v vodni fazi, imeti protonirano obliko pri pH kozmetičnega izdelka, strukturo, ki omogoča prehod skozi membrano, in možnost disociacije v celični plazmi (2). Uporabljamo jih v izdelkih, ki imajo pH pod 6, če jih kombiniramo z drugimi konzervansi, lahko učinkovitost konzerviranja povišamo do nevtralnega pH (41). Med 12 sestavinami naravnega izvora, ki smo jih preverjali, so v kozmetiki že dovoljene kot konzervansi salicilna, sorbinska, dehidroocetna kislina in njihove soli ter benzojska kislina, njene soli in estri. Levulinska in janeževa kislina izkazujeta protimikrobnno delovanje, a v Uredbi še nista priznani kot konzervansa (22). Janeževa kislino pridobivamo z oksidacijo anetola, aromatske spojine, ki je glavna sestavina eteričnega olja janeža (*Pimpinella anisum*). Ima antiseptične lastnosti in jo uporabljamo kot konzervans v kozmetičnih izdelkih, izkazuje boljšo protimikrobnno aktivnost proti plesnim kot bakterijam in kvasovkam (42). Levulinska kislina je organska keto spojina (43), v kozmetičnih izdelkih ima funkcijo regeneracije kože in kot dišava (44). Prav tako v kozmetiki kot konzervans široko uporabljamo dehidroocetno kislino, ki se na trgu pogosto pojavlja v kombinaciji z benzilalkoholom. To kombinacijo vodne raztopine dehidroocetne kislina in benzilalkohola na trgu najdemo pod imenom Cosgard ali Geogard 221. Čeprav je konzervans pridobljen sintezno, ga lahko uporabljamo v organski kozmetiki v skladu s certifikatoma Cosmos in Natrue. Ima širok spekter delovanja, deluje protibakterijsko in protiglivično (45). V raziskavi je pri kombinaciji dehidroocetne kisline in benzilalkohola (0,032 %) koncentracija kislina 10-krat manjša kot pri sami dehidroocetni kislini (0,30 %). Benzojsko kislino pridobivamo iz naravnih virov, a je ekstrakcija zelo draga. Naravno se pojavlja v številnih rastlinah, uporabljamo pa jo tudi kot intermediat v nadalnjih sintezah. Najbolj učinkovita je proti grampozitivnim bakterijam, plesnim in kvasovkam (46). Salicilno kislino uporabljamo tudi kot konzervans v hrani in za nadaljnje sinteze spojin. Ima antiseptično in protiglivično delovanje, najdemo jo v dermalnih veterinarskih izdelkih, široko pa jo uporabljamo tudi v dermatološke namene, saj ima keratoplastične lastnosti (47). Sorbinska kislina je širokospektralna protimikrobnna snov, varna za uporabo v kozmetičnih izdelkih in izdelkih za osebno nego s pH pod 6,5. Izolirali so jo iz stisnjениh nezrelih jagod jerebike (*Sorbus aucuparium*) (24).

1.4.1.3 GLICEROLNI MONOESTRI

V raziskavi smo uporabili glicerilkaprilat, ki je glicerolni monoester oktanojske kisline, pridobljen iz naravnih virov triglyceridov. Je bela trdna snov, ki je registrirana kot emulgator in emolient v kozmetičnih izdelkih. Zelo je učinkovit proti bakterijam in kvasovkam, manj proti plesnim (48). Amfifilna oblika strukture glicerolnim monoestrom omogoča lahek prehod skozi celično membrano, njeni destabilizacijo, poškodbo in propad celice. V kolikor jim dodamo organske kisline, izboljšamo aktivnost proti glivam (2).

1.4.1.4 PEPTIDI

Testirali smo tudi protimikrobnno delujoči peptid, filtrat bakterijskega (*Leuconostoc kimchii*) fermenta korenine redkvice (*Raphanus sativus L.*). Protimikrobnno delovanje, ki ga izkazuje, temelji na protimikrobnih peptidih, ki jih izloča bakterija *L. kimchii* med fermentacijo iz korenine redkvice. Mešanico teh fermentacijskih produktov so nedavno patentirali kot kozmetični konzervans (49). Uporabljamo jo tudi kot vlažilec za uporabo na koži in lasišču (proti prhljaju) (50). Peptide izolirajo iz organizmov, kot so žuželke, sesalci, rastline in bakterijske vrste, ki te snovi proizvajajo, da se zavarujejo pred drugimi organizmi v okolju. Hkrati pa so po svoji naravi sposobni zagotoviti tudi ohranjanje mikrobiološke stabilnosti proizvoda, za kar jih preiskujejo kot potencialne protimikrobine snovi (51).

1.4.1.5 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA

Obstajajo številna eterična olja in izvlečki rastlinskega izvora, ki imajo protimikrobnou aktivnost ter jih uporabljamo samostojno ali v kombinaciji z drugimi konzervansi. Eterična olja so hlapne aromatske tekočine, izolirane iz različnih delov rastlin, kot so cvetovi, semena, listje, steblo in korenine, ter so pridobljene z destilacijo ali hladnim stiskanjem. Izvlečki so kompleksne zmesi spojin, izolirani iz različnih delov rastlin s pomočjo ekstrakcije s primernimi topili in tehnikami (23). Zadnja od sestavin, ki smo jo uporabili pri našem eksperimentalnem delu, je ekstrakt semen grenivke, ki izkazuje antioksidativne ter protimikrobnne učinke in ga zato uporabljamo v kozmetičnih izdelkih in prehranskih dopolnilih. Pripravijo ga z ekstrakcijo iz posušenih semen grenivke z glicerolom pri povišani temperaturi, v kombinaciji z UV sevanjem in katalizo z uporabo naravnih encimov. V literaturi so opisali aktivnost proti bakterijam, kvasovkam in glivam (52).

1.5 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI KONZERVIRANJA

Uradne metode, ki jih uporabljamo za ocenjevanje učinkovitosti konzerviranja, so opisane v različnih farmakopejah in smernicah (53). Za ocenjevanje naših protimikrobnih spojin smo uporabili izlivni test, ki ga izvajamo za določitev minimalne učinkovite koncentracije konzervansov, potrebne za ustrezno mikrobiološko kontrolo proizvoda (54). Uredba o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009 z dne 30.11.2009 zahteva, da poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka prikazuje rezultate izlivnega testa za dokazovanje mikrobiološke stabilnosti, ne določa pa postopka za izlivni test. Na voljo je več različnih metod: standard mednarodne organizacije za standardizacijo (ISO) 11930, test iz Evropske farmakopeje (Ph. Eur), iz Ameriške farmakopeje (USP), Japonske farmakopeje, smernice Združenja za kozmetiko, higieno in dišave (CTFA), Schülke Koko test, smernice Znanstvenega odbora za varstvo potrošnikov (SCCS), Azijski test (ASEAN) ter tudi že mnogo hišnih protokolov. Pri našem raziskovalnem delu smo naredili izlivni test v skladu s standardom ISO 11930. V primerjavi z drugimi metodami je to splošen standard za oceno protimikrobnih stabilnosti kozmetičnega izdelka. Učinkovitost konzerviranja opisana v ISO 11930 je namenjena predvsem vodotopnim izdelkom in izdelkom, ki se mešajo z vodo (55). Med seboj bomo primerjali najpogosteje uporabljane izlivne teste, ki so si med seboj zelo podobni, ugotovimo pa tudi nekaj razlik. Priporočeni mikroorganizmi so *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* in *Candida albicans*, ki jih kozmetični izdelki ne smejo vsebovati. ISO 11930, Ph. Eur, USP in ASEAN uporabljajo samo patogene mikroorganizme ter tako samo delno pokrivajo priporočila SCCS o uporabi dodatnih specifičnih bakterij, ki prav tako lahko privedejo do kvarjenja kozmetičnega izdelka. Edini, ki v celoti izpolnjuje priporočila SCCS, je Schülke Koko preizkus. Predpisani mikroorganizmi za posamezen test so natančneje prikazani v preglednici 1 (55).

Preglednica 1: Testi za preizkus ohranjanja učinkovitosti ter predpisani mikroorganizmi

TEST	Predpisani mikroorganizmi
ISO 11930	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>
SCCS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , specifični MO, ki povzročajo okužbo kozmetičnih izdelkov
Schülke Koko test	<i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Kocuria rhizophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Penicillium pinophilum</i>
Ph. Eur.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>
USP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>
ASEAN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>

Pri testih standarda ISO 11930, Ph. Eur., USP in ASEAN testu inokulum pripravimo tako, da mikroorganizme spiramo iz plošč hranilnih gojišč in želeno izhodno število mikroorganizmov prilagodimo z razredčitvami. Inokulum nato uporabimo za direktno inokulacijo testnega izdelka, skladno s predpisi. Schülke Koko test uporablja mešane suspenzije kulture, ki jih pripravimo tako, da posamezne mikroorganizme zmešamo v eno suspenzijo. Da zagotovimo konstantno sestavo mešanice inokuluma, suspenzijo največ tri dni hranimo v hladilniku. Pri Schülke Koko testu za vsakega izmed šestih inokulacijskih ciklov pripravimo novo suspenzijo. Pri ostalih testih inokuliramo samo enkrat (58). Velikost vzorca, ki ga inokuliramo, se razlikuje od testa do testa. Vsi testi imajo podobno število in količino ter tudi koncentracije uporabljenih testnih mikroorganizmov v inokulumu, natančne vrednosti so podane v preglednici 2. Število koncentracije inokuluma je bilo včasih večje le pri Schülke Koko testu za zagotavljanje varne zaščite za nadomestilo manj čistih proizvodnih obratov. Pri Schülke Koko testu so število kolonijskih enot (CFU) pred kratkim prilagodili v skladu z drugimi testnimi modeli, saj je zahteva za izdelavo kozmetičnih izdelkov zakonsko urejena po ISO 22716 (smernice DPP) (55).

Preglednica 2: Velikost vzorca, količina inokuluma, koncentracija inokuluma pri izlivnih testih

Test	Velikost vzorca	Količina inokuluma	Število MO inokulma (cfu/mL)	Število MO v KI (cfu/mL)
Ph. Eur.	Originalni vsebnik	≤ 1 %	~ 10^8	$10^5 - 10^6$
ISO 11930	20g	1%	$10^7 - 10^8$ za bakterije $10^6 - 10^7$ za glive	$10^5 - 10^6$ za bakterije $10^4 - 10^5$ za glive
Schülke Koko test	25g	0,4% ob vsaki inokulaciji	$10^7 - 10^8$ za bakterije $10^6 - 10^7$ za glive	$2,4 \times 10^5 - 2,4 \times 10^6$ za bakterije $2,4 \times 10^4 - 2,4 \times 10^5$ za glive (6 inokulacij)
USP	Originalni vsebnik	0,5 – 1,0 %	~ 10^8	~ 10^6 za bakterije ~ 10^5 za glive
ASEAN	100g	1%	~ 10^8 za bakterije ~ 10^7 za glive	~ 10^6 za bakterije ~ 10^5 za glive

Pogoji inkubacije so primerljivi pri vseh naštetih metodah. Kriteriji sprejemljivosti se za vsak test malce razlikujejo in so natančneje opisani v preglednicah 3, 4, 5 in 6 (55).

Preglednica 3: Kriteriji sprejemljivosti za Ph. Eur.

MO	KRITERIJ	LOGARITEM ZMANJŠANJA			
		R ₂	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
Bakterije	A	2	3	/	ni povečanja
	B	/	/	3	ni povečanja
Glive	A	/	/	2	ni povečanja
	B	/	/	1	ni povečanja

Preglednica 4: Kriteriji sprejemljivosti za standard ISO 11930

MIKROORGANIZEM	KRITERIJ	LOGARITEM ZMANJŠANJA		
		R ₇	R ₁₄	R ₂₈
Bakterije	A	≥ 3, ni povečanja	≥ 3, ni povečanja	≥ 3
	B	/	≥ 3	≥ 3, ni povečanja
<i>C. albicans</i>	A	≥ 1	≥ 1, NP	≥ 1, ni povečanja
	B	/	≥ 1	≥ 1, ni povečanja
<i>A. brasiliensis</i>	A	/	≥ 0	≥ 1
	B	/	≥ 0	≥ 0, ni povečanja

Preglednica 5: Kriteriji sprejemljivosti za Schülke Koko test

MIKROORGANIZEM	KRITERIJ	LOGARITEM ZMANJŠANJA					
		R ₇	R ₁₄	R ₂₁	R ₂₈	R ₃₅	R ₄₂
Bakterije	A	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
	B	≥ 3*	≥ 3*	≥ 3*	≥ 3*	≥ 3*	≥ 3*
Glive	A	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3
	B	≥ 2*	≥ 2*	≥ 2*	≥ 2*	≥ 2*	≥ 2*

*Dovoljena majhna rast bakterij do 6. inokulacije.

Preglednica 6: Kriteriji sprejemljivosti za USP

MIKROORGANIZEM	LOGARITEM ZMANJŠANJA	
	R ₁₄	R ₂₈
Bakterije	> 2	ni povečanja
Glive	ni povečanja	ni povečanja

Preglednica 7: Kriteriji sprejemljivosti za ASEAN test

MIKROORGANIZEM	LOGARITEM ZMANJŠANJA			
	R ₇	R ₁₄	R ₂₁	R ₂₈
Bakterije	> 3	ni povečanja	ni povečanja	ni povečanja
Glive	ni povečanja	ni povečanja	ni povečanja	> 1

Pri vseh omenjenih izzivnih testih opazujemo zmanjšanje števila mikroorganizmov v izbranih časovnih točkah. Pri standardu Ph. Eur. in Schülke Koko testu sta opredeljena kriterija A in B. Če kozmetični izdelek ustreza kriteriju A, je protimikrobnno zaščiten. Če pripravek izpolnjuje merila B, pa moramo analizirati obstoj kontrolnih dejavnikov, ki niso povezani z kozmetičnim izdelkom, kot je na primer zaščitna ovojnina. Če pri Schülke Koko testu vzorec ustreza kriteriju A, to pomeni, da tudi po šestem inokuliranju vzorca mikrobiološke rasti nismo opazili. Ta izdelek je smatrana kot dobro konzerviran, priporočena mikrobiološka stabilnost za kozmetične produkte je 30 mesecev. Pri Ph. Eur. učinkovitost konzerviranja kozmetičnega izdelka dokažemo s kriterijem A ali B. USP in ASEAN imata en kriterij kateremu moramo zadostiti za dosego učinkovitosti konzervansa. Najbolj striktna kriterija sta pri Schülke Koko testu in Ph. Eur.. USP se smatra kot šibki standard, zahteve so še nižje kot pri ISO 11930, ki je nov med standardi. Priporočljivo je, da test opravimo v skladu z eno od metod oblikovano za kozmetiko (55).

1.6 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV

Za dokazovanje mikrobiološke kakovosti se uporabljata testa iz Evropske farmakopeje: test na specifične mikroorganizme in test za vrednotenje skupnega števila živih aerobnih mikroorganizmov, ki smo ga uporabili v raziskavi. Test omogoča kvantitativno štetje mezofilnih bakterij in gliv, ki lahko zrastejo pod aerobnimi pogoji. Namenjen je predvsem ugotavljanju, ali snov oziroma pripravek ustreza navedenim kriterijem v skladu z uveljavljeno specifikacijo za mikrobiološko kakovost (56).

Poleg dodatka učinkovitega konzervansa so pomembni dejavniki pri nadzoru mikrobiološke rasti v kozmetičnih izdelkih tudi proces izdelave, strukturne značilnosti sestavin, ovojnina, majhna vodna aktivnost, skrbna izbira oblike emulzije in nizka ali visoka pH-vrednost. Procesi, kot so aseptična priprava izdelka, razkuževanje opreme, neokužene pomožne snovi ter ustrezeno oblečeno in usposobljeno osebje, zmanjšajo možnost okužbe z mikroorganizmi in morajo biti v skladu z dobro proizvodno prakso (DPP). DPP je del sistema doseganja kakovosti, ki zagotavlja dosledno izdelan, kontroliran in varen proizvod, ustrezen za predvideno uporabo. Standardi DPP morajo biti vedno zagotovljeni med izdelavo kozmetičnega izdelka, tudi kadar je uporabljen konzervans. Z ustreznim pakiranjem in uporabo ovojnine kot so vsebniki na potisk, brezzračne plostenke, tube za stiskanje ali enoodmernega pakiranja namesto posodic za večkratno uporabo poskrbimo za zaščito izdelka pred kontaminacijo. V kozmetičnem izdelku je zaželena čim manjša vsebnost vode, ki vpliva na rast mikrobov. Vodna aktivnost opisuje količino biološko razpoložljive vode v njem. Vodno aktivnost določimo s primerjavo parnega tlaka farmacevtske oblike in parnega tlaka tekoče vode. Zmanjšamo jo lahko z uporabo snovi, ki nase vežejo vodo. To so različni polioli, kot sta sorbitol in glicerol, soli, aminokisline ter hidrofilni polimeri. Plesni so v primerjavi z bakterijami in kvasovkami bolj tolerantne za majhno vodno aktivnost. Tudi oblika emulzije vpliva na rast mikroorganizmov, emulzija voda v olju (V/O) je manj nagnjena k mikrobiološki okužbi. Sestavljena je iz vodne notranje faze, ki jo obdaja zunanjega oljna faza, ki zaščiti izdelek pred mikroorganizmi. pH vrednost je ključni dejavnik za sposobnost preživetja mikrobov in vpliva na hitrost njihove rasti. Vsak mikroorganizem ima optimalni pH za rast. Kvasovke in plesni lažje rastejo v kislih pogojih kot bakterije, vendar pa običajno ekstremno kisi ali bazični pogoji oslabijo rast mikroorganizmov (23).

2 NAMEN DELA

Namen našega raziskovalnega magistrskega dela je v izbrani dermalni emulziji preveriti učinkovitost konzerviranja 12 različnim sestavinam naravnega izvora, ki izkazujejo protimikrobnlo delovanje. Te spojine so:

- dehidroocetna kislina in benzilalkohol v kombinaciji,
- dehidroocetna kislina,
- salicilna kislina,
- levulinska kislina,
- sorbinska kislina,
- glicerilkaprilat,
- janeževa kislina,
- fenoksiethanol,
- filtrat fermenta korenine redkvice,
- benzojska kislina,
- etanol,
- ekstrakt semen grenivke.

Prvi del bo obsegal izdelavo dermalnih emulzij z omenjenimi naravnimi sestavinami v dveh koncentracijah. Zatem bomo izvedli izzivni preizkus učinkovitosti konzerviranja po standardu ISO 11930 z dvema testnima mikroorganizmoma. Raziskovalno delo je del obsežnega testa na štirih predpisanih mikroorganizmih, mi pa bomo izvedli preizkus na plesni *A. brasiliensis* in bakteriji *S. aureus*. Rezultate bomo primerjali s kriteriji, navedenimi v standardu in ugotovili učinkovitost sestavin. Sočasno bomo uporabili Farmakopejski test 2.6.12. Mikrobiološko testiranje nesterilnih izdelkov: določanje števila mikroorganizmov, kjer bomo preverili mikrobiološko kakovost emulzij ob času izdelave in nato še po dveh mesecih na sobni temperaturi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO DERMALNE EMULZIJE

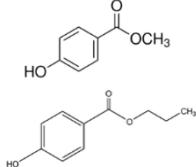
Sestavine, ki smo jih uporabili za izdelavo dermalnih emulzij (glej Preglednico 8).

Preglednica 8: Pomožne sestavine v emulziji

Sestavina/INCI	Proizvajalec	Formula	Vloga (CosIng) (57)
Karitejevo maslo/ <i>Butyrospermum Parkii Butter</i>	Dagmar Köhler		Vlaženje kože, uravnavanje viskoznosti
Mandljevo olje/ <i>Prunus Amygdalus Dulcis</i>	Ljubljanske lekarne	Trigliceridi: oleinska kislina (62–86 %), linolna kislina (20–30 %), palmitinska kislina (4–9 %)	Vlaženje kože, uravnavanje viskoznosti
Cetearil alkohol/ <i>Cetearyl Alcohol</i>	Aliacura	Cetilalkohol: C ₁₆ H ₃₃ OH Stearilalkohol: C ₁₈ H ₃₇ OH	Emolient, emulgator, stabilizator emulzije, sredstvo za penjenje in motnjenje, površinsko aktivna snov, uravnavanje viskoznosti
Cetearil glukozid/ <i>Cetearyl Glucoside</i>	Alexmo cosmetics		Emulgator, površinsko aktivna snov
Glicerol, 85%/ <i>Glycerin</i>	Dagmar Köhler		Vlažilec, maskirno sredstvo, ustna nega, zaščita kože, uravnavanje viskoznosti
Ksantan/ <i>Xanthan Gum</i>	Dragonspice Naturwaren		Stabilizator emulzij, tvorilec gela, vlažilec kože, uravnavanje viskoznosti
Prečiščena voda/Aqua	FFA	H ₂ O	Topilo

Preglednica 9: Izbrane naravne protimikrobine spojine in sintezni konzervans paraben

Naravni konzervans/INCI	Proizvajalec	Formula	Največja dovoljena koncentracija
Etanol/ <i>Alcohol Denat.</i>	Carlo Erba		ni podatka
Fenoksiethanol/ <i>Phenoxyethanol</i>	Fluka Analytical		1,0 % (22)
Benzojska kislina/ <i>Benzoic acid</i>	Caesar & Loretz		0,5 % (proizvajalec)
Salicilna kislina/ <i>Salicylic acid</i>	Kemika		0,5 % (22)
Janeževa kislina/ <i>p-Anisic acid</i>	Aldrich Chemistry		0,3 % (proizvajalec)
Levulininska kislina/ <i>Levulinic acid</i>	Sigma-Aldrich Chemie		ni podatka
Sorbinska kislina/ <i>Sorbic acid</i>	Caesar & Loretz		0,6 % (22)
Dehidroocetna kislina/ <i>Dehydroacetic acid</i>	Sigma-Aldrich Chemie		0,6 % (22)
Dehidroocetna kislina (DHA) in benzilalkohol (BA) v razmerju DHA:BA:voda = 2:22:1/ <i>Dehydroacetic acid, Benzyl Alcohol</i>	Manske GmbH		0,8 % (proizvajalec)
Glicerilkaprilit/ <i>Glyceryl Caprylate</i>	Aliacura		1,0 % (proizvajalec)
Filtrat fermenta korenine redkvice/ <i>Leuconostoc/Radish Root Ferment Filtrate</i>	Alexmo Cosmetics		2,0 % (proizvajalec)
Ekstrakt semen grenivke/Aqua, <i>Citrus Grandis Seed Extract, Glycerol</i>	Lekarne Maribor	Flavonoidi, polifenoli, vitamin C	ni podatka

Sintezni konzervans/INCI	Proizvajalec	Formula	Največja dovoljena koncentracija
Metil- in propilparaben v razmerju 7:3/ <i>Methylparaben, Propylparaben</i>	Fagron B.V, Caesar & Loretz GmbH		0,4 % za posamezen paraben in 0,8% za zmes parabenov (22)

Za uravnavanje pH v emulzijah smo uporabljali:

- mlečno kislino, 90 % (INCI: *Lactic Acid*) in
- natrijev hidrogenkarbonat, 9 % (INCI: *Sodium Bicarbonate*).

3.2 KEMIKALIJE IN REAGENTI

3.2.1 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO TESTU 2.6.12 Ph. Eur. 8.0

- Raztopina natrijevega klorida in peptona, pH 7,0

Sestava:

Kalijev dihidrogen fosfat	3,6 g
Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat	7,2 g
Natrijev klorid NaCl	4,3 g
Pepton	1,0 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Priprava: Natehtali smo sestavine ter jih raztopili. Pepton vsebuje dušik, ogljik, vitamine in minerale. Natrijev klorid ohranja osmotsko ravnotežje, natrijev fosfat ter kalijev fosfat pa sta pufra. Dodali smo še površinsko aktivno snov oziroma inaktivator protimikrobnih snovi polisorbat 80. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 min pri 121°C in 1 bar nadtlaka.

3.2.2 IZZIVNI TEST

MIKROORGANIZMA ZA PRIPRAVO INOKULUMA

- BioBall® 1.1×10^8 *A. brasiliensis* ATCC 16404, podjetja Biomerieux industry
- BioBall® 1.1×10^8 *S. aureus* ATCC 6538, podjetja Biomerieux industry

Bioball je majhna vodotopna kroglica, ki v liofilizirani obliki vsebuje natančno število mikroorganizmov. Bioball je skladen s standardom iz Evropske farmakopeje in obenem primeren za standard ISO 11930. Z uporabo Bioballa smo si prihranili čas v primerjavi s pripravo tradicionalnih raztopin, saj je enostaven za uporabo, takoj se raztopi in zagotavlja koncentracijo 10^8 CFU živih bakterij. Kroglico smo raztopili v rehidracijski raztopini BioBall Re-hydration Fluid istega proizvajalca.

- **Diluent**

Sestava:

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

Priprava: Diluent smo uporabljali za redčenje. Natehtali smo pankreasni hidrolizat kazeina (Becton, Dickinson and Company) in natrijev klorid (Emsure) ter sestavine ob segrevanju raztopili v prečiščeni vodi. Če je bilo potrebno, smo uravnali pH na $7,0 \pm 0,2$. Raztopino smo 15 min avtoklavirali v ustreznom vsebniku na 121°C in 1 bar nadtlaka.

- **Deaktivator Eugon LT 100 Broth, Biomerieux**

Sestava:

Pankreasni hidrolizat kazeina (tryptone)	15 g
Papaični hidrolizat soje (soy peptone)	5 g
Natrijev klorid	4 g
Glukoza	5,5 g
Jajčni lecitin	1 g
Polisorbat 80 (Tween)	5 g
Triton X 100®	1,0 g
Natrijev sulfit	0,2 g
L-cistein	0,7 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Priprava: Pripravljeno mešanico deaktivatorja Eugona LT 100 smo suspendirali v hladni destilirani vodi, raztopili in sterilizirali v avtoklavu na 121°C in 1 bar nadtlaka 15 min. To je medij, ki omogoča rast aerobnih in mikroaerofilnih bakterij, uporablja se kot deaktivator pri standardu ISO 11930.

GOJIŠČA

Vsa 3 gojišča smo uporabili v obliki praškastih zmesi, kot so navedene spodaj. Prašek za pripravo gojišča smo raztopili v prečiščeni vodi in avtoklavirali pri 121 °C, 1 bar nadtlaka za 15 min. Gojišče je pripravljeno za uporabo, ko je ohlajeno na 48 °C.

- **Triptični soja agar (TSA), Biomerieux**

Sestava:

Pankreasni hidrolizat kazeina	15 g
Papainski hidrolizat soje	5 g
Natrijev klorid	5 g
Agar	15 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

pH po sterilizaciji je moral biti $7,3 \pm 0,2$.

- **Sabouraudovo gojišče z dekstrozo (SDA), Biomerieux**

Sestava:

Pepton A	5 g
Pepton B	5 g
Glukoza	40 g
Agar	15 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Dodali smo še 50 mg/L kromafenikola. pH po sterilizaciji je moral biti $5,6 \pm 0,2$.

- **Krompirjev glukozni agar (PDA), Carl Roth**

Sestava:

Poparek krompirja	4 g
Glukoza	20 g
Agar	15 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

pH po sterilizaciji je moral biti $5,6 \pm 0,2$.

LABORATORIJSKA OPREMA

- Tehnica Exacta 610 EB
- Tehnica Sartorius AX4202
- Analitska tehnica, Mettler Toledo
- pH meter s stekleno elektrodo – 691 pH Meter Metrohm
- pH lističi pH-Fix 0–14 Nacherey-Nagel
- Grelnik Končar
- Palični mešalnik Bosch 500 W
- Vodna kopel in ledena kopel
- Patene in pestila
- Vrelnik vode
- Zaščitna mikrobiološka komora LAF
- Elektronski parni avtoklav Kambič A–63 CV
- Elektronski parni avtoklav Systec 2540 EL
- Vrtinčno mešalo Vibromix
- Magnetno mešalo
- Hladilnik (4 °C–8 °C)
- Zmrzovalnik
- Kadička za segrevanje (60 °C)
- Inkubator WTB Binder
- Avtomatske pipete in nastavki
- Tipsi Biosphere Filter tips 100–1000, 2–200 in 0,1–10 mikrol
- Mešalna plošča Rotamix 606 MM

Poleg omenjenih aparatur smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: pipete za enkratno uporabo, merilni valj, več vrst čaš, falkonke, laboratorijske steklenice, kapalke, parafilm, steklovino, čolničke za zatehtanje, spatule, aluminijasto folijo, papirnate brisače. Za zaščito pri delu smo poskrbeli z zaščitnimi rokavicami in zaščitno haljo.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 IZDELAVA DERMALNE EMULZIJE Z RAZLIČNIMI SESTAVINAMI NARAVNEGA IZVORA

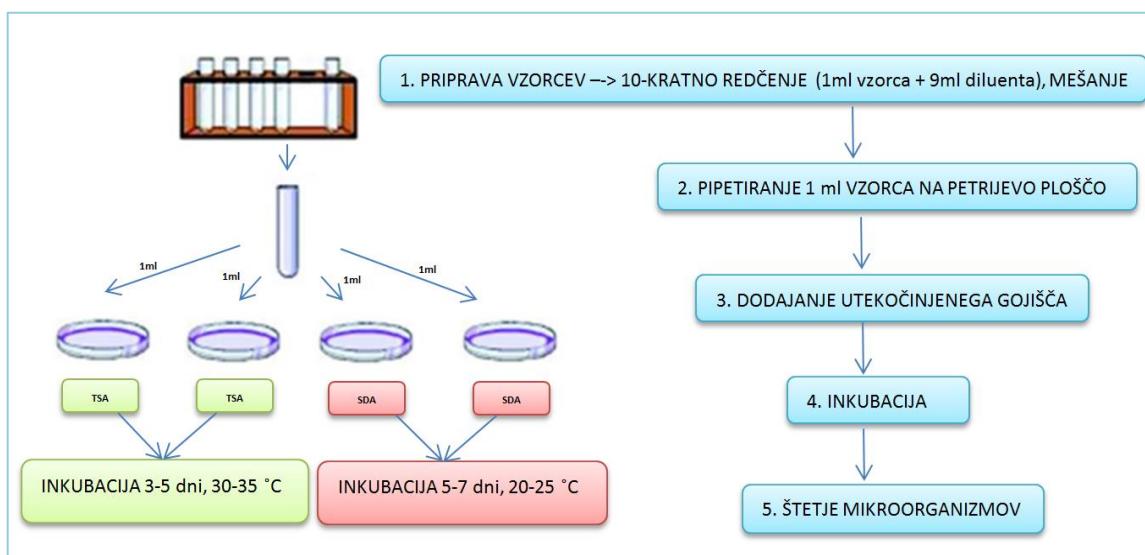
Natehtali smo sestavine oljne faze: karitejevo maslo, mandljevo olje in cetearil alkohol ter jih prenesli v pateno in segrevali na vodni kopeli. V drugi pateni smo pripravili vodno fazo. Natehtali smo cetearil glukozid ter ga raztopili v malo hladne prečiščene vode. Ko se je popolnoma raztopil, smo dodali še preostanek prevrete prečiščene vode. Tudi vodno fazo smo segreli na vodni kopeli. Tako vodno kot oljno fazo smo vmes večkrat premešali ter se prepričali, da so se vse sestavine dobro raztopile. Ko smo ju segreli na enako temperaturo, smo oljno fazo zlili v vodno. Nastalo emulzijo smo postavili na ledeno kopel in jo s paličnim mešalnikom mešali vsaj 2 minuti. Natehtali smo še glicerol in ksantan, ju premešali in dodali ohlajeni združeni emulziji vodne in oljne faze. Če je konzervans topen v vodi, smo ga dodali čisto na koncu, če pa je topen v lipofilni fazi, pa smo ga v oljno fazo umešali že na začetku. Dermalna emulzija je bila končana, ko je nastala homogena bela zmes. S pH lističi smo izmerili ustreznost pH izdelane emulzije. Če je bila ta preveč bazična, nad 6, smo jo uravnali z 90 % mlečno kislino, če je bila preveč kisla, pod vrednostjo 5,5, pa smo dodali nekaj kapljic 9 % natrijevega hidrogenkarbonata in zopet preverili pH. Emulzijo smo razdelili v sterilne vsebnike in jih hrаниli v hladilniku. Za vse emulzije smo uporabili isto sestavo, spremajali smo le količino naravnega konzervansa in posledično količino prevrete prečiščene vode. Uporabili smo minimalne dovoljene in polovične vrednosti maksimalno (v nadaljevanju velike koncentracije) dovoljenih koncentracij sestavin, ki so določene v Uredbi ali v navedbah proizvajalcev. Izdelali smo 12 emulzij z majhno, 12 z veliko koncentracijo in 4 kontrole. Prva kontrola je bila dermalna emulzija brez konzervansa, ostale so kombinacija metil in propilparabena (v razmerju 7:3) v koncentracijah 0,1 %, 0,4 % in 0,8 %. V preglednici 10 so prikazani deleži uporabljenih sestavin, v prilogi 1 pa se nahajajo natančne recepture vseh izdelanih emulzij.

Preglednica 10: Sestava dermalnih emulzij v 100 g

	Karitejevo maslo	2 %
OLJNA FAZA	Mandljevo olje	11 %
	Cetearil alkohol	0,5 %
	Cetearil glukozid	0,8 %
VODNA FAZA	Glicerol	5 %
	Ksantan	0,6 %
	Voda	
OSTALO	Naravni konzervans	80,1 %

4.2 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO Ph. Eur. TESTU 2.6.12

Dermalne emulzije smo mikrobiološko vrednotili s testom iz Evropske farmakopeje 2.6.12., ki določa celokupno število živih aerobnih mikroorganizmov in celokupno število kvasovk in plesni v enem gramu kozmetičnega izdelka. Za spremljanje rasti mikroorganizmov smo izbrali metodo štetja kolonij v trdnem gojišču na petrijevih ploščah. Farmakopeja predpisuje, da pripravimo 10-kratne redčitve izdelka. Natehtali smo 2 g vzorca in ga redčili z 2 mL raztopine natrijevega klorida in peptona s pH 7. Tako smo pripravili 2-kratno redčenje. Iz raztopine z 2-kratnim redčenjem smo vzeli 1 mL in redčili s 4 mL raztopine natrijevega klorida in peptona s pH 7 ter dobili 10-kratno redčitev. V prazno, sterilno petrijevko smo odpipetirali 1 mL vsake redčitve vzorca. Dodali smo 20 mL utekočinjenega trdnega gojišča, ohlajenega na 45 °C, ter vsebino petrijevke s krožnimi gibi nežno premešali. Metodo umešanja petrijevih plošč smo izvedli v dveh paralelah za vsakega od 28 vzorcev in vsako od obeh redčitev. Za štetje bakterij smo petrijevke z gojiščem TSA po strditvi gojišča inkubirali 5 dni pri 30–35 °C, za štetje kvasovk in plesni pa petrijevke z gojiščem SDA 7 dni pri 20–25 °C. Test smo naredili nekaj dni po izdelavi emulzij in ga ponovili po 2 mesecih shranjevanja v zaprtem vsebniku na sobni temperaturi.



Slika 11: Prikaz postopka testa po Ph. Eur. 2.6.12 z metodo štetja kolonij v trdnem gojišču

4.3 IZZIVNI TEST PO STANDARDU ISO 11930

4.3.1 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA

Sev *A. brasiliensis* v obliki Bioballa smo raztopili v 1 mL rehidracijske raztopine in dobili $1,1 \times 10^8$ cfu/mL. Del testnega mikroorganizma smo porabili za izzivni test, iz ostanka pa smo pripravili ustrezeno redčitveno vrsto do predpisanega inokuluma s koncentracijo mikroorganizmov 10^3 cfu/mL.

- Za kontrolo viabilnosti inokuluma ob prisotnosti emulzije smo natehtali 1 g vzorca kozmetičnega izdelka in mu dodali 9 mL deaktivatorja Eugona LT 100. Premešali smo, da se je vzorec raztopil. Sterilne plastične vsebnike smo inkubirali na sobni temperaturi 30 ± 15 min. Nato smo testne sterilne plastične vsebnike inkubirali z 1 mL pripravljenega inokuluma (Nvf).

- Vzporedno smo pripravili tudi kontrolo viabilnosti inokuluma brez emulzije, tako da smo 1 g vzorca, nadomestili z 1 mL diluenta. Premešali smo, da se je vzorec raztopil. Sterilne plastične vsebnike smo inkubirali na sobni temperaturi 30 ± 15 min. Nato smo testne sterilne plastične vsebnike inkubirali z 1 mL pripravljenega inokuluma (Nvn).

- Kontrolo števila viabilnih mikroorganizmov smo pripravili tako, da smo 1 mL inokuluma dodali 10 mL diluenta in premešali (Nv).

Preglednica 11: Priprava vzorcev za test učinkovitosti deaktivatorja

Število viabilnih mikroorganizmov v deaktivatorju z dodanim kozmetičnim izdelkom, Nvf	vzorec 1 mL	deaktivator 9 mL	inokulum 1 mL	11 mL
Število viabilnih mikroorganizmov v deaktivatorju brez kozmetičnega izdelka, Nvn	diluent 1 mL	deaktivator 9 mL	inokulum 1 mL	11 mL
Kontrola števila viabilnih mikroorganizmov, Nv	diluent 10 mL	/	inokulum 1 mL	11 mL

1 mL vsakega od vzorcev smo v dveh paralelah nanesli na prazno, sterilno petrijevko in prelili s 15–20 mL gojišča PDA. Inkubirali smo pri $22,5 \pm 2,5$ °C 3 do 5 dni. Test smo ponovili tudi za *S. aureus*. Postopek dela je bil identičen, razlikoval se je le v tem, da smo uporabili gojišče TSA in inkubirali pri $32,5 \pm 2,5$ °C 48 ur do 72 ur.

4.3.2 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

Preizkus smo ločeno izvajali najprej za sev *A. brasiliensis*, nato pa še za *S. aureus*.

- PRIPRAVA VZORCEV

V 50 mL sterilne plastične vsebnike smo natehtali 20 g vsake od 28 testnih emulzij s sestavinami naravnega izvora.

- PRIPRAVA INOKULUMA IN INOKULACIJA VZORCEV

Pripravo inokuluma smo si pri našem delu malce priredili in olajšali, saj nam ni bilo potrebno pripraviti suspenzije. Naredili smo rahlo modifikacijo postopka in za inokulum vzeli pripravljene mikroorganizme v obliki Bioballa.

Sev *A. brasiliensis* v obliki Bioballa smo raztopili v 1,1 mL rehidracijske raztopine ter v stekleni viali dobili $1,1 \times 10^8$ cfu/mL. Glede na predpis v standardu ISO 11930 smo izračunali število mikroorganizmov, ki jih moramo dodati testni emulziji, da je koncentracija v inokuliranem produktu ustrezala pogoju. Pri *A. brasiliensis* je predpisana koncentracija med 1×10^4 cfu/mL in 1×10^5 cfu/mL. Inokulirali smo 1×10^5 cfu/mL. 600 µl osnovne raztopine $1,1 \times 10^8$ smo redčili 10-krat s 5400 µl diluenta in dobili 6 mL *A. brasiliensis* s koncentracijo $1,1 \times 10^7$ cfu/mL, ki smo jih potrebovali za inokulacijo 28 vzorcev. V vsak vsebnik smo dodali 200 µl te raztopine inokuluma, koncentracija v vzorcu je bila $1,1 \times 10^5$ cfu/mL.

Sev *S. aureus* v obliki Bioballa smo raztopili v 1,1 mL rehidracijske raztopine ter v stekleni viali dobili $1,1 \times 10^8$ cfu/mL. Predpisana koncentracija je med 1×10^5 in 1×10^6 cfu/mL. Ker dodajamo 100-krat manjšo koncentracijo, potrebujemo med 1×10^7 in 1×10^8 cfu/mL. 960 µl osnovne raztopine $1,1 \times 10^8$ cfu/mL smo redčili z 8640 µl diluenta in dobili 9,6 mL *S. aureus* z $1,6 \times 10^7$ cfu/mL. V vsak vsebnik smo dodali 200 µl te raztopine inokuluma, koncentracija v vzorcu je bila $1,6 \times 10^5$ cfu/mL.

Vsebnike z inokulumom smo dobro premešali, da smo dosegli homogeno vmešanje v izdelek.

- INKUBACIJA IN VZORČENJE

Sterilne vsebnike z inokulirano emulzijo smo zaprte in zaščitene pred svetlobo inkubirali pri $22,5 \pm 2,5$ °C. Le-te smo nato po predpisu standarda ISO 11930 vzorčili v določenih intervalih, v 7 dneh (T_7), 14 dneh (T_{14}) in 28 dneh (T_{28}). Vzeli smo 1 g inokulirane

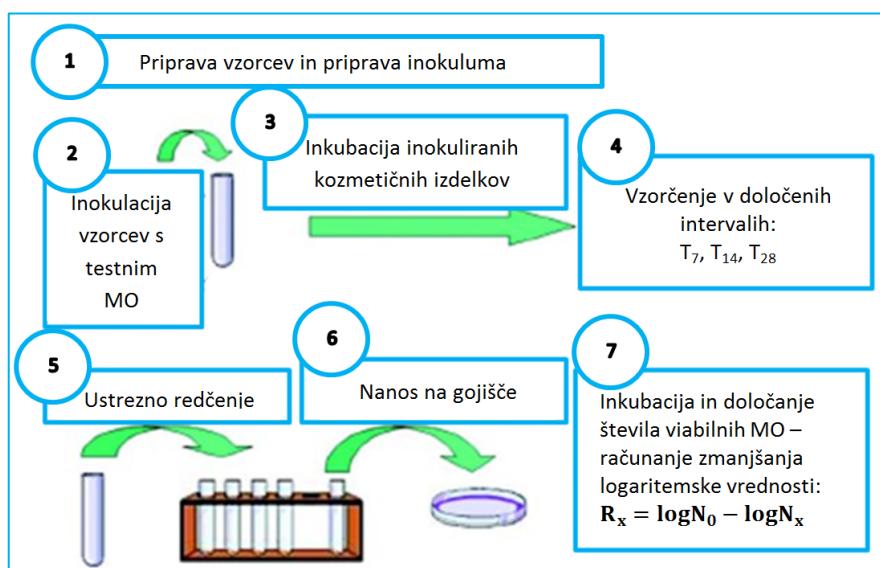
emulzije, dodali 9 mL deaktivatorja, premešali do homogene zmesi in jo pustili stati na sobni temperaturi (30 ± 15 min). Da smo na petrijevkah dobili ustrezeno število CFU, smo naredili ustrezne redčitve v deaktivatorju in diluentu glede na določitev učinkovitosti deaktivatorja. V kasnejših časovnih intervalih smo prilagajali redčenje glede na rast mikroorganizmov. 1 mL ustrezne redčitve naše testne emulzije smo odpipetirali na sterilne petrijevke in nalili 20 mL gojišča. Gojišča smo avtoklavirali in pustili na vodni kopeli, da so ostala tekoča. Temperatura gojišča je bila pod 48°C , saj se je pod 40°C gojišče začelo strjevati, nad 50°C pa bi lahko prišlo do uničenja mikroorganizmov. Emulzijo smo s krožnimi gibi pazljivo zmešali z gojiščem ter pustili, da se ohladi. Vsako redčitev smo nanesli na gojišče v dveh paralelah.

Petrijevke inkubiramo pri

- *Aspergillus brasiliensis* ($22,5 \pm 2,5$) $^{\circ}\text{C}$ 3 do 5 dni. Uporabili smo gojišče PDA;
- *Staphylococcus aureus* ($32,5 \pm 2,5$) $^{\circ}\text{C}$ 48 do 72 ur. Uporabili smo gojišče TSA.

- DOLOČANJE ŠTEVILA VIABILNIH MIKROORGANIZMOV

Po inkubaciji smo prešteli število preživelih CFU na petrijevkah in izračunali zmanjšanje logaritemske vrednosti za vsak mikroorganizem posebej. Po standardu ISO 11930 mora na plošči zrasti med 15 do 150 kolonij pri *A. brasiliensis* ter med 30 in 300 kolonij za *S. aureus*. Z ocenjevalnim kriterijem za test učinkovitosti konzervansov standarda ISO 11930 smo določili ustreznost konzervansov.



Slika 12: Prikaz postopka izzivnega preizkusa

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST NESTERILNIH FARMACEVTSKIH IZDELKOV PO TESTU 2.6.12 Ph. Eur. 8.0

Mikrobiološko kakovost nesterilnih izdelkov smo izvajali v skladu z metodami, opisanimi v poglavjih 2.6.12. trenutno veljavne Evropske Farmakopeje 8.0. Skupno število aerobnih mikroorganizmov na mL izdelka (*total aerobic microbial count – TAMC*) določimo na trdnem gojišču TSA iz povprečnega števila kolonij na dveh paralelnih petrijevkah. Če so prisotne tudi kolonije kvasovk in plesni, jih prištejemo k TAMC. Skupno število kvasovk in plesni na mL izdelka (*total yeast/moulds count – TYMC*) določimo na gojišču SDA iz povprečnega števila kolonij na dveh paralelnih petrijevkah. Če so prisotne kolonije bakterij, jih prištejemo k TYMC.

V prejšnjih izdajah Evropske farmakopeje je bil ta test nekoliko drugačen, rezultat testa je temeljal na vsoti povprečnega števila kolonij na dveh paralelnih ploščah gojišča TSA in povprečnega števila kolonij na dveh paralelnih ploščah gojišča SDA. Tudi kriterij sprejemljivosti za mikrobiološko kakovost nesterilnih vodi topnih izdelkov za dermalno uporabo je bil drugačen, in sicer seštevek iz obeh gojišč ni smel preseči največjega sprejemljivega števila 500 cfu/g ali cfu/mL.

Novi predpis ločeno obravnava bakterije in glive. Kriterija sprejemljivosti za mikrobiološko kakovost nesterilnih vodi topnih izdelkov za dermalno uporabo:

TAMC 10^2 CFU: največje sprejemljivo število = 200 cfu/g ali cfu/mL,

TYMC 10^1 CFU: največje sprejemljivo število = 20 cfu/g ali cfu/mL.

V preglednici 12 je podana ocena skupnega števila viabilnih mikroorganizmov (TAMC in TYMC) v 1 mL emulzije ob času, ko je bil dermalni pripravek narejen (T_0) in po 2 mesecih shranjevanja ($T_{2\text{mes}}$). V prilogi 2 je podana tabela, ki prikazuje natančno število kolonij, ki so zrasle na trdnih gojiščih TSA in SDA ob času izdelave in po 2 mesecih. Farmakopeja predpisuje pripravo 10-kratnega redčenja, glede na pričakovano rast mikroorganizmov pa lahko uporabimo tudi drugačne redčitve (56). Predvidevali smo, da bo zraslo malo mikroorganizmov, zato smo najprej redčili 2-kratno.

Preglednica 12: Ocena skupnega števila viabilnih mikroorganizmov v 1 mL emulzije ob času izdelave in po 2 mesecih

KONZERVANS	T₀		T_{2mes}	
	TAMC (cfu/mL)	TYMC (cfu/mL)	TAMC (cfu/mL)	TYMC (cfu/mL)
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	0	0	0	0
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	0	0	0	0
0,13 % BENZOJSKA K.	0	0	0	0
0,25 % BENZOJSKA K.	0	0	0	0
0,3 % GLICERILKAPRILAT	0	0	5	0
0,5 % GLICERILKAPRILAT	1	0	0	0
14 % ETANOL	0	0	10	0
17 % ETANOL	0	0	0	0
0,15 % SORBINSKA K.	1	0	0	0
0,3 % SORBINSKA K.	0	0	5	5
0,13 % SALICILNA K.	0	0	0	0
0,25 % SALICILNA K.	0	0	90	0
0,2 % LEVULINSKA K.	0	0	20	0
0,25 % LEVULINSKA K.	5	0	0	0
0,25 % FENOKSIETANOL	0	0	0	5
0,5 % FENOKSIETANOL	5	0	5	0
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	5	0	5	1
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	25	0	0	1
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	0	0	0	0
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	0	0	5	0
0,05 % JANEŽEVA K.	5	0	0	0
0,15 % JANEŽEVA K.	0	0	0	0
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	0	0	0	0
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	30	0	0	5
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	5	0
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	0
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	0
BREZ KONZERVANSA	10	0	5	0

Vse vrednosti ustrezajo farmakopejskemu predpisu, TAMC ne sme preseči 200, TYMC pa 20 cfu/g ali mL. Tako po izdelavi smo določili od 1–5 aerobnih mikroorganizmov v kozmetičnih izdelkih, ki so vsebovali 0,5-odstotni glicerilkaprilat, 0,15-odstotno sorbinsko kislino, 0,25-odstotno levulinsko kislino (slika 13), 0,5-odstotni fenokisetanol, 0,2-odstotno kombinacijo dehidroacetne kisline in benzilalkohola in 0,05-odstotno janeževe kislino. Od 10–30 aerobnih organizmov na mL izdelka smo določili v izdelkih z 0,4-odstotno vsebnostjo kombinacije dehidroacetne kisline in benzilalkohola, 0,3-odstotno dehidroacetno kislino ter emulziji brez konzervansa. Po shranjevanju na sobni temperaturi po 2 mesecih smo določili 5–10 aerobnih mikroorganizmov v emulzijah s 0,3-odstotnim glicerilkaprilatom, 14-odstotnim etanolom, 0,3-odstotno sorbinsko kislino, 0,5-odstotnim fenoksietanolom, 0,2-odstotno dehidroacetno kislino in benzilalkoholu, 0,5-odstotnim filtratom fermenta korenine redkvice, 0,8-odstotnim parabenom ter emulziji brez konzervansa. Porast smo opazili po 2 mesecih pri izdelkih z 0,25-odstotno salicilno kislino in 0,2-odstotno levulinsko kislino. Koncentracija aerobnih mikroorganizmov je bila 20 cfu/mL v izdelku z 0,2-odstotno levulinsko kislino in 90 cfu/mL v izdelku z 0,25-odstotno salicilno kislino. Na splošno je bila koncentracija aerobnih mikroorganizmov (TAMC) v vseh izdelkih nizka in tudi izdelka, pri katerih se je koncentracija po dveh mesecih povečala, ustreza kriteriju sprejemljivosti. Pri določanju TYMC na gojišču SDA ob času 0 ni zrasla niti ena kolonijska enota, po 2 mesecih na sobni temperaturi pa je bilo 1–5 kvasovk in plesni na mL izdelka v emulzijah, ki so vsebovale 0,3-odstotno sorbinsko kislino, 0,25-odstotni fenoksietanol (slika 14), višjo in nižjo koncentracijo zmesi dehidroacetne kisline in benzilalkohola ter 0,3-odstotno dehidroacetno kislino. Iz rezultatov je razvidno, da se število plesni in kvasovk po shranjevanju po 2 mesecih ni povečalo. Organoleptičnih sprememb po 2 mesecih v emulzijah nismo opazili.



Slika 13: Vzorec z veliko vsebnostjo levulininske kisline ob času T_0



Slika 14: Vzorec z majhno vsebnostjo fenoksietanola ob času $T_{2\text{mes}}$

Mikrobiološka kontrola farmacevtskih izdelkov je v farmacevtski industriji pomemben del zagotavljanja kakovosti (58). Kljub temu, da priprava emulzij ni potekala v aseptičnih pogojih, smo pazili, da smo v izdelek vnesli čim manjše število mikroorganizmov. Z doslednim izvajanjem DPP smo se trudili preprečiti mikrobnno kontaminacijo v emulzijah. Za izdelavo naših emulzij smo uporabili vodo, prečiščeno z reverzno osmozo, ki smo jo še dodatno prekuhali. Tehtanje vzorcev smo izvajali na pultu, redčenje in pripravo gojišč pa v komori z laminarnim pretokom zraka. Pri izdelkih z 0,25-odstotno salicilno kislino in 0,2-odstotno levulinsko kislino se pojavi rahlo povečanje števila mikroorganizmov. Najverjetneje so mikroorganizmi bili prisotni v spojinah samih in smo jih vnesli ob dodatku spojin. Spojine pridobljene z izolacijo iz bioloških materialov so problematične iz vidika samega izvora, načina pridobivanja in pogojev shranjevanja. Še pred izdelavo kozmetičnih izdelkov je smiselno preveriti mikrobiološko kakovost surovin (58) in se s tem izogniti nezaželenemu vnosu v izdelek.

Glede na majhno koncentracijo mikroorganizmov v vseh vzorcih, ki ni presegla predpisanih, lahko zaključimo, da je bil potek in način izdelave v skladu z DPP. S testiranjem mikrobiološke kakovosti smo dokazali kvalitetno izdelavo emulzij.

5.2 IZZIVNI TEST PO STANDARDU ISO 11930

5.2.1 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI DEAKTIVATORJA

Test, ki ugotavlja učinkovitost deaktivacije konzervansa s predpisanim deaktivatorjem Eugon LT 100, smo naredili za vsak izdelek z večjo koncentracijo konzervansa ob predpostavki, da ugotovljena učinkovitost za velike koncentracije velja tudi za majhne. Primernost in učinkovitost deaktivatorja smo dokazovali ločeno za dva testna mikroorganizma, *A. brasiliensis* in *S. aureus*. Deaktivator, ki ga predpisuje standard ISO 11930, je Eugon LT 100. Po predpisu ISO 11930 je deaktivator učinkovit, če se število v inokulumu prisotnih viabilnih mikroorganizmov po 30 do 45 minutah inkubacije v deaktivatorju z dodanim kozmetičnim izdelkom (Nvf) ni zmanjšalo za več kot pol v primerjavi s številom viabilnih mikroorganizmov v deaktivatorju brez kozmetičnega izdelka (Nvn), le-ta pa se ne razlikuje od kontrolnega števila viabilnih mikroorganizmov (Nv), ki smo ga pripravili v diluentu. Število viabilnih mikroorganizmov smo izračunali iz povprečnega števila kolonij na dveh paralennih gojiščih. Število viabilnih mikroorganizmov Nv in Nvn smo določili iz povprečnega števila kolonij na štirih paralelnih petrijevkah. Podatki so prikazani v preglednici 13.

Preglednica 13: Rezultati kontrole učinkovitosti deaktivatorja

KONZERVANS	<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	število viabilnih MO v mL	število viabilnih MO v mL	povp. št. viabilnih MO v mL	število viabilnih MO v mL	število viabilnih MO v mL	povp. št. viabilnih MO v mL
	1. plošča	2. plošča		1. plošča	2. plošča	
EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	103	109	106 ± 3	0	0	0
BENZOJSKA K.	106	105	105,5 ± 0,5	45	45	45 ± 0
GLICERILKAPRILAT	113	113	113 ± 0	34	33	33,5 ± 0,5
ETANOL	120	115	117,5 ± 2,5	46	48	47 ± 1
SORBINSKA K.	105	120	112,5 ± 7,5	42	33	37,5 ± 4,5
SALICILNA K.	112	120	116 ± 4	35	33	34 ± 1
LEVULINSKA K.	130	106	118 ± 12	31	33	32 ± 1
FENOKISETANOL	108	104	106 ± 2	47	36	41,5 ± 5,5
DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	111	107	109 ± 2	41	42	41,5 ± 0,5
FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	107	106	106,5 ± 0,5	0	0	0
JANEŽEVA K.	94	90	92 ± 2	37	33	35 ± 2
DEHIDROOCETNA K.	83	81	82 ± 1	39	40	39,5 ± 0,5
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	100	102	101 ± 1	30	27	28,5 ± 1,5
Nvn ₁	66	76	74,75 ± 5,45	36	29	38,5 ±
Nvn ₂	76	81		47	42	6,73
Nv ₁	89	86	85,75 ± 2,49	42	40	36,5 ± 5,0
Nv ₂	82	86		29	35	

MO ... mikroorganizem

Nvf ... število viabilnih MO v deaktivatorju z dodanim kozmetičnim izdelkom

Nvn ... število viabilnih MO v deaktivatorju brez kozmetičnega izdelka

Nv ... kontrola števila viabilnih mikroorganizmov

Število mikroorganizmov v inokulumu (Nv), ki smo ga inkubirali v diluentu, in inokulumu v deaktivatorju brez kozmetičnega izdelka (Nvn) je pri *A. brasiliensis* približno enako,

74,75 in 85,75 cfu v mL. Nvf je v vseh kozmetičnih izdelkih z različnimi konzervansi večji od polovične vrednosti Nvn. Pri *A. brasiliensis* smo dokazali učinkovitost deaktivacije desetkrat redčenih izdelkov z različnimi konzervansi, saj vrednosti ustrezajo standardu ISO 11930.

Ugotovili smo, da deaktivator Eugon LT100 ni bil dovolj učinkovit pri deaktivaciji protimikrobnega delovanja izvlečka semen grenivke in filtrata fermenta korenine redkvice na *S. aureus*. V takih primerih standard ISO 11930 predpisuje zamenjavo deaktivatorja ali pa nadaljnje redčenje vzorca v deaktivatorju namesto v diluentu. Pri vseh ostalih konzervansih smo dokazali učinkovitost deaktivacije protimikrobnega delovanja, saj so vrednosti Nvf povsod večje od polovične vrednosti Nvn. Vrednosti Nv in Nvn pa sta prav tako podobni, 38,5 in 36,5. Dokazali smo, da je Eugon LT 100 sposoben deaktivirati protimikrobeno delovanje različnih spojin na *S.aureus* v naših emulzijah.

Pokazali smo tudi, da deaktivator sam po sebi ne vpliva na rast mikroorganizmov *S. aureus* in *A. brasiliensis*. Pri vseh nadalnjih testih izdelkov z ekstraktom semen grenivke in filtratom fermenta korenine redkvice smo naredili dodatno 10-kratno redčitev v deaktivatorju.

5.2.2 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

Po sedmih (T_7), štirinajstih (T_{14}) in osemindvajsetih (T_{28}) dneh smo iz inokuliranih emulzij odvzeli 1 g vzorca in v njem določili koncentracijo mikroorganizmov. Pripravili smo ustrezne redčitve vzorcev glede na kriterije standarda in pričakovan upad mikroorganizmov. Z upoštevanjem redčenja in povprečnega števila kolonij na obeh paralelnih gojiščih smo določili koncentracijo cfu/mL v emulzijah. Po končanem testu smo izračunali logaritemsko zmanjšanje mikroorganizmov po enačbi:

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

Enačba 1: Izračun logaritemskega zmanjšanja mikroorganizmov

N_0 ... koncentracija inokuliranih mikroorganizmov v emulzijo ob času T_0 $\frac{cfu}{mL}$

N_x ... koncentracija preživelih mikroorganizmov v inokulirani emulziji ob času T_x $[cfu/mL]$

R_x ... logaritemsko zmanjšanje koncentracije kolonij ob času T_x

V preglednici 14 so podani kriteriji standarda ISO 11930, v preglednicah 15 in 16 pa logaritemsko zmanjšanje koncentracije mikroorganizmov v testiranih kozmetičnih izdelkih. Prilogi 3 in 4 prikazujeta povprečno število preživelih kolonij *A. brasiliensis* in *S. aureus*, ki so zrasle na PDA oziroma TSA gojiščih po 7, 14 in 28 dneh po inokulaciji. Podatki izračunov zmanjšanja logaritemsko vrednosti so podani v prilogi 5. Konzervans je učinkovit, če se število mikroorganizmov med preizkusom značilno zmanjša ali se ne poveča. Opredeljena sta kriterija A in B. Če je vzorec na koncu izzivnega testa v skladu s kriterijem A, kozmetični izdelek štejemo za zaščitenega proti mikrobiološkemu kvarjenju. Kriterij B je manj strog kot kriterij A in ga uporabljamo le, kadar obstajajo drugi dejavniki, ki niso povezani z emulzijo, kot so značilnosti zaščitne ovojnинe, ki lahko zmanjšajo možnost kontaminacije z mikroorganizmi (54).

Preglednica 14: Kriteriji standarda ISO 11930 za *A. brasiliensis* in *S. aureus*

Mikroorganizem	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
Inkubacijski čas	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
Kriterij A	/	≥ 0 ^c	≥ 1
Kriterij B	/	≥ 0	≥ 0 in NP
Mikroorganizem	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Inkubacijski čas	R ₇	R ₁₄	R ₂₈
Kriterij A	≥ 3	≥ 3 in NP ^b	≥ 3 in NP
Kriterij B	Ne izveden	≥ 3	≥ 3 in NP
Zmanjšanje logaritemsko vrednosti ^a : $R_x = \log N_0 - \log N_x$			
a V tem testu je sprejeto območje odstopanja 0,5 log			
b NP: ni povečanja v štetju od prejšnje časovne točke			
c R _x =0 ko je logN ₀ = logN _x			

A. brasiliensis: Da izdelek ustreza zahtevam, navedenim v prilogi B standarda ISO 11930, po 14 dneh ne sme priti do povečanja števila mikroorganizmov glede na časovno točko T₀, po 28 dneh pa mora priti do upada števila mikroorganizmov za 1 logaritemsko enoto. Kriteriju B emulzija ustreza, če po 14 dneh ni povečanja števila mikroorganizmov glede na časovno točko T₀ in po 28 dneh ni rasti mikroorganizmov glede na prejšnjo časovno točko.

S. aureus: Število mikroorganizmov se mora zmanjšati za vsaj 3 logaritemskie enote, po 14 in 28 dneh mora biti dosežen še en kriterij, ne sme priti do povečanja števila glede na prejšnje štetje. Izdelek izpolnjuje kriterij B, če je po 14 dneh zmanjšanje števila za vsaj 3 logaritemskie enote in po 28 dneh ni povečanja števila mikroorganizmov glede na prejšnje štetje ter je zmanjšanje mikroorganizmov 3 logaritemskie enote.

Preglednica 15: Rezultati izzivnega testa z *A. brasiliensis* za kozmetične izdelke z različnimi konzervansi

KONCENTRACIJA KONZERVANSA	Zmanjšanje logaritemske vrednosti			USTREZNOST KRITERIJA
	R ₇	R ₁₄	R ₂₈	
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,13 % BENZOJSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,25 % BENZOJSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,3 % GLICERILKAPRILAT	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,5 % GLICERILKAPRILAT	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
14 % ETANOL	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
17 % ETANOL	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,15 % SORBINSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,3 % SORBINSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,13 % SALICILNA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,25 % SALICILNA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,2 % LEVULINSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,25 % LEVULINSKA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,25 % FENOKSIETANOL	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,5 % FENOKSIETANOL	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	≥ 0	≥ 0	0,6 ^a	Kriterij A
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,05 % JANEŽEVA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,15 % JANEŽEVA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A
BREZ KONZERVANSA	≥ 0	≥ 0	≥ 1	Kriterij A

a-vrednosti, kjer smo upoštevali 0,5 logaritemsko odstopanje

Preglednica 16: Rezultati izzivnega testa s *S. aureus* za kozmetične izdelke z različnimi konzervansi

KONCENTRACIJA KONZERVANSA	Zmanjšanje logaritemske vrednosti			USTREZNOST KRITERIJA
	R ₇	R ₁₄	R ₂₈	
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,13 % BENZOJSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,25 % BENZOJSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,3 % GLICERILKAPRILAT	>3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,5 % GLICERILKAPRILAT	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
14 % ETANOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
17 % ETANOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,15 % SORBINSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,3 % SORBINSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,13 % SALICILNA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,25 % SALICILNA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,2 % LEVULINSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,25 % LEVULINSKA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,25 % FENOKSIETANOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,5 % FENOKSIETANOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,05 % JANEŽEVA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,15 % JANEŽEVA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A
BREZ KONZERVANSA	≥ 3	≥ 3 in NP	≥ 3 in NP	Kriterij A

Raziskovali smo, če so uporabljene naravne spojine učinkovite pri konzerviranju naše izdelane emulzije. Izzivni preizkus smo izvedli s *S. aureus* in *A. brasiliensis*. V prilogi 6 so zbrani podatki o število kolonijskih enot v 1 mL kozmetičnega izdelka, ki smo ga ocenili iz štetja kolonij na petrijevkah 7, 14 in 28 dni po inokulaciji.

Vsi izdelki z različnimi konzervansi, ne glede na to ali so vsebovali večjo ali manjšo koncentracijo, so v izzivnem testu z *A. brasiliensis* po standardu ISO 11930 ustrezali kriteriju A. Kriteriju A je ustrezal tudi izdelek, kateremu konzervansa nismo dodali. Po 7 dneh inkubacije vzorca emulzije brez konzervansa, ki je bil inokuliran s sevom *A. brasiliensis*, smo določili 6250 cfu/mL. V 28 dneh je viden padec mikroorganizmov na 1000 cfu/mL. Tabela s podatki o številu kolonijskih enot v 1 mL kozmetičnega izdelka, ki smo ga ocenili iz štetja kolonij na petrijevkah ob različnih točkah se nahaja v prilogi 6. Podrobna primerjava števila preživelih mikroorganizmov sedem dni po inokulaciji razkrije posamezne razlike. Največji padec mikroorganizmov v prvih 7 dneh je viden pri obeh koncentracijah benzojske kisline, etanola, sorbinske, salicilne kisline in dehidroocetne kisline ter 0,5-odstotnem ekstraktu semen grenivke in 0,2-odstotni levulinski kislini. V 1 mL izdelka je ostalo le še med 0 in 500 viabilnih mikroorganizmov. Med 500 in 5000 cfu/mL jih je preživilo v izdelkih, ki so vsebovali 0,1-odstotni ekstrakt semen grenivke, 0,3-odstotno in 0,5-odstotno vsebnost glicerilkaprilata, 0,1-odstotni in 0,5-odstotni filtrat fermenta korenine redkvice ter janeževe kisline v obeh koncentracijah, 0,05-odstotni in 0,15-odstotni. Največje število nad 5000 cfu/mL in s tem najmanši upad mikroorganizmov, je bil opazen pri emulzijah z 0,25-odstotno levulinsko kislino, 0,25-odstotno in 0,5-odstotno vsebnostjo fenoksietanola ter 0,2-odstotni in 0,4-odstotni kombinaciji dehidroocetne kisline in benzilalkohola. Število mikroorganizmov v izdelkih se je po 14 in 28 dneh zmanjševalo, kar kaže na učinkovitost konzervansov. Prav tako so učinkovitost izkazali parabeni, ki so predstavljeni pozitivno kontrolo. Sedem dni po inokulaciji je največji padec mikroorganizmov viden pri večji, 0,8-odstotni koncentraciji metil- in propilparabena. Pri vseh kozmetičnih izdelkih z različnimi konzervansi je koncentracija *A. brasiliensis* upadla za več kot 1 logaritemsko enoto razen pri 0,4-odstotni zmesi dehidroocetne kisline in benzilalkohola. Tam smo po 28 dneh določili število R 0,6. Pričakovali bi, da bo večja koncentracija dehidroocetne kisline in benzilalkohola ustrezno zaščitila emulzije (slika 15). Najverjetnejše je pri tehtanju ali označevanju prišlo do zamenjave falkonk med večjo in manjšo koncentracijo te zmesi in je količina mikroorganizmov manj upadala pri manjši koncentraciji te zmesi. Z upoštevanjem 0,5-

logaritemskega odstopanja, ki ga dovoljuje standard, je tudi ta izdelek prestal izzivni test z *A. brasiliensis* in zadostil pogojem kriterija A. Kontrole smo shranjevali v enakih razmerah kot testne emulzije.



Slika 15: Vzorec dehidroocetne kisline in benzilalkohola v kombinaciji ob času T₇



Slika 16: Kolonijska enota *S.aureus* na plošči vzorca levulinske kislino v visoki koncentraciji

Izzivni test smo za bakterijo *S. aureus* ponovili, saj so v enem izmed prejšnjih testiranj ugotovili, da je bila uporabljena voda, ki je sicer prihajala iz sistema za deionizacijo z reverzno osmozo, močno mikrobiološko kontaminirana. Posebej pozorni smo bili na dodatek vode ustrezne kakovosti, emulzije smo izdelali s prečiščeno vodo, ki smo jo dodatno prevreli. Pri izvajanju izzivnega testa smo v predpisanih časovnih točkah določali število mikroorganizmov s štetjem v trdnem gojišču. Vendar je bila koncentracija viabilnih *S. aureus* tako nizka, da je na ploščah zraslo manj kot 30 kolonij, kar je predpisana spodnja meja, ki jo upoštevamo pri določanju koncentracije mikroorganizmov v izdelku. Slika 16 prikazuje vzorec emulzije, ki je vsebovala levulinsko kislino v visoki koncentraciji. Vidimo, da je na plošči zrasla le ena kolonija. Koncentracija *S. aureus* je bila po sedmih dneh po inokulaciji v vseh emulzijah z različnimi konzervansi manjša od 15 cfu/mL. V rezultatih priloge 6 lahko opazimo velik padec koncentracije mikroorganizmov po sedmih dneh, ki je bil viden pri vseh vzorcih pri izzivnem testu z bakterijo *S. aureus*. V preglednici priloge 4 so prikazana povprečna števila kolonij *S. aureus* na dveh paralelnih TSA gojiščih pri različnih redčitvah in različnih časovnih točkah izzivnega testa. Kriterijem testa je ustrezala tudi kontrola, ki ni vsebovala konzervansa. Vzrok zato, bi lahko bilo delno protimikrobnno delovanje samega kozmetičnega izdelka. V literaturi smo našli podatke o protimikrobnji aktivnosti dveh sestavin naše emulzije. Karitejevo maslo kaže protimikrobnno aktivnost proti sevu *S. aureus* (59). Našli pa smo tudi nekaj let staro raziskavo, ki kaže, da glicerol deluje protimikrobnno v več koncentracijah proti mikroorganizmom: *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* in *Salmomella typhirurium* (60).

Preglednica 17: Ustreznost kriterijev standarda ISO 11930 za vse predpisane mikroorganizme

KONZERVANS	PREDPISAN MIKROORGANIZEM	PROTI MIKROBNA ZAŠČITA			
		<i>C. albicans</i> ATCC 103231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404
0,2 % LEVULINSKA K.		NE	A	A	A
0,25 % LEVULINSKA K.		NE	A	A	A
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE		NE	NE	A	A
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE		NE	A	A	A
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE		NE	A	A	A
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE		A	A	A	A
0,25 % FENOKSIETANOL		NE	NE	A	A
0,5 % FENOKSIETANOL		B	A	A	A
0,13 % BENZOJSKA K.		A	A	A	A
0,25 % BENZOJSKA K.		A	A	A	A
0,15 % SORBINSKA K.		A	A	A	A
0,3 % SORBINSKA K.		A	A	A	A
0,13 % SALICILNA K.		A	A	A	A
0,25 % SALICILNA K.		A	A	A	A
0,05 % JANEŽEVA K.		A	A	A	A
0,15 % JANEŽEVA K.		A	A	A	A
0,15 % DEHIDROOCETNA K.		A	A	A	A
0,3 % DEHIDROOCETNA K.		A	A	A	A
0,3 % GLICERILKAPRILAT		A	A	A	A
0,5 % GLICERILKAPRILAT		A	A	A	A
14 % ETANOL		A	A	A	A
17 % ETANOL		A	A	A	A
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL		A	A	A	A
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL		A	A	A	A*
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN		NE	NE	A	A
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN		A	/	A	A
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN		A	/	A	A
BREZ KONZERVANSA		NE	NE	A	A

*vrednost, kjer smo upoštevali 0,5 logaritemsko odstopanje

Iz preglednic 15 in 16 je razvidno, da kar zadeva rezultate mikroorganizmov *S. aureus* in *A. brasiliensis*, ki smo jih preiskovali z izzivnim testom, vse naravne spojine ustrezajo kriteriju A. Samo s temi podatki jih ne moremo ovrednotiti in primerjati glede na učinkovitost. Test je potrebno narediti tudi z ostalimi mikroorganizmi, ki so predpisani za kozmetične izdelke po standardu ISO 11930. Izzivni test obsega še dva mikroorganizma, ki sta *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa* (54). Preglednica 17 prikazuje zbrane rezultate vseh štirih mikroorganizmov. Testi in natančnejši rezultati so opisani v diplomskih nalogah Maše Močnik Roner (*Candida albicans*) in Aleksandre Bobnar (*Pseudomonas aeruginosa*).

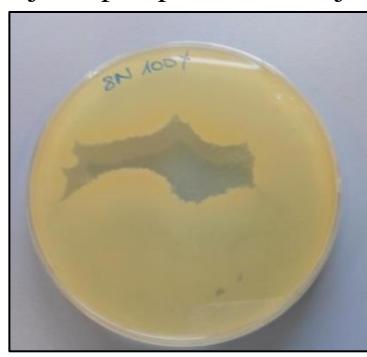
Levulinska kislina in filtrat fermenta korenine redkvice in izkažeta najslabšo zaščito, saj ne ustrezata v nobeni izmed koncentracij. Filtrat korenine redkvice smo dodali po ohlajanju emulzije, saj je stabilen v pH območju od 4–6 in pod 70 °C (50). Ekstrakt semen grenivke v manjši 0,1-odstotni koncentraciji ne prestane izzivnega testa s *C. albicans*. Torej ne zagotavlja zaščite pred kvasovkami kozmetičnim izdelkom z veliko vsebnostjo vode, kot je emulzija, ki smo jo uporabili. Kriterijem pa ustreza v večji 0,5-odstotni koncentraciji. Tak rezultat je pričakovan, saj ta spojina še ni registrirana kot konzervans in je potrebno najmanjše učinkovite koncentracije še določiti. Ekstrakt semen grenivke je ob prihodu na tržišče obetal veliko, dvom o sestavinah naravnega pa se je začel porajati, ko so v izdelkih našli sledi sinteznih snovi, kot so benzalkonijev in benzetonijev klorid, estri 4-hidroksibenzojske kisline ter benzojske in salicilne kisline. Ugotovili so, da je najverjetneje ravno postopek izdelave ta, ki spremeni naravno prisotne polifenolne sestavine v kvartarne spojine, ki imajo protimikrobnlo delovanje, saj so te lastnosti izražene le ob prisotnosti ostankov topil in drugih konzervansov (52). Prav tako v manjši 0,25-odstotni koncentraciji ne zaščiti emulzij fenoksietanol. V 0,5-odstotni koncentraciji se bolje izkaže, pri mikroorganizmu *Candida albicans* ustreza kriteriju B, pri ostalih pa kriteriju A. Priporočena koncentracija fenoksietanola je do 1-odstotna, zelo pogosto pa se pojavlja v kombinaciji, saj poveča protimikrobni učinek drugih konzervansov (40). Smiselno bi bilo preveriti levulinsko kislino, filtrat fermenta korenine redkvice, fenoksietanol in ekstrakt semen grenivke še v kombinaciji z drugimi konzervansi. S kombinacijo več konzervansov lahko dosežemo učinkovito konzerviranje in ohranimo majhne koncentracije.

Konzervansi, ki popolnoma ustrezajo kriterijem v obeh koncentracijah, so benzojska kislina, sorbinska kislina, salicilna kislina, ki so že priznani kot konzervansi, ter janeževa kislina, glicerilkaprilat in etanol. Kombinacija vodne raztopine dehidroocetne kisline in

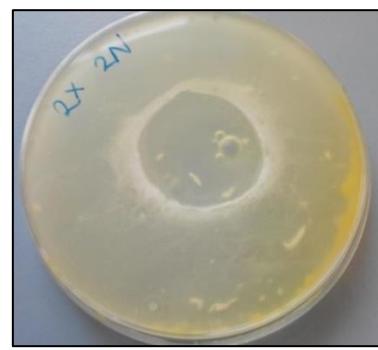
benzilalkohola v 0,2-odstotni in 0,4-odstotni koncentraciji ustreza kriteriju A. Kot smo omenili zgoraj, pa je najverjetneje prišlo do zamenjave vsebnikov, saj pri izzivnem testu boljše konzervira emulzijo spojina v majhni koncentraciji.

Prav tako emulzij ne zaščitita metil-propilparaben v 0,1-odstotni koncentraciji in kontrola brez konzervansa. Pri kontrolnih kozmetičnih izdelkih brez konzervansa, ki so bili inokulirani z mikroorganizmoma *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa* ni prišlo do upada koncentracije in kontrolni izdelek brez konzervansa izzivnega testa ni prestal. Tudi pri kontrolah, ki so vsebovale različne koncentracije zmesi parabenov so se pokazale razlike. Parabeni so pri sevih *A. brasiliensis* in *S. aureus* zelo učinkoviti, emulzijo zaščitijo že pri 0,1-odstotni vsebnosti konzervansa. Pri drugih dveh mikroorganizmih parabeni v 0,1-odstotni koncentraciji niso zaščitili izdelka.

Z izzivnim testom poskušamo posnemati potrošnikovo vsakodnevno uporabo kozmetičnega izdelka, saj z inokulacijo ravno tako vnesemo mikroorganizme. Dobro bi bilo kontrolo mikrobiološke kakovosti ponoviti tudi med obdobjem uporabe izdelkov in tako oceniti učinkovitost sistema za konzerviranje. Najverjetneje bi ob vsakodnevni uporabi izdelka testna emulzija kontrola brez konzervansa vsebovala več mikroorganizmov (35). Pri naših dveh testih smo uporabili metodo štetja v ploščah, kjer je bilo potrebno kontrolirati temperaturo tekočega gojišča, ki je morala biti od 40 do 45 °C. Povišana temperatura gojišča bi lahko povzročila smrt mikroorganizmov (61). Pomembno je tudi, da se zavedamo razlike v mikrobioloških rezultatih zaradi štetja. Metodo štetja v ploščah uporabljam pogosto, ima pa tudi določene omejitve, kot je na primer relativno ozek razpon štetja, na standardni petrijevi plošči preštejemo 25–250 kolonijskih enot. Prihaja do odstopanj pri štetju različnih oseb, pojavljajo se nenavadne situacije na ploščah (slika 17), ki bi morale biti natančneje opisane v enotnem splošnem postopku ali farmakopejah (62). Pri tej metodi lahko pride tudi do slabega umešanja vzorca v gojišče, kar lahko vidimo na sliki 18. Zaradi variabilnosti štetja se pri izzivnemu testu upošteva 0,5-logaritemsko odstopanje od predpisanih kriterijev A in B (54).



Slika 17: Kolonija *S. aureus* čez zelo ploščo



Slika 18: Slabo umešanje vzorca v gojišče

6 SKLEP

Konzervansi so v kozmetičnih izdelkih, kjer je prisotna voda, nujno potrebni, predvsem zato, ker pri uporabi v izdelek vsakodnevno vnašamo mikroorganizme, ki bi se razrasli, če ne bi bilo ustreznega konzervansa. Napisi na kozmetičnih izdelkih, kot so »brez parabenov«, »brez konzervansov« in »naravno«, so le marketinška poteza in zavajanje kupcev. Ogromno kozmetičnih izdelkov naravne kozmetike namreč vsebuje protimikrobne sestavine, ki imajo učinek konzervansov in bi morali biti navedeni na ovojnini.

Naši rezultati kažejo, da so naravne sestavine, ki smo jih uporabili v našem eksperimentu, zelo obetavne kot naravni konzervansi, vse izkazujejo protimikrobno aktivnost. V obeh koncentracijah so zaščitile emulzijo in izpolnile oba kriterija izzivnega testa. Smiselno bi bilo z izzivnim testom preveriti še kombinacije z več protimikrobnimi sestavinami. Tako bi dosegli sinergistični učinek in lahko zmanjšali koncentracije konzervansov v izdelku.

Mikrobiološka varnost in kakovost izdelka sta skupek dejavnikov. Dokazali smo, da moramo mikrobiološko kakovost, poleg zaščite z ustreznim konzervansom, zagotoviti z izdelavo, ki mora biti v skladu z veljavno dobro proizvodno prakso, uporabo primernih vsebnikov in ovojnine ter primernimi izhodnimi sestavinami.

7 LITERATURA

1. Baumgartner S, Bajramović N, Bartenjev I, Butina M R, Fiala P, Gašperlin M, Gosenca M, Janeš D, Menard A, Štrukelj B, Glavač N K, Zvonar A: Trendi na področju kozmetičnih izdelkov: učinkovitost in varnost sestavin: strokovno izobraževanje, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 41-60
2. Ibarra F, Christopher H: Natural preservation from concepts in nature, Cosmetics & Toiletries, 2008: 81-90
3. Cosmetics Europe the personal care association (dostop: november 2015)
<https://www.cosmeticseurope.eu/safety-and-science-cosmetics-europe/products-and-ingredients/organic-and-natural-products-.html>
4. Janeš D, Kočev Glavač N: Sodobna kozmetika: Sestavine naravnega izvora, Velenje, 2015: 9-14
5. BDIH certified natural cosmetics (dostop: december 2015)
<http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/e/bdih.htm>
6. BDIH certified natural cosmetics (dostop: december 2015)
http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/e/guideline_natural_cosmetics.htm
7. Ecocert. (dostop: december 2015)
<http://www.ecocert.com/en/natural-and-organic-cosmetics>
8. Cosmebio. (dostop: december 2015)
<http://www.cosmebio.org/en/qui-sommes-nous.php>
9. Cosmebio. (dostop: december 2015)
<http://www.cosmebio.org/en/nos-label.php> (dostop: december 2015)
10. Cosmebio. (dostop: december 2015)
<http://www.cosmebio.org/fichiers/charte-cosmebio-en.pdf>
11. Soil Association. (dostop: december 2015)
<http://www.soilassociation.org/aboutus/whoweare>
12. Soil Association. (dostop: december 2015)
<http://www.soilassociation.org/whatisorganic/organicbeauty/labellingguide>
13. Soil Association. (dostop: december 2015)
<http://www.soilassociation.org/LinkClick.aspx?fileticket=Os9v5O1YZUs%3d&tabid=353>
14. ICEA. (dostop: december 2015)

- <http://www.icea.info/en/perche-bio/cosmesi-e-detergenza/cosmesi/certificazione-eco-bio-cosmesi>
15. ICEA. (dostop: december 2015)
<http://www.icea.info/en/documentazione>
16. COSMOS. The Standard, Labelling and Technical Guide (dostop: december 2015)
<http://cosmos-standard.org/>
17. ICEA. (dostop: december 2015)
<http://www.icea.info/en/perche-bio/cosmesi-e-detergenza/cosmesi/cosmos-natural-inspected>
18. COSMOS-standard Cosmetics organic and natural standard (dostop: december 2015)
<https://cosmosstandard.files.wordpress.com/2014/08/cosmos-standard-v2-21102013.pdf>
19. NaTrue (dostop: december 2015)
<http://www.natrue.org/activities/natrue-label/>
20. NaTrue (dostop: december 2015)
http://www.natrue.org/fileadmin/natrue/downloads/Criteria_3.2/EN-NATRUE-Label_Requirements_V3_2.pdf
21. Raab W, Kindl U: Pflegekosmetik, Ein Leitfaden, 3. Auflage, Stuttgart 1999: 207-209
22. Uredba (ES) št.1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih
23. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C: Self-preserving cosmetics, International Journal of Cosmetic Science 2009, 31: 163-175
24. Sorbic acid and potassium Sorbate as Cosmetic Preservatives, Publication CB-35 April 1998 Eastman Chemical Company (Specifikacija proizvajalca)
25. Campana R, Scesa C, Patrone V, Vittoria E, Baffone W: Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems, The Society for Applied Microbiology 2006, 43: 301-306
26. Amaral L F B, Camilo N S, Pereda M D C V, Levy C E, Moriel P, Mazola P G, Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetics products, International Journal of Cosmetic Science 2011; 33: 391-397

27. Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih, 2013, Uradni list republike Slovenije, 7.člen, 61: 7310
28. Bledzka D, Gromadzinska, J, Wasowicz, W: Parabens. From environmental studies to human health. Environment International 2014 67, 27-42
29. Darbre P D, Aljarrah A, Miller WR, Coldham N G, Sauer M J, Pope G S: Concentration of parabens in human breast tumors, Journal of Applied Toxicology, 2004, 24, 5-13
30. Soni M G, Carabin I G, Burdock G A: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), Food And Chemical Toxicology 43, 2005, 98-1015
31. Ozaki H, Sugihara K, Watanabe Y, Fujino C, Uramaru N, Sone T, Ohta S, Kitamura S: Comparative study of the hydrolitic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl- and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues, Xenobiotica, 2013, 43 (12), 1064-1072
32. SCCS Scientific Committee on Consumer Safety. Clarification on opinion SCCS/1348/10 in the light of Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age, 2011 1-51
33. SCCS Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on parabens, 2010 1-36
34. Uredba komisije (EU) št. 1004/2014 o spremembi Priloge V k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih
35. Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C: New alternatives to cosmetics preservation, International Journal of Cosmetic Science 2010, 61: 107-123
36. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel: Final report of the safety assessment of Alcohol Denat., including SD Alcohol 3-A, SD Alcohol 30, SD Alcohol 39, SD Alcohol 39-B, SD Alcohol 39-C, SD Alcohol 40, SD Alcohol 40-B, and SD Alcohol 40-C, and the denaturants, Quassine, Brucine Sulfate/Brucine, and Denatonium Benzoate, International Journal of Toxicology, 27 (1) 1-43
37. Pai Skincare, organic solutions for sensitive skin (dostop: junij 2015)
<http://www.paiskincare.com/pages/preservatives-in-natural-organic-skin-care-107>
38. LUSH. (dostop: junij 2015)
https://www.lush.si/?route=lush/lushopaedia&ingredient_id=542
39. Krowka J, Lorezt L, Brzuska K, Almeida J F, Diehl M., Gonsior Stanley J., Johnson A, Sellam S, Bade S, Champ S: Phenoxyethanol as a Safe and Important Preservative in Personal Care, Cosmetics & Toiletries, 2014, 129, 24-27

40. Fenoksietanol, Sharon Laboratories (specifikacija proizvajalca)
41. Weber K: New alternatives to Paraben-based Preservative Blends, Cosmetics & Toiletries magazine, 2005, 57-62
42. Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH: Multifunctional aditives:Dermosoft® 688 20011-1 (Specifikacija proizvajalca)
43. https://en.wikipedia.org/wiki/Levulinic_acid (dostop: junij 2015)
44. EWG's Skin Deep® Cosmetic Database (dostop: junij 2015)
http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/703537/LEVULINIC_ACID/
45. Lonza inc, USA: Geogard® 221 Preservative (Specifikacija proizvajalca)
46. SCCP Opinion on Benzoic acid and Sodium Benzoate, SCCP/0891/05 (dostop junij 2015)
47. Opinion on The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers concerning Salicylic acid, SCCNFP/0552/01 (dostop: junij 2015)
48. Dr. Straetmans Chemische Produkte GmbH: Multifunctional aditives:Dermosoft® GYMCY 2008-1 (Specifikacija proizvajalca)
49. Li J, Chaytor J L, Findlay B, McMullen L M, Smith D C, Vederas J: Identification of Didecyldimethylammonium Salts and Salycilic Acid as Antimicrobial Compounds in Commercial Fermented Radish Kimchi, Journal of agricultural and food chemistry 2015, 63, 3053-3058
50. Active Micro Technologies: Leucidal® Liquid Technical Data Sheet. Verzija 15, 9.11.2014 (Specifikacija proizvajalca)
51. Kamysz W, Turecka K: Antimicrobial efectiveness of natural peptide antibiotics, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 2005, 341-346
52. Ganzena M, Aberham A, Stuppner H: Development and Validation of an HPLC/UV/MS Method for Simultaneous Determination of 18 Preservatives in Grapefruit Seed Extract, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 3768-3772
53. Ostrosky E A, Marcondes E M C, Nishikawa S O, Lopes P S, Varca G H C V, Pinto T J A, Consiglieri T V O, Baby A R, Velasco M V R, Kaneko T M, Rubus rosaefolius Extract as a Natural Preservative Candidate in Topical Formulations, AAPS PharmSciTech, 2011, 12: 732-737
54. Internacionala organizacija za standarde, ISO 11930: Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product, 2012

55. Siegert W: A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation, SOFW Journal, 2012, 7: 44-53
56. Evropska Farmakopeja 8.0, Mikrobiološki pregled nesterilnih izdelkov: preskusi štetja mikroorganizmov (2.6.12.), Mikrobiološko preskušanje nesterilnih izdelkov: preskus na specifične mikroorganizme (2.6.13.), Mikrobiološka kakovost nesterilnih farmacevtskih izdelkov in substanc za farmacevtsko uporabo (5.1.4.)
57. Cosmetic ingredient database (dostop: december 2015)
http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing/index_en.htm
58. Resnik M, Kerč J: Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov, Farmacevtski vestnik, 2010, 61: 23-28
59. Adamu H M, Ushie O A, Nansel E: Antimicrobical activity of Oil *Butyrospermum parkii* Seed (Shea Butter), International Journal of Modern Biology and Medicine, 2013, 3 (2): 50-59
60. Litsky W, Libbey C J, Sterility testing and antimicrobial activity of commercial grade glycerine, University of Massachusetts, 1971
61. Martins de Souza C, Kitahara S E, Fernandes J C B: Improved method for inoculation of microorganisms Journal of Advanced Scientific Research, 2014, 5 31-33
62. Sutton, S., Accuracy of Plate Counts, Journal of Validation Technology 17.3, 2011, 42-46

8 PRILOGE

Priloga 1: Sestava izdelanih dermalnih emulzij s podatki o koncentraciji konzervansov

	KONZERVANS	vsebnost konzervansa [g]	karitejevo maslo [g]	mandljevo olje [g]	cetearil alkohol [g]	voda [g]	cetearil glukozid [g]	glicerol [g]	ksantan [g]	skupaj [g]
majhna koncentracija [g]	Dehidroocetna k. in benzilalkohol	0,20	2	11	0,5	79,90	0,8	5	0,6	100,00
	Dehidroocetna k.	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6	100,00
	Salicilna k.	0,13	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6	100,00
	Levulinska k.	0,20	2	11	0,5	79,90	0,8	5	0,6	100,00
	Sorbinska k.	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6	100,00
	Glicerilkaprilat	0,30	2	11	0,5	79,80	0,8	5	0,6	100,00
	Janeževa k.	0,05	2	11	0,5	80,05	0,8	5	0,6	100,00
	Fenoksietanol	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6	100,00
	Filtrat fermenta korenine redkvice	1,00	2	11	0,5	79,10	0,8	5	0,6	100,00
	Benzojska k.	0,13	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6	100,00
	Etanol	14,00	2	11	0,5	66,10	0,8	5	0,6	100,00
	Ekstrakt semen grenivke	0,10	2	11	0,5	80,00	0,8	5	0,6	100,00
velika koncentracija [g]	Dehidroocetna k. in benzilalkohol	0,40	2	11	0,5	79,70	0,8	5	0,6	100,00
	Dehidroocetna k.	0,30	2	11	0,5	79,80	0,8	5	0,6	100,00
	Salicilna k.	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6	100,00
	Levulinska k.	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6	100,00
	Sorbinska k.	0,30	2	11	0,5	79,80	0,8	5	0,6	100,00
	Glicerilkaprilat	0,50	2	11	0,5	79,60	0,8	5	0,6	100,00
	Janeževa k.	0,15	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6	100,00
	Fenoksietanol	0,50	2	11	0,5	79,60	0,8	5	0,6	100,00
	Filtrat fermenta korenine redkvice	1,50	2	11	0,5	78,60	0,8	5	0,6	100,00
	Benzojska k.	0,25	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6	100,00
	Etanol	17,00	2	11	0,5	63,10	0,8	5	0,6	100,00
	Ekstrakt semen grenivke	0,50	2	11	0,5	79,60	0,8	5	0,6	100,00
kontrole [g]	pozitivna: Metilparaben in propilparaben (7:3)	0,10	2	11	0,5	80,00	0,8	5	0,6	100,00
	pozitivna: Metilparaben in propilparaben (7:3)	0,40	2	11	0,5	79,70	0,8	5	0,6	100,00
	pozitivna: Metilparaben in propilparaben (7:3)	0,80	2	11	0,5	79,30	0,8	5	0,6	100,00
	negativna: brez konzervansa	0,00	2	11	0,5	80,10	0,8	5	0,6	100,00

Priloga 2: Število mikroorganizmov v kozmetičnih izdelkih tik po izdelavi in po dveh mesecih shranjevanja določeno po testu Evropske farmakopeje 2.6.12

	N (št. MO v vzorcu) ob T ₀									N (št. MO v vzorcu) ob T _{2mes}								
	TSA			SDA			TSA			SDA			TSA			SDA		
	2-kratno Redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje	2-kratno redčenje	10-kratno redčenje
KONZERVANS																		
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,13 % BENZOJSKA K.	30	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25 % BENZOJSKA K.	6	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,3 % GLICERILKAPRILAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	10	0	5	0
0,5 % GLICERILKAPRILAT	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14 % ETANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	0
17 % ETANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15 % SORBINSKA K.	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
0,3 % SORBINSKA K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	0
0,13 % SALICILNA K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0
0,25 % SALICILNA K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150	30	90	0
0,2 % LEVULINSKA K.	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	20	0
0,25 % LEVULINSKA K.	0	0	0	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25 % FENOKSIETANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
0,5 % FENOKSIETANOL	2	0	1	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	0
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN	2	0	1	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	2
BENZILALKOHOL															2	0	1	0
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN	0	0	0	50	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
BENZILALKOHOL															2	0	1	0
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE R.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE R.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	0	0
0,05 % JANEŽEVA K.	0	0	0	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15 % JANEŽEVA K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	2	0	1	10	50	30	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	10
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	0
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0
BREZ KONZERVANSA	10	0	5	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	5	2

1p...prva paralelka; 2p...druga paralelka; p...povprečje obeh paralelk

Priloga 3: Povprečno število kolonij *A. brasiliensis* na dveh PDA gojiščih pri različnih redčitvah in različnih časovnih točkah izlivnega testa

KONZERVANS	Povprečno število preživelih kolonij							
	T₇		T₁₄		T₂₈			
	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje	10000-kratno redčenje	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje	10000-kratno redčenje
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	48,5	19	/	6,5	1	/	7,5	1
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENIVKE	0	0	0	0	/	0	0	/
0,13 % BENZOJSKA K.	4,5	0	0	0	/	0	0	/
0,25 % BENZOJSKA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,3 % GLICERILKAPRILAT	34,5	3,5	1	0	/	14	1,5	/
0,5 % GLICERILKAPRILAT	22,5	5,5	1	0	/	0	0	/
14 % ETANOL	4,5	0,5	0	0	/	0	0	/
17 % ETANOL	0	0	0	0	/	0	0	/
0,15 % SORBINSKA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,3 % SORBINSKA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,13 % SALICILNA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,25 % SALICILNA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,2 % LEVULINSKA K.	0	0	0	0	/	0	0	/
0,25 % LEVULINSKA K.	75	21	/	1,5	2	/	5	1
0,25 % FENOKSIETANOL	78	21,5	/	7,5	2	/	8,5	0,5
0,5 % FENOKSIETANOL	> 150	63	/	48,5	6,5	/	7,5	0,5
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	> 150	60	/	14	3	/	11,5	0,5
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	> 150	45	/	18	2,5	/	28	3,5
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	15	4	/	1	1	/	10,5	2
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	50,5	13,5	/	2	0,5	/	6	1,5
0,05 % JANEŽEVA K.	36	8	6,5	1	/	1	0	/
0,15 % JANEŽEVA K.	24,5	3	1,5	0,5	/	0,5	0	/
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	2	0	1,5	0	/	0	0	/
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	0	0	0	0	/	0,5	0	/
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	38,5	10,5	/	6	0	/	4	1
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	64	13	/	48,5	7,5	/	5,5	0,5
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	0	/	0	0	/
BREZ KONZERVANSA	62,5	7,5	/	0	1	/	10	1

/ - redčitev ni bila izvedena, z odbeljenimi številkami so označene redčitve, ki smo jih upoštevali

Priloga 4: Povprečno število kolonij *S. aureus* na dveh TSA gojiščih pri različnih redčitvah in različnih časovnih točkah izzivnega testa

KONZERVANS	Povprečno število preživelih kolonij								
	T ₇			T ₁₄			T ₂₈		
	10-kratno redčenje	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje	10-kratno redčenje	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje	10-kratno redčenje	100-kratno redčenje	1000-kratno redčenje
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	1,5	3,5	/	0	0	/	0	0	/
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	0	4	/	0	0	/	0	0	/
0,13 % BENZOJSKA K.	1	0	/	0	0	/	0	1,5	/
0,25 % BENZOJSKA K.	0,5	1,5	/	0	0	/	0	0	/
0,3 % GLICERILKAPRILAT	0	2	/	0	0	/	0	0,5	/
0,5 % GLICERILKAPRILAT	0,5	1,5	/	0	2	/	0,5	0,5	/
14 % ETANOL	0	1,5	/	0	0	/	0	0	/
17 % ETANOL	0	1,5	/	0	0	/	0	0	/
0,15 % SORBINSKA K.	0	1	/	0,5	0,5	/	0,5	0	/
0,3 % SORBINSKA K.	0	0	/	1	0,5	/	0	0	/
0,13 % SALICILNA K.	0	0	/	0	1	/	0,5	0	/
0,25 % SALICILNA K.	0	0,5	/	0	0	/	0	0	/
0,2 % LEVULINSKA K.	0	4,5	3	0	0,5	0	1	0	0
0,25 % LEVULINSKA K.	0	0,5	/	0,5	0	/	0	0	/
0,25 % FENOKSIETANOL	0	0,5	/	0,5	0	/	0,5	0	/
0,5 % FENOKSIETANOL	0	5,5	/	0	0	/	0	0	/
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	0,5	5,5	/	0	0	/	0,5	0	/
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	0	3	/	0	0	/	0	0	/
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	0	1	/	0	0	/	0	0,5	/
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	0,5	0,5	/	0,5	0	/	0	0	/
0,05 % JANEŽEVA K.	0	8,5	8,5	0	3	0	0,5	0	0
0,15 % JANEŽEVA K.	0,5	0	/	0	0	/	0,5	0	/
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	0,5	1,5	/	0,5	0	/	0	0	/
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	1,5	4	/	0	0	/	0	0	/
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	1	/	0,5	0	/	0	0	/
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	1	/	0	0	/	0	0	/
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	1,5	2	/	0	0	/	0	0	/
BREZ KONZERVANSA	0	1	/	0	0	/	0	0	/

/ - redčitev ni bila izvedena, z odbeljenimi številkami so označene redčitve, ki smo jih upoštevali

Priloga 5: Vrednosti zmanjšanja logaritemske vrednosti za *A. brasiliensis* in *S. aureus*

Mikroorganizem	Zmanjšanje logaritemske vrednosti ($R_x = \log N_0 - \log N_x$)					
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	R₇	R₁₄	R₂₈	R₇	R₁₄	R₂₈
KONZERVANS						
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	1,4	1,2	1,2	4,0	> 5,2	> 5,2
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,13 % BENZOJSKA K.	2,4	> 5,0	> 5,0	4,2	> 5,2	> 5,2
0,25 % BENZOJSKA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	4,5	> 5,2	> 5,2
0,3 % GLICERILKAPRILAT	1,5	3	1,9	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,5 % GLICERILKAPRILAT	1,7	3	> 5,0	4,5	> 5,2	4,5
14 % ETANOL	2,4	> 5,0	> 5,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2
17 % ETANOL	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,15 % SORBINSKA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	4,5	4,5
0,3 % SORBINSKA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	4,2	> 5,2
0,13 % SALICILNA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	> 5,2	4,5
0,25 % SALICILNA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,2 % LEVULINSKA K.	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,2	4,5	4,2
0,25 % LEVULINSKA K.	1,6	1,9	1,3	> 5,2	4,5	> 5,2
0,25 % FENOKSIETANOL	1,1	1,2	1,1	> 5,2	4,5	4,5
0,5 % FENOKSIETANOL	0,2	0,4	1,2	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	0,3	0,9	1,0	4,5	> 5,2	4,5
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	0,4	0,8	0,6	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	1,9	2,0	1,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	1,3	1,7	1,3	4,5	4,5	> 5,2
0,05 % JANEŽEVA K.	1,5	2,2	3,0	> 5,2	> 5,2	4,5
0,15 % JANEŽEVA K.	1,7	2,9	3,3	4,5	> 5,2	4,5
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	2,7	2,9	> 5,0	4,5	4,5	> 5,2
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	> 5,0	> 5,0	3,3	4,0	> 5,2	> 5,2
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	1,5	1,3	1,4	> 5,2	4,5	> 5,2
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	1,2	0,4	1,3	> 5,2	> 5,2	> 5,2
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	> 5,0	> 5,0	> 5,0	4,0	> 5,2	> 5,2
BREZ KONZERVANSA	1,2	> 5,0	2,0	> 5,2	> 5,2	> 5,2

Priloga 6: Število kolonijskih enot v 1 mL kozmetičnega izdelka, ki smo ga ocenili iz štetja kolonij na petrijevkah ob različnih časovnih točkah

Mikroorganizem	Število kolonijskih enot v 1 mL/ 1g					
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	N ₇	N ₁₄	N ₂₈	N ₇	N ₁₄	N ₂₈
KONZERVANS						
0,1 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	4850	6500	7500	15	0	0
0,5 % EKSTRAKT SEMEN GRENVKE	0	0	0	0	0	0
0,13 % BENZOJSKA K.	450	0	0	10	0	0
0,25 % BENZOJSKA K.	0	0	0	5	0	0
0,3 % GLICERILKAPRILAT	3450	100	1400	0	0	0
0,5 % GLICERILKAPRILAT	2250	100	0	5	0	5
14 % ETANOL	450	0	0	0	0	0
17 % ETANOL	0	0	0	0	0	0
0,15 % SORBINSKA K.	0	0	0	0	5	5
0,3 % SORBINSKA K.	0	0	0	0	10	0
0,13 % SALICILNA K.	0	0	0	0	0	5
0,25 % SALICILNA K.	0	0	0	0	0	0
0,2 % LEVULINSKA K.	0	0	0	0	5	10
0,25 % LEVULINSKA K.	7500	1500	5000	0	5	0
0,25 % FENOKSIETANOL	7800	7500	8500	0	5	5
0,5 % FENOKSIETANOL	63000	48500	7500	0	0	0
0,2 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	60000	14000	11500	5	0	5
0,4 % DEHIDROOCETNA K. IN BENZILALKOHOL	45000	18000	28000	0	0	0
0,1 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	1500	1000	10500	0	0	0
0,5 % FILTRAT FERMENTA KORENINE REDKVICE	5050	2000	6000	5	5	0
0,05 % JANEŽEVA K.	3600	650	100	0	0	5
0,15 % JANEŽEVA K.	2450	150	50	5	0	5
0,15 % DEHIDROOCETNA K.	200	150	0	5	5	0
0,3 % DEHIDROOCETNA K.	0	0	50	15	0	0
0,1 % METIL- IN PROPILPARABEN	3850	6000	4000	0	5	0
0,4 % METIL- IN PROPILPARABEN	6400	48500	5500	0	0	0
0,8 % METIL- IN PROPILPARABEN	0	0	0	15	0	0
BREZ KONZERVANSA	6250	0	1000	0	0	0