

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIA KRISTIAN TAJNŠEK

Preizkus učinkovitosti konzerviranja različnih sestavin naravnega izvora v dermalni formulaciji z uporabo glive *Candida albicans*

Examination of preservative effectiveness of various natural ingredients in dermal formulation using the fungus *Candida albicans*

Ljubljana, 2015

Diplomsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v laboratorijih Katedre za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nini Kočevar Glavač za vodstvo in svetovanje pri diplomskem delu, izr. prof. dr. Mojci Lunder za pomoč in usmerjanje pri eksperimentalnem delu in celotni Katedri za farmacevtsko biologijo za pozitivno in raziskovalno naravnano vzdušje med delom.

Na tem mestu se želim zahvaliti tudi svoji družini, ki mi je omogočila študij in me pri tem brez pogojno podpirala.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm..

Lr.p.

Kazalo

POVZETEK.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
1. UVOD.....	7
1.1 MIKROBIOLOŠKA OKUŽBA	7
1.1.1 Mikrobiološki kontaminanti.....	7
1.1.2 Spremembe izdelka po okužbi.....	9
1.2 PREPREČEVANJE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE.....	10
1.3 KONZERVANSI	12
1.3.1 Protimikrobne sestavine uporabljene pri delu	13
1.3.2 Testiranje konzervansov	15
1.3.3 Standard ISO 11930	16
2. NAMEN DELA	18
3. METODE in MATERIALI	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.2 METODE.....	22
3.2.1 Izdelava kozmetične formulacije, emulzije tipa O/V	22
3.2.2 Preizkus nevtralizatorja	24
3.2.3 Test učinkovitosti konzervansa	25
4. REZULTATI	27
5. RAZPRAVA.....	31
6. SKLEP	36
7. LITERATURA	37

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: KOZMETIČNE SESTAVINE UPORABLJENE ZA IZDELAVO OSNOVNE EMULZIJE.	19
PREGLEDNICA 2: TEST IRANE KOZMETIČNE SESTAVINE NARAVNEGA IZVORA IN UPORABLJENI KONZERVANSI.	20
PREGLEDNICA 3: OSTALE UPORABLJENE SNOVI.	21
PREGLEDNICA 4: SESTAVA FORMULACIJ Z MINIMALNO IN MAKSIMALNO VSEBNOSTJO KONZERVANSA	23
PREGLEDNICA 5: LOGARITEMSKA SPREMEMBA ŠTEVILA <i>C. ALBICANS</i> PO SEDMIH DNEH.	27
PREGLEDNICA 6: LOGARITEMSKA SPREMEMBA ŠTEVILA <i>C. ALBICANS</i> PO ŠTIRINAJSTIH DNEH.	28
PREGLEDNICA 7: LOGARITEMSKA SPREMEMBA ŠTEVILA <i>C. ALBICANS</i> PO OSEMINDVAJSETIH DNEH.	29
PREGLEDNICA 8: USTREZNOST TESTIRANIH SNOVI PO KRITERIJU STANDARDA ISO 11930; OZNAKA NPOMENI MANJŠO, OZNAKA V VEČJO KONCENTRACIJO.	30

POVZETEK

Izraz mikrobiološka okužba se nanaša na okužbo materiala in izdelkov, ki ni bila namerna oz. se je zgodila po nesreči. Povzročijo jo lahko bakterije, glive in virusi. Ti mikroorganizmi so v splošnem zelo prilagodljivi, imajo sposobnost hitrih mutacij in se lahko naselijo v okolju z najrazličnejšimi razmerami.

Zaradi pogosto velike vsebnosti vode, so kozmetični izdelki zelo dovzetni za mikrobiološko kontaminacijo. S sodobnimi trendi se je ta dovzetnost povečala. Potrošniki si namreč v vse večjem številu želijo izdelke, ki vsebujejo večino naravnih sestavin, hkrati pa zavračajo uporabo klasičnih konzervansov, tistih, ki so vneseni v Prilogo 5 Uredbe o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009.

Izbrali smo 14 snovi naravnega izvora, ki so dovoljene kot kozmetične sestavine, vendar vse (še) niso uvrščene med konzervanse. Te snovi smo v dveh koncentracijah vgradili v kozmetične formulacije, ki same po sebi niso vsebovale drugih protimikrobnih snovi. Na vseh formulacijah smo izvedli izzivni preizkus po mednarodnem standardu za vrednotenje mikrobiološke zaščite kozmetičnih izdelkov (ISO 11930). Kot testni mikroorganizem smo uporabili *Candida albicans*, s katero smo pred začetkom preizkusa masovno okužili formulacije. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili formulacijo, ki je vsebovala zmes metil- in propilparabena, kot negativno kontrolo pa formulacije brez protimikrobne spojine. Preizkus je potekal 28 dni, med katerimi smo ob treh časovnih točkah (7, 14 in 28 dni) opravili vrednotenje posamezne formulacije na gojiščih. Nato smo na podlagi opravljenih meritev in kriterija za določevanje učinkovitosti konzervansa določili ustreznost ali neustreznost posamezne snovi in njene koncentracije za preprečevanje razrasti *Candida albicans*.

Zmes dehidroocetne kisline in benzilalkohola, dehidroocetna kislina, salicilna kislina, etanol, izvleček semen grenivke in janeževa kislina, so se izkazali kot ustrezne pri obeh uporabljenih koncentracijah. Pri največji koncentraciji je bil učinkovit Leucidal, v majhni sta bila uspešna glicerilkaprilat in sorbinska kislina. Formulacij v nobeni koncentraciji niso zaščitili levulinska kislina, benzojska kislina, mandljeva kislina, fenoksietanol in izvleček listov rožmarina. Med samim testiranjem smo naleteli na težavo, okužbo formulacij z dvema tujima mikroorganizmoma. Sklepamo, da je izvor okužbe v vodi, ki smo jo uporabili za izdelavo formulacij. Ker se je okužba pojavila tudi pri pozitivni kontroli, sklepamo tudi, da je bila koncentracija zmesi parabenov neustrezna za mikrobiološko zaščito formulacije.

Ključne besede: *Candida albicans*, konzervansi, ISO 11930, izzivni preizkus, mikrobiološka okužba

ABSTRACT

The term microbiological contamination is used to describe a contamination of the material and product which was not intentional. Contamination can be caused by bacteria, fungus or viruses. These microorganisms are very adaptable and have the ability of fast mutation so they can inhibit many different environments. Because cosmetic products usually contain large percentage of water they are very susceptible to microbiological contamination. This susceptibility has grown with modern trends, desire for natural product with no classical preservatives (those classified in Annex 5 of Regulation (EC) No. 1223/2009 of the european parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products).

We chose 14 permitted cosmetic ingredients of natural source which were not all yet classified as preservatives. These ingredients were used in two different contractions in cosmetic formulation which did not have any other antimicrobial ingredient added. Challenge test was performed on all of these formulations following the international standard for evaluation of the antimicrobial protection of cosmetic product (ISO 11930), using *Candida albicans* as a test microorganism. Positive and negative control was also included in the test, using a mixture of methyl and propylparaben for positive control. No antimicrobial ingredient was added to the negative control. The challenge test lasted 28 days during which the evaluation of cosmetic formulation was perfomered in 3 time points (7, 14 and 28 days). On the basis of evaluation and criteria for adequacy of preservatives, we determined whether a certain ingredient in its concentration was efficient in prohibiting the proliferation of *Candida albicans*.

Mixture of Benzyl alcohol and Dehydroacetic acid, Dehydroacetic acid alone, Salicylic Acid, ethanol, Citrus Paradisi Seed Extract and p-Anisic Acid were efficient in both used concentration. Only the highest concentration of Leucidal and the lowest concentration of Glyceryl Caprylate and Sorbic Acid were determined adequate. Levulinic Acid, Benzoic Acid, Mandelic Acid, Phenoxyethanol and *Rosmarinus Officinalis* Leaf Extract were not efficient in any of used concentrations. During the test we encountered a problem, a foreign contamination of formulation with two different microorganisms. It was concluded that the source of foreign contamination is water used as an ingredient in cosmetic formulation. Because the foreign contamination was also present in positive control it was determined that the concentration of a mixture of parabens was inadequate for preservation of cosmetic formulation.

Key words: *Candida albicans*, preservatives, ISO 11930, challenge test, microbiological contamination

SEZNAM OKRAJŠAV

CFU – colony forming unit (mikroorganizem, ki tvori kolonijo)

GMP – good manufacturing practice (dobra proizvodnja praksa)

ISO – International Organization for Standardization (mednarodna organizacija za standardizacijo)

KI – kozmetični izdelek / i

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

O/V – emulzija tipa olje v vodi

SDA - Sabouraud dextrose agar gojišče

V/O – emulzija tipa voda v olju

1. UVOD

Voda je glavna sestavina žive materije, sodeluje v mnogih metabolnih reakcijah in je nujen medij za razvoj življenja. Zaradi tega so kozmetični izdelki (KI) z veliko vsebnostjo vode zelo dovzetni za mikrobiološko okužbo. Čeprav je voda, ki jo uporabljamo za izdelavo KI prečiščena, vseeno predstavlja medij za razvoj in prenos mikroorganizmov. Ker si želimo okužbo preprečiti, v ta namen uporabljamo kombinacijo različnih pristopov in snovi (1).

1.1 MIKROBIOLOŠKA OKUŽBA

Izraz mikrobiološka okužba se nanaša na okužbo materiala in izdelkov, ki ni bila namerna oz. se je zgodila po nesreči (2). Mikrobiološko okužbo lahko povzročijo bakterije, glice in virusi. Ti mikroorganizmi so v splošnem zelo prilagodljivi in imajo sposobnost hitrih sprememb oz. mutacij, kar jim omogoča, da se lahko naselijo v okolju z najrazličnejšimi razmerami. Tako se lahko tudi KI, ki se med seboj razlikujejo po sestavi, okužijo z enakimi mikroorganizmi (1).

Najbolj dovzetni za mikrobiološko okužbo so tisti KI, ki vsebujejo veliko količino vode. To so razne vodne raztopine, suspenzije in emulzije. Predvsem emulzije tipa »olje v vodi« (O/V) so dovzetne za okužbo, ker voda v zunanjji fazi omogoča mikroorganizmom, da se razširijo po celiem izdelku. Značilni predstavniki emulzij tipa O/V so kreme in losjoni, najpogosteje pa so podvrženi okužbi z glivami (1).

1.1.1 Mikrobiološki kontaminanti

Bakterije

Bakterije so prokariotske celice, velike od 1 do 10 μm . Najdemo jih v obliki krogla, palice ali spirale. Bakterije najpogosteje delimo glede na privzem barvila – pri barvanju po Gramu. Poznamo gram-pozitivne bakterije, katerih glavna komponenta celične stene so peptidoglikani in teihioična kislina, najpogostejši predstavnik je *Staphylococcus aureus*. Poznamo pa tudi gram-negativne bakterije pri katerih je količina peptidoglikana zmanjšana, ta pa je vdelan v periplazemski prostor, predstavnika te skupine sta *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterije dodatno opredelimo glede na njihov odziv na prisotnost kisika. Lahko so aerobne, te potrebujejo kisik za svoj metabolizem, ali anaerobne, te za svoj obstoj ne potrebujejo kisika. Večina patogenih bakterij spada med fakultativne anaerobe, kar pomeni, da uspevajo tako v aerobnih kot anaerobnih razmerah (3).

Virusi

Virusi so veliko manjši od celic, ki jih okužijo. Veliki so med 20 in 300 nm v premeru. Z imenom virus poimenujemo proteinsko lupinico imenovano kapsida, znotraj katere se nahaja genom v obliki nukleinske kisline (DNA ali RNA, nikoli pa oboj). Virus s takšno strukturo imenujemo tudi goli virus. Nekateri virusi se lahko nadalje zapakirajo v lipidno membrano, ovojnico. Glede na obliko proteinske kapside, ločimo dve osnovni obliki: cilindrično in sferično. Nekateri bolj kompleksni virusi lahko kombinirajo te osnovne oblike. Ker virusi ne vsebujejo celičnih organelov, so za svojo reprodukcijo primorani okužiti primerno gostiteljsko celico. Med procesom okužbe jih varuje ovojnica, katera lahko vsebuje encime, ki so potrebni v začetnih korakih okužbe (3).

Glive

Glive so poseben razred mikroorganizmov. Poznamo približno 200.000 vrst gliv, od katerih le kakšnih 200 povzroča bolezni pri ljudeh. Okužbe z glivicami so praviloma ponavljajoče. Glive imajo evkarijotsko celično organizacijo. Celica glive je lahko velika od 2 do 4 μm pa do makroskopskih velikosti. Od ostalih evkarijontov se razlikuje po sestavi celične membrane (ergosterol namesto holesterola) in celične stene (manan, glukan in hitin namesto peptidoglikanov in lipopolisaharidov). Lahko se razmnožuje tako spolno (teleomorfno) preko gamet ali nespolno (anaorfno) preko trosov. Po načinu rasti lahko glive opredelimo kot kvasovke ali kot plesni. Za določene glive je značilen dimorfizem, ki je večinoma odvisen od temperature in je reverzibilen (3).

Candida albicans

C. albicans je del normalne mikroflore sluznic pri ljudeh. Najdemo jo v ustni votlini, gastrointestinalnem traktu, predvsem pa v genitalnem traktu (pri ženskah). *C. albicans* ima več oblik, ki so odvisne od pH, temperature in hrani prisotnih v okolju. Najbolj pogosto se nahaja v obliki kvasovke in tvori okrogle, gladke in bele kolonije, ki so v premeru velike približno 2 do 4 mm. Poznamo okoli 150 vrst gliv iz rodu *Candida*, od teh je okoli 10 takšnih, ki lahko povzročijo bolezensko stanje pri ljudeh, najbolj pogosta pa je ravno *C. albicans* (3).

C. albicans je oportunističen mikroorganizem. Razraste in povzroči bolezensko stanje takrat, ko pride do spremembe pri mikroorganizmu, človeku (jemanje antibiotikov, spremembe v prehrani) ali obeh. Najpogosteje spremembe pri *C. albicans* so spremembe morfologije. Ta se je izkazala za močno povezano s patogenim potencialom. Ko se *C. albicans* spremeni v obliko plesni, se začne širiti preko hif in prične izločati različne encime (proteinaze,

fosfolipaze). Ti encimi razgrajujejo epitelne celice in lahko povzročijo globlje rane. Pri površinski okužbi sluznice se pojavi bela, sirasta obloga (plak), ki je šibko pripeta. Dokler oblage ne odstranimo je lezija neboleča. Na ustni sluznici v večini zasledimo posamezne lise, pri okužbi vaginalne sluznice pa se pojavi debela, skutasta obloga z močnim izcedkom, prisotna je tudi srbecica. Večina žensk vsaj enkrat v življenu preboli takšno vnetje nožnice, pri določenem procentu pa se okužba lahko kronično ponavlja. Kožne okužbe so bolj redke, pojavijo se v kožnih gubah, kjer je vlažno okolje in je površina kože zmeščana. Najbolj očiten primer je okužba pod pleničko (3). Sistemska okužba s *C. albicans* je pogost vzrok bolnišničnih okužb. Opazili so povišan pojav sistemske kandidoze, ki naj bi koreliral z napredkom v sodobni medicini (4). Sistemska okužba je najpogostejsa pri ljudeh, ki so prestali težjo operacijo in so dlje časa v intenzivni negi (5). Večjo dovzetnost za sistemsko okužbo s *C. albicans* so opazili pri pacientih, ki prejemajo imunosupresive, novorojenčkih z majhno telesno maso in pri bolnikih z AIDS-om. (4,5).

1.1.2 Spremembe izdelka po okužbi

Toksični učinki

Toksične učinke povzročajo mikrobiološki toksini in metabolni produkti, kompleksne molekule, ki jih proizvajajo mikroorganizmi (1).

Endotoksini, ki jih po večini sintetizirajo gram-negativne bakterije (npr. *Escherichia coli*), se v okolico sprostijo le takrat, ko celica propade. Sterilizacija s toploto jih ponavadi ne inaktivira, saj so odporni na povišano temperaturo. Eksotoksini so veliko bolj nevarni in se lažje sprostijo v rastni medij, saj so šibkeje vezani na celico. Te toksine redkeje zasledimo v KI, bolj pogosti so toksini gliv. Predvsem v primerih, ko so sestavine KI izpostavljene slabim pogojem shranjevanja. Med bolj dovzetne sestavine spadajo smukec, kaolin in škrob (1).

Mikroorganizmi so vir tujih proteinov in ti lahko na koži izzovejo alergijsko reakcijo (kontaktni dermatitis). Tako se toksičen učinek po uporabi takšnega izdelka izrazi kot draženje (1).

Organoleptične spremembe

Vidna rast mikroorganizmov je najpogosteji pokazatelj okužbe izdelka. Ko dejansko vidimo razširitev okužbe, lahko okužbo brez dvomov potrdimo (sediment pri tekočih KI, obarvane kolonije mikroorganizmov pri poltrdnih in trdnih KI) (1).

Sprememb barve je tudi ena izmed sprememb, ki se lahko zgodijo ob okužbi KI. Mikroorganizmi lahko s svojo metabolno aktivnostjo spremenijo določene komponente KI

(preko spremembe pH, redoks reakcij, ...), te nato povzročijo spremembo barve, lahko pa tudi sami proizvajajo pigmente in tako spremenijo barvo izdelka (1).

Ločitev faz je sprememba, ki jo lahko opazimo pri okužbi emulzij. Vidna heterogenost izdelka nastane zaradi oksidacije lipidne faze ali sprememb pH vodne faze, kar vodi v termodinamično neravnovesje in posledično v ločitev faz (1).

Sprememba tekture po okužbi se pri emulzijah pokaže kot nastanek grudic, pri tekočih KI (npr. tonik) pa lahko opazimo spremembo viskoznosti (1).

Sprememba vonja in okusa KI sta sicer subjektivna dejavnika, vendar so te spremembe ponavadi prvi znak, da bi KI lahko bil pokvarjen oz. okužen. Pojavijo se lahko žarek vonj maščobnih kislin, vonj po ribah zaradi aminov in vonj jajc zaradi amonijaka. Najbolj pogost pa je značilen vonj po plesni (1).

1.2 PREPREČEVANJE MIKROBIOLOŠKE OKUŽBE

KI so namenjeni zunanji uporabi, nanašamo jih na zdravo kožo, ki deluje kot fizična bariera. Dodatno zaščito pred okužbo v normalnih fizioloških razmerah nudi tudi kožna mikroflora. Kljub temu, da nam v zdravem stanju koža zagotavlja relativno zaščito pred okuženimi izdelki, ti vsekakor niso dovoljeni na tržišču (6, 7).

Uredba navaja, da v 0,1 g oz. 0,1 ml vzorca ne smejo biti prisotni *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans*. Isti mikroorganizmi ne smejo biti prisotni v 0,5 g oz. 0,5 ml izdelka, ki je namenjen za nego otrok (mlajših od treh let) ali za uporabo okoli oči. Skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v 1 g oz. 1 ml KI ne sme presegati 1000 mikroorganizmov oz. ne sme presegati 100 mikroorganizmov, ko gre za KI za nego otok ali uporabo okoli oči (8).

Po evropski zakonodaji so na tržišču dovoljeni samo KI, ki ne ogrožajo človeškega zdravja. Preden KI pride na tržišče, mora imeti opravljeno oceno varnosti, njegova izdelava pa mora biti v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP) (7).

GMP lahko v grobem definiramo kot skupek pravil, ki jih uporabimo/jim sledimo, da stalno zagotavljamo kakovosten izdelek. Prva in glavna zahteva GMP je, da izdelek ne škoduje končnemu uporabniku. Med smernice GMP spadajo tudi zahteva po: odsotnosti okužbe, vodenju dokumentacije proizvodne prakse, ki zagotavlja stalno kakovost izdelka, ustrezeno izobraženem in usposobljenem osebju, ter primerni opremi (9). Da v izdelku zagotovimo okolje, ki ne bo podpiralo razvoja mikroorganizmov uporabljamо še druge pristope, kot so:

Ustrezno pakiranje, ki zagotavlja večjo zaščito in omogoča, da uporabimo manjšo količino konzervansov. Največjo zaščito ob minimalni vsebnosti konzervansov omogoča pakiranje za enkratno uporabo (vrečka in ampule). Primerna je tudi ovojnina za večkratno uporabo, ki ne vsebuje zraka ali pa ne dopušča vstopa zraku (10).

Tip emulzije: Emulzije, ki so manj podvržene mikrobiološki okužbi so tipa »voda v olju« (V/O). To seveda ne pomeni, da konzervans ni potreben, je pa njegova količina manjša, saj zunanjega faza (lipidna faza) predstavlja oviro za rast in razvoj mikroorganizmov (10).

pH vrednost, saj je pomembna za optimalno rast določenega mikroorganizma. Bolj kot se pH oddaljuje od nevtralnega, slabša je rast mikroorganizmov. Čeprav lahko kvasovke in plesni tolerirajo tudi bolj kisel pH, je večina mikroorganizmov zelo oslabljenih pri pH, manjšem od 4 ali več kot 10. Pri KI, kijih s kože ne spiramo, ta pristop ni najbolj uporaben, saj preveč kisel ali bazičen pH draži kožo (10).

Količina proste vode, saj jo mikroorganizmi potrebujejo za preživetje, razvoj in razmnoževanje. V KI to tako imenovano prosto (bioaktivno) vodo predstavlja tisti del vode, ki ne interagira s sestavinami KI in je na voljo mikroorganizmom. Ravno nasprotno velja za vezano vodo, ki se vgradi med druge sestavine KI preko različnih povezav, npr. vodikovih vezi (10, 11). Na količino proste vode v izdelku lahko vplivamo s sestavinami, ki omejujejo njenou aktivnost. Med bolj zanimimi so humektanti (vlažilci), ki vežejo vodo. Najbolj pogosto uporabljamosorbitol in glicerol v vrednostih do 20 % (m/m), večja vsebnost daje nezaželen lepljiv občutek na koži. V uporabi so tudi glicerilpoliakrilatni geli, ki so prosojni, zelo viskozni, ne toksični in ne dražijo, ter zelo učinkovito vežejo vodo iz svoje okolice (10). Na sposobnost vezave vode vplivata tudi izvor snovi in proizvodni proces. Izkazalo se je, da so glicerol in različni glikoli naravnega izvora bolj učinkoviti pri zmanjševanju aktivnosti vode v primerjavi s sinteznimi. Pri procesu izdelave so najboljšo vezavo vode dosegli s počasnim dodajanjem vlažilca vodi med mešanjem (11).

Uporaba sestavin s protimikrobnim delovanjem. Te sestavine so v formulacijo pogosto vključene zaradi njihovega ugodnega učinka na kožo in lahko posledično pripomorejo k zaščiti pred mikrobiološko okužbo. S pravilnim izborom in kombiniranjem takšnih snovi lahko zelo zmanjšamo količino klasičnih konzervansov v KI. Čeprav te snovi delujejo protimikrobro, pa jih, ker niso navedene v Prilogi 5 Uredbe o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009, ne smemo navajati kot konzervanse (10). Med takšne snovi lahko navedemo:

- **Srednjeverižne polarne snovi**, kot so maščobne kisline in njihovi monoestri z glicerolom, pentenil-alkohol, ki povzročijo hitre, a reverzibilne spremembe v prepustnosti bakterijskih membran (10).
- **Kelatorje**, kot so EDTA, mlečna, citronska in fitinska kislina, ki povečajo prepustnost membran mikroorganizmov in jih tako naredijo bolj dovtetne za učinke konzervansov. Poleg tega kelatorji vežejo železo, ki ga mikroorganizmi potrebujejo za metabolizem in rast (10).
- **Fenolne antioksidante**, katerih primarna funkcija je, da zakasnijo avto-oksidacijo nenasičenih lipidov, vendar nekateri (npr. propilgalat, kavna in ferulna kislina) izkazujejo tudi protimikrobne lastnosti (10).
- **Eterična olja in izvlečke**, ki se že uporabljajo v KI in so se izkazali za učinkovite in cenovno sprejemljive, ponekod so tudi izboljšali dermokozmetični profil končnega KI. Kljub temu je njihova uporaba za namene konzerviranja omejena zaradi tega, ker so bolj mikrobiološko specifični kot kemični konzervansi, ker lahko tako kot kemični konzervansi povzročajo alergije in ker imajo praviloma intenziven vonj. Čeprav z naravnim izvorom snovi še nismo zagotovili boljši toksikološki in dermokozmetični profil, lahko v določenih primerih pričakujemo boljšo biorazgradljivost (10).

1.3 KONZERVANSI

Konzervansi so snovi, ki jih dodamo kozmetičnim izdelkom z namenom, da zavrejo razvoj mikroorganizmov, ki so v KI prišli med proizvodnjo (in se njihovemu vnosu v KI ni bilo mogoče izogniti) ali preko uporabnika med uporabo. Nikakor pa konzervansov ne smemo uporabljati z namenom, da bi popravili slabo proizvodnjo prakso ali material slabe kakovosti (12, 13). Uveljavljeni konzervansi so navedeni v Prilogi 5 Uredbe o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009. Tam so navedene tudi največje dovoljene koncentracije konzervansov, omejitve in opozorila, ki se morajo nahajati tudi na etiketi posameznega KI (12).

V zadnjih letih so se začela bolj intenzivno postavljalci vprašanja o dejanski varnosti teh že uveljavljenih, klasičnih konzervansov. Predvsem parabenov in tistih, ki sproščajo formaldehid. Konzervansi, ki sproščajo formaldehid, kot je npr. imidazolidinil sečnina, naj bi povzročali kožne reakcije pri občutljivih posameznikih, pojavljala naj bi se tudi alergija na izotiazolinone (10). Parabeni z daljšo verigo, ki imajo šibke estrogene lastnosti (14), naj bi bili vzročno povezani z nastankom raka na dojkah (15). Čeprav je evropski Znanstveni odbor za varnost potrošnikov določil, da ni potrebe po spremembji ocene varnosti parabenom, se čedalje več uporabnikov izogiba vsem parabenom (10). Seveda pa niso vsi klasični

konzervansi deležni tako slabe kritike s strani potrošnikov. Nekateri so priznani tudi s strani certifikatov za naravno kozmetiko.

Veliko naravnih sestavin s protimikrobnim učinkom je že ustrezeno vrednotenih in vnesenih v Prilogo 5, ostale potencialne konzervanse pa je potrebno najprej preizkusiti ali so uspešni pri zaviranju mikrobiološke okužbe.

1.3.1 Protimikrobne sestavine uporabljenе pri delu

Organske kisline: Njihovo protimikrobeno delovanje zelo težko omejimo samo na en proces, ki bi se odvijal pri vseh organizmih in v vseh razmerah. Učinek organskih kislin je odvisen seveda od vrste kisline in njene koncentracije, razmer uporabe, pH in temperature, ter narave tarčnega mikroorganizma. Njihove učinke lahko razdelimo glede na njihovo velikost in pH, v katerem delujejo. Kratko- in srednjeverižne kisline pri nevtralnem pH primarno delujejo na celično membrano, ki jo pri povečani koncentraciji poškodujejo in povzročijo lizo celic (16). Salicilna, sorbinska, dehidroocetna in benzojska kislina so navedene v Prilogi 5, vendar lahko te snovi najdemo tudi v naravi. Sorbinska in benzojska kislina sta eni izmed prvih snovi, za katere so pokazali, da selektivno inhibirajo topotno inducirano ekspresijo proteinov v kvasovkah (17) Dehidroocetno kislino uporabljamо samostojno ali v kombinaciji z benzilalkoholom, obe možnosti dovoljujejo tudi certifikati za naravno kozmetiko (18) . Mandljevo kislino v medicini že dolgo uporabljamо zaradi njenih protibakterijskih lastnosti. V kozmetiki se pogosto nahaja v kemičnih luščilih za obraz v kombinaciji z drugimi alfa hidroksi kislinami (19). Janežev in levulinsko kislino, ki se nahajata v koromaču (*Pimpinella anisum*), uporabljamо za izboljševanje vonja KI in imata protimikrobeni učinek, vendar (še) nista klasificirani kot konzervansa (19).

Estri organskih kislin: Na splošno estri delujejo tako, da poškodujejo membrano celic. Njihovo delovanje je manj povezano s pH in bolj s topnostjo v lipidih (16). Glicerilkaprilat je monoester glicerola in kaprilne kisline, na trgu je na voljo pod imenom Dermosoft GMCY. Dobro deluje proti bakterijam, slabše pa proti glivam. Dobro zavira *Propionibacterium acne* in ga posledično veliko uporabljamо v izdelkih za nego aknaste kože kjer nudi podporo KI. Deluje tudi vlažilno. Njegovo delovanje kot konzervans izboljšajo cinkove soli (20).

Alkoholi: Alkohole že dolgo uporabljamо kot protimikrobena sredstva. Proti mikroorganizmom delujejo tako, da poškodujejo membrano celice, hitro denaturirajo proteine, kar seveda povzroči motnje v metabolizmu celice in na koncu lizo celic. Etanol deluje v širokem spektru proti bakterijam, glivam in virusom in ima optimalno delovanje pri koncentraciji 60 do 90 %. V KI ga najpogosteje uporabljamо kot topilo (21). Fenoksiethanol

prav tako pokriva širok spekter gram-pozitivnih in gram-ne negativnih bakterij, ter kvasovk (22). Uporabljamo ga kot alternativo potencialno škodljivim konzervansom, ki sproščajo formaldehid (23). V Prilogi 5 je naveden kot konzervans in ga v KI najpogosteje najdemo v kombinaciji s parabenimi. Ker pa se potrošniki želijo izogniti uporabi parabenov se uporablja alternativne kombinacije fenoksietanola in drugih snovi. Ena izmed takšnih je kombinacija fenoksietanola z etilheksilglicerolom, ki se je izkazala za prav tako učinkovito (24).

Eterična olja in rastlinski izvlečki : Eterična olja in rastlinske izvlečke že dolgo uporabljamo za najrazličnejše namene. Pogosta je uporaba v parfumeriji, prehrambni industriji in v ajurvedski medicini (25). Z izrazom eterično olje definiramo aromatične hlapne tekočine, ki jih izoliramo iz različnih delov rastlin s postopkom destilacije in hladnega stiskanja. Izvlečki so kompleksne zmesi spojih, ki jih izoliramo iz različnih delov rastlin z ekstrakcijo s primernim topilom (10). Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) se že tradicionalno uporablja proti многim boleznim. Njegovi izvlečki in eterično olje delujejo med drugimi tudi pomirjujoče, ščitijo hepatocite in delujejo protitumorno (26). Vsebuje veliko količino kavne kisline in njenih derivatov (npr. rožmarinsko kislino), ki poleg tega, da imajo antioksidativne lastnosti, delujejo tudi protimikrobnno (proti bakterijam, glivam in virusom) (26). Izvleček semen grenivke (*Citrus × paradisi*) deluje baktericidno in citotoksično, vendar je v zelo majhnih koncentracijah (redčitev 1 : 512) netoksičen za človeške fibroblaste, hkrati pa hrani svoje bakteriocidno delovanje. Deluje proti širokemu spektru gram-pozitivnih in gram-negativnih bakterij, in sicer tako, da poškoduje celično membrano mikroorganizmov (27). Izvleček semen grenivke deluje tudi dobro proti kožnim patogenom, med katerimi so *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur*, *Malassezia restricta* in ga je tako smiselno vključiti v KI za nego aknaste kože (28).

Peptidi : Pri procesu fermentacije mlečnikislinska bakterija *Leuconostoc kimchii* nakisa svoje okolje in sintetizira protimikrobnii peptidi kot obrambni mehanizem pred ostalimi mikroorganizmi. Poleg protimikrobnega učinka naj bi peptid deloval še vlažilno. Filtrat bakterijskega (*Leuconostoc kimchii*) fermenta korenine redkvice (*Raphanus sativus L.*) je na trgu na voljo pod imenom Leucidal (29).

1.3.2 Testiranje konzervansov

Glede na sestavo KI in predviden način uporabe izberemo ustrezen konzervans oz. kombinacijo konzervansov. Seveda lahko z znanimi kemijskimi, fizikalnimi in mikrobiološkimi lastnostmi posameznega konzervansa predvidevamo ustreznost, vendar samo ti podatki ne zadoščajo za določitev ustreznosti konzerviranja. KI je potrebno preveriti njegovo mikrobiološko ustreznost. V ta namen uporabljamo že poznane preizkuse, med katerimi so:

Določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), ki temelji na seriji redčitev testnega KI ali konzervansa v rastnem mediju. Redčitve inokuliramo s testnim sevom mikroorganizmov in inkubiramo. Prva redčitev, pri kateri po inkubaciji ni prišlo do rasti mikroorganizmov nam poda MIC, ki se ponavadi izrazi v ppm (parts per milion) izdelka (30).

Določanje conske inhibicije, kjer gre za določitev dovzetnosti mikroorganizma za konzervanse. Konzervans v različnih koncentracijah nanesemo na agarne plošče, na katerih so predhodno že naseljene s testne bakterije. Konzervans preide v agar in ustvari območje inhibicije rasti za testni mikroorganizem, katerega velikost je povezana z dovzetnostjo mikroorganizma za konzervans. Rezultate izražamo v mm inhibicijske cone okoli diska (30).

Metoda »time-kill« nam omogoči določitev časa preživetja mikroorganizmov in spekter delovanja. Princip delovanja je direkten kontakt KI ali konzervansa in specifičnega inokuluma za določen čas. Po končanem kontaktnem času se konzervans inaktivira. Opravi se serija redčitev v primerinem mediju, nato pa presteje preživele mikroorganizme (30).

Izzivni preizkus, imenovan tudi preizkus učinkovitosti konzervansa (preservative effectiveness test) je zelo primeren za testiranje KI, saj z njim preverjamo celotno formulacijo in ne posameznega konzervansa. S postopkom ugotovimo, ali je celotna formulacija ustrezeno konzervirana, da prepreči okužbo s strani nesterilnih sestavin in uporabe KI med njegovim predvidenim rokom trajanja (31).

Izzivni preizkus naredimo tako, da namerno okužimo testirani KI in ugotavljam, ali sestava izdelka zagotovi zadovoljivo zaščito pred mikroorganizmi. Mikroorganizme, s katerimi namerno okužimo testni izdelek, izberemo tako, da predstavljajo različne populacije, ki bi se lahko znašle v KI med samo uporabo. Bakterije ponavadi predstavlja *Staphylococcus aureus* (gram-pošitivna bakterija) in *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativna bakterija), glive pa *Aspergillus niger* (plesen) in *Candida albicans* (kvasovke) (32). Izzivni preizkus lahko izvajamo na več načinov:

- Inokulacija z enim mikroorganizmom: testni organizem v določeni (in znani) koncentraciji dodamo h KI. Da preprečimo redčenje izdelka in s tem konzervansa, dodana suspenzija mikroorganizmov ne sme presegati 1 % volumna izdelka.
- Inokulacija z različnimi mikroorganizmi: KI okužimo s suspenzijo, v kateri je več vrst mikroorganizmov. S tem simuliramo situacijo, ki se lahko pojavi med uporabo.
- Zaporedna inokulacija z različnimi mikroorganizmi: Strožja različica izzivnega preizkusa pri kateri v določenih intervalih na istem KI izvedemo več inokulacij. Preizkus izvajamo določeno število ciklov ali dokler KI ne podleže okužbi (31).

Po inkubaciji, pod specifičnimi pogoji v določenih časovnih intervalih, vzorčimo okužen KI, opravimo ustrezne redčitve in na testnih ploščah preštejemo preživele mikroorganizme. Iz števila preživelih mikroorganizmov po enačbah izračunamo faktor zmanjšanja rasti in določimo učinkovitost konzervansa (31).

Preden vzorec nanesemo na trdno gojišče, je potrebno konzervans inaktivirati. To lahko dosežemo z redčenjem v nevtralizacijski medij do tako nizke koncentracije, da nima več protimikrobnega učinka. Konzervans lahko inaktiviramo tudi z uporabo nevtralizatorja, ki zavre protimikrobeno aktivnost konzervansa (31).

Izzivni preizkus lahko izvajamo po različnih protokolih, ki se razlikujejo po količini vzorca, lastnosti inokuluma (vrsta in količina mikroorganizma v inokulum, ter količina inokuluma v vzorcu), načinu inokulacije testnega KI in inaktivaciji konzervansa, ter seveda kriteriju interpretacije rezultatov. Protokoli preizkusov se razlikujejo tudi po tem, za katere vrste KI jih uporabljam (33).

1.3.3 Standard ISO 11930

Mednarodni standard ISO 11930 zajema preizkus učinkovitosti konzerviranja in postopek za oceno splošne mikrobiološke zaščite KI, ki na podlagi ocene tveganja po standardu ISO 29621 nima majhnega tveganja. Izzivni preizkus, opisan v ISO 11930, je primarno namenjen tistim KI, ki se mešajo z vodo.

Vrednotenje učinkovitosti konzerviranja kozmetične formulacije v tem standardu temelji na inokulaciji testne formulacije s kalibriranim inokulumom. Število preživelih mikroorganizmov izmerimo ob definiranih intervalih v času do 28 dni. Za vsako časovno točko in vsako vrsto mikroorganizma se izračuna logaritemski faktor zmanjšanja rasti. Rezultate primerjamo z minimalnimi vrednostmi, ki so zahtevane za dosego kriterija A ali B. Vrednosti so navedene v Prilogi B tega standarda (34). Če formulacija doseže kriterij A,

potem je mikrobiološko tveganje sprejemljivo in izdelek dosega zahteve tega standarda. Če formulacija doseže kriterij B, je potrebna še dodatna analiza mikrobiološkega tveganja, s katero ocenimo dodatne kontrolne dejavnike, ki niso povezani s samo formulacijo KI (33). Takšen kontrolni dejavnik je ovojnina, kjer ocenimo, ali dopušča direkten kontakt uporabnika z KI, velikost ovojnine, način in pogostost uporabe KI, ipd. (34).

Celotna protimikrobna zaščita izdelka je kombinacija značilnosti formulacije, razmer proizvodnje in končnega pakiranja. Da lahko podamo splošno oceno mikrobiološke zaščite izdelka, je potrebno upoštevati mikrobiološko oceno tveganja skupaj z rezultati izzivnega preizkusa (34).

2. NAMEN DELA

Veliko snovi naravnega izvora, ki izkazujejo protimikrobne lastnosti, že uporabljamo kot sestavine kozmetičnih izdelkov, vendar vse niso razvrščene pod konzervanse. Ker si želimo te snovi uvesti v uporabo kot konzervanse, je potrebno izvesti preizkuse, ki bodo dokazali, da te snovi lahko zaščitijo kozmetične izdelke pred mikrobiološko okužbo, razrastom mikroorganizmov in jih ohranijo varne med rokom uporabe.

Testirali bomo kozmetične formulacije, ki jih bomo izdelali sami in v katerih bodo v vlogi konzervansa snovi naravnega izvora, ki so že ali pa še niso navedene v Prilogi 5 Uredbe o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009. Izbrali bomo 14 snovi, ki jih bomo v kozmetične formulacije vgradili v dveh koncentracijah. Uporabili bomo minimalno priporočeno koncentracijo in polovično vrednost maksimalne, ki je navedena v Prilogi 5.

Na testnih formulacijah bomo izvedli izzivni preizkus po protokolu ISO 11930. Za testni organizem bomo izbrali *Candida albicans*, ki je predstavnica gliv kvasovk. Z njim bomo masovno okužili posamezne formulacije.

Cilj dela je oceniti uspešnost posamezne snovi v določeni koncentraciji za zaviranje rasti *C. albicans*.

3. METODE in MATERIALI

3.1 MATERIALI

Materiali za izdelavo osnovne kozmetične formulacije, emulzije tipa O/V, so navedeni v preglednici 1, uporabljeni konzervansi pa v preglednici 2.

Preglednica 1: Kozmetične sestavine uporabljene za izdelavo osnovne emulzije.

Sestavina	INCI	Cos Ing	Proizvajalec
Faza A			
Karitejevo maslo	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	Skin conditioning, viscosity controlling	Dagmar Köhler
Mandljevo olje	Prunus Amygdalus Dulcis	Skin conditioning, viscosity controlling	Dagmar Köhler
Cetearil alkohol	Cetearyl Alcohol	Emollient, emulsifying, emulsion stabilising, foam boosting, opacifying, surfactant, viscosity controlling	Aliacura
Faza B			
Voda	Aqua	Solvent	demineralizirana voda, FFA
Cetearil gluko zid	Cetearyl Glucoside	Emulsifying, surfactant	Alexmo cosmetics
Faza C			
Glicerol, 85 % (ustreza Ph. Eur. 5.0)	Glycerin	Denaturant, hair conditioning, humectant, masking, oral care, perfuming, skin protecting, viscosity controlling	Dagmar Köhler
Ksantan	Xanthan Gum	Binding, emulsifying, emulsion stabilising, gel forming, skin conditioning, viscosity controlling, surfactant	Dragonspice Naturwaren

Preglednica 2: Testirane kozmetične sestavine naravnega izvora in uporabljeni konzervansi.

Konzervans	INCI	Proizvajalec	Uvrščenost v Prilog o 5 in dovoljena koncentracija
Vodna raztopina benzilalkohola in dehidroocetne kisline	Benzyl alcohol, Dehydroacetic acid, Aqua	MANSKE GmbH	DA, max 0,6 % (dehidroacetna kislina) , 1,0 % (benzilalkohol)
Dehidroocetna kislina	Dehydroacetic Acid	Aldrich Chemistry	DA, max 0,6 %
Salicilna kislina	Salicylic Acid	Kemika	DA, max 0,5 %
Levulinska kislina	Levulinic Acid	Aldrich Chemistry	NE
Glicerilkaprilat	Glyceryl Caprylate	Aliacura	NE
Sorbinska kislina	Sorbic Acid	Caelo	DA, max 0,6 %
Janeževa kislina	p-Anisic Acid	Sigma	NE
Fenoksiethanol	Phenoxyethanol	Fluka Analytical	DA, max 1,0 %
Filtrat bakterijskega fermenta ko renine redkvice (Leucidal Liquid SF)	Filtrat bakterijskega fermenta ko renine redkvice (<i>Raphanus sativus L.</i>)	Alexmo cosmetics	NE
Benzojska kislina	Benzoic Acid	Caelo	DA, max 0,5 % v KI, ki se ne sperejo
Etanol	Alcohol Denat.	Carlo Erba	NE
Izvleček semen grenivke	Aqua, Glycerin, Citrus Paradisi Seed Extract	Lekarne Maribor	NE
Mandljeva kislina	Mandelic Acid	Fluka Analytical	NE
Izvleček listov rožmarina (Flavoxan 14)	<i>Rosmarinus Officinalis</i> <td>Dragonspice Naturwaren</td> <td>NE</td>	Dragonspice Naturwaren	NE
Metilparaben	Methylparaben	Fagron B.V.	DA, max 0,4 % - posamezno ali 0,8 % - v kombinaciji z drugimi parabeni
Propilparaben	Propylparaben	Caesar & Loretz GmbH	DA, max 0,4 % - posamezno ali 0,8 % - v kombinaciji z drugimi parabeni

Preglednica 3: Ostale uporabljene snovi.

Snov	INCI	IUPAC	Funkcija
Mlečna kislina 90 %	Lactic Acid	2-Hidroksipropanojska kislina	nizanje pH formulacije
Natrijev hidrogenkarbonat	Sodium Bicarbonate	Natrijev hidrogen karbonat	višanje pH formulacije

Material za pripravo inokuluma

- *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179 BioBall™, Biomerieux
- BioBall Re-Hydration Fluid, Biomerieux

Material za določitev učinkovitosti konzervansov

Diluent

Sestava:

Pankreasni presnovek kazeina (Becton, Dickinson and Company)	0,08 g
Natrijev klorid : NaCl, M=58,44 g/mol (EMSURE)	0,68 g
Voda	80 mL

Priprava:

V vodi smo raztopili sestavine. Raztopino diluenta smo v ustrezнем vsebniku sterilizirali v avtoklavu na 121 °C za 15 min. Raztopina je po sterilizaciji primerna za uporabo, ko se ohladi pod 48 °C.

Nevtralizator

Sestava:

EUGON LT 100 nevtralizacijski medij (Biomerieux)	6,73 g
Voda	180 mL

Priprava:

V vodi smo raztopili prašek za pripravo nevtralizacijskega medija. Raztopino smo v ustrezнем vsebniku sterilizirali v avtoklavu na 121 °C za 15 min. Raztopina je po sterilizaciji primerna za uporabo, ko se ohladi pod 48 °C.

Gojišče za *C. albicans*

Sestava:

Sabouraud dextrose agar gojišče (SDA) (Biomerieux)	78 g
Voda	1200 mL

Priprava:

V vodi smo z mešanjem raztopili prašek za pripravo gojišča. Gojišče smo v ustreznem vsebniku sterilizirali v avtoklavu na 121 °C za 15 min. Raztopina je po sterilizaciji primerna za uporabo, ko se ohladi pod 48 °C.

3.2 METODE

3.2.1 Izdelava kozmetične formulacije, emulzije tipa O/V

Na vodni kopeli smo v pateni stalili komponente faze A. Staljeni in segreti fazi A smo dodali na 80 do 90 °C segreto fazo B. Zmes smo homogenizirali s paličnim mešalnikom približno 2 min. Po končani homogenizaciji smo dodali ustrezeno količino faze C.

Konzervanse, ki so v trdnem agregatnem stanju, smo dodali fazi A in jo z njo tudi segrevali. Konzervanse v tekočem agregatnem stanju smo dodani v homogenizirano zmes pred dodatkom faze C. Količine posamezne komponente so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava formulacij z minimalno in maksimalno vsebnostjo konzervansa

Konzervans	vsebnost konzervansa [g]		karitejevo maslo [g]	mandljivo olje [g]	cetearil alkohol [g]	voda [g]	cetearil glukozid [g]	Glicerol [g]	Ksantan [g]
	Min.	Max.							
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	0,2	0,4	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6
Dehidroocetna kislina	0,15	0,3	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6
Salicilna kislina	0,13	0,25	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6
Levulinska kislina	0,2	0,25	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6
Sorbinska kislina	0,15	0,3	2	11	0,5	79,95	0,8	5	0,6
Glicerilkaprilat	0,3	0,5	2	11	0,5	79,8	0,8	5	0,6
Janeževa kislina	0,05	0,15	2	11	0,5	80,05	0,8	5	0,6
Fenoksiethanol	0,25	0,5	2	11	0,5	79,85	0,8	5	0,6
Leucidal	1	1,5	2	11	0,5	79,1	0,8	5	0,6
Benzojska kislina	0,13	0,25	2	11	0,5	79,97	0,8	5	0,6
Etanol	14	17	2	11	0,5	66,1	0,8	5	0,6
Izvleček semen grenivke	0,1	0,5	2	11	0,5	80	0,8	5	0,6
Mandljeva kislina	0,1	0,3	2	11	0,5	80	0,8	5	0,6
Izvleček listov rožmarina	0,2	0,4	2	11	0,5	79,9	0,8	5	0,6
Negativna kontrola	0,0		2	11	0,5	80,1	0,8	5	0,6
Pozitivna kontrola (parabeni)	(0,07MePa + 0,03PrPa) 0,1		2	11	0,5	80,0	0,8	8	0,6

Ker je za delovanje konzervansov pomembna tudi pH vrednost, smo jo po končani izdelavi tudi preverili. Če je bila pH vrednost izven območja 5 do 5,5, smo dodajal mlečno kislino za zmanjšanje pH oz. natrijev hidrogenkarbonat za zvečanje pH vrednosti.

Izdelali smo 30 izdelkov, od tega jih je 28 vsebovalo testirane konzervanse, 1 izdelek ni vseboval konzervansov in je služil kot negativna kontrola, 1 izdelek pa je vseboval zmes parabenov in je služil kot pozitivna kontrola. Izdelke smo hranili v sterilnih plastičnih vsebnikih v hladilniku.

3.2.2 Preizkus nevtralizatorja

S preizkusom učinkovitosti smo potrdili, da je uporabljen nevtralizator res nevtraliziral protimikrobn učinek konzervansa, brez da bi škodoval mikroorganizmom.

S kalibrirano suspenzijo *C. albicans* smo inokulirali vzorce nevtralizatorja, v prisotnosti (Nvf) in odsotnosti (Nvn) formulacije.

Nevtralizator je učinkovit, če:

- Število kolonij vzorca kontrole inokuluma (Nv) in vzorca kontrole (Nvn) sovpada,
 - Je število kolonij vzorca formulacije (Nvf) vsaj 50 % števila Nvn.
- a) Pripravili smo suspenzijo mikroorganizmov, ki vsebuje 10^3 cfu/ml *C. albicans*, tako da smo ustrezno redčili kalibrirano suspenzijo *C. albicans* (10^6 - 10^7 cfu/ml *C. albicans*).
 - b) V plastični vsebnik smo s sterilno plastično palčko prenesli 1 g posamezne formulacije in 9 ml nevtralizatorja, ter dobro premešali (Nvf). Prav tako smo pripravili kontrolo, kjer smo uporabili isti nevtralizator, formulacijo pa zamenjali z 1 ml diluenta (Nvn).
 - c) Vzorce in kontrolo smo pustili na sobni temperaturi 30 ± 15 min. V tem času nevtralizator izniči protimikroben učinek konzervansa.
 - d) Vzorce in kontrolo smo inokulirali z 1 ml inokuluma in dobro premešali.
 - e) Pripravili smo še kontrolo inokuluma (Nv), in sicer tako, da smo 10 ml diluenta inokulirali z 1 ml inokuluma (in dobro premešali).
 - f) 1 ml mešanice smo prenesli na petrijevko in jo prelili z 20 ml gojišča SDA, premešali in pustili, da se strdi. To smo naredili za vsak testni vzorec, kontrolo in kontrolo inokuluma. Delali smo v dveh ponovitvah.
 - g) Inkubirali smo 48 h na $32,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$).

Opomba: naredili smo po 2 ponovitvi za vzorec Nv in Nvn.

Test smo opravljali samo z izdelki, ki so vsebovali večjo koncentracijo konzervansov. Predvidevali smo, da bo nevtralizator onemogočil delovanje manjšim koncentracijam, če se bo izkazalo, da je onemogočil delovanje večji koncentraciji konzervansa v izdelku. Rezultati so navedeni v preglednici 9, ki se nahaja v prilogi.

3.2.3 Test učinkovitosti konzervansa

Priprava vzorcev

V sterilni plastični vsebnik smo prenesli 20 g testne formulacije.

Inokulacija vzorcev

K formulaciji smo dodali 0,2 ml pripravljenega inokuluma, z vsebnostjo 10^6 - 10^7 cfu/ml *C. albicans*. S tem smo dosegli končno vsebnost med 10^4 in 10^5 cfu/ml *C.albicans* v posameznem vzorcu. Posamezen vzorec smo dobro premešali, da smo zagotovili homogeno porazdelitev inokuluma.

Vsebnike z inokulirano formulacijo smo hranili v temnem prostoru na $22,5 \pm 2,5$ °C.

Začetna vsebnost *C. albicans* v formulaciji predstavlja N₀ (št. prisotnih mikroorganizmov ob inokulaciji)

Vzorčenje in številčenje

- Ob vsaki točki vzorčenja, po 7 dneh (T7), po 14 dneh (T14) in po 28 dneh (T28), smo vzorčili 1 g inokulirane formulacije.

K 1 g vzorca smo dodali 9 ml nevtralizatorja in dobro premešali (da smo zagotovili homogenost).

Razredčene vzorce smo pustili na sobni temperaturi približno 30 min (± 15 min), da je nevtralizator zavrl delovanje konzervansa.

- Začetno redčitev v nevtralizatorju smo redčili še 10-krat in 100-krat z diluentom, da smo dosegli končni, 100-kratni in 1000-kratni, redčitvi inokulirane formulacije.
- Te redčitve (100- in 1000-kratno) smo nanesli na trdno gojišče in ročno prešteli preživele mikroorganizme.

Na petrijevko smo nanesli 1 ml posamezne redčitve in prelili s približno 15 do 20 ml gojišča SDA, ki je bilo ohlajeno pod 48 °C. Redčeno formulacijo in medij smo z rahlim kroženjem dobro premešali in pustili, da se je medij ohladil in strdil.

- d) Postopek smo ponovili v vseh časovnih točkah. Inokulacija, redčenje in nanašanje na gojišča so potekali v LAF-komori.

Podatki o številu preštetih kolonij za posamezen izdelek ob časovnih točkah vzorčenja se nahajajo v preglednicah 10, 11 in 12. Preglednice se nahajajo v prilogi.

Določitev števila preživelih mikroorganizmov ob času vzorčenja (N_x)

Za izračun N_x uporabimo naslednjo enačbo:

$$N_x = C/(V \times d)$$

kjer je:

N_x - število preživelih mikroorganizmov ob času vzorčenja [cfu/ml]

C – povprečno število kolonij na plošči ob določeni časovni točki

V – volumen vzorca, nanesenega na posamezno ploščo [1ml]

d – faktor redčenja

Določitev zmanjšanja števila kolonij (R_x)

Za izračun R_x uporabimo naslednjo enačbo:

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

Kjer je:

R_x - zmanjšanje števila kolonij ob času vzorčenja v logaritemskih enotah

N_0 - število mikroorganizmov ob inokulaciji (T0)

N_x - število preživelih mikroorganizmov v posamezni točki vzorčenja

Negativna vrednost R_x nakazuje na razrast mikroorganizma v formulaciji.

4. REZULTATI

Rezultati so predstavljeni v preglednicah 5, 6 in 7. Vsaka preglednica predstavlja rezultate za drugo časovno točko merjenja, sledijo si kronološko.

Preglednica 5: Logaritemska sprememba števila *C. albicans* po sedmih dneh.

Oznaka izdelka	Uporabljeno število kolonij za izračun	R ₇ (Logaritemska sprememba števila kolonij)
Manjša koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	15,5	1,8
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>500	<0,3
Sorbinska kislina	0	>3
Glicerilkaprilat	0	>3
Janeževa kislina	>500	<0,3
Fenoksiethanol	>400	<0,4
Leucidal	>450	<0,35
Benzojska kislina	>400	<0,4
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0	>3
Mandljeva kislina	>500	<0,3
Izvleček listov rožmarina	>500	<0,3
Negativna kontrola	>500	<0,3
Večja koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	0	>3
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>500	<0,3
Sorbinska kislina	0	>3
Glicerilkaprilat	0	>3
Janeževa kislina	>325	<0,49
Fenoksiethanol	>400	<0,4
Leucidal	>500	<0,3
Benzojska kislina	0	>3
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0	>3
Mandljeva kislina	>300	<0,52
Izvleček listov rožmarina	>400	<0,4
Parabeni (pozitivna kontrola)	>400	<0,4

Preglednica 6: Logaritemska sprememba števila *C. albicans* po štirinajstih dneh.

Oznaka izdelka	Uporabljeno število kolonij za izračun	R ₁₄ (Logaritemska sprememba števila kolonij)
Manjša koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	2,5	2,60
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>500	<0,3
Sorbinska kislina	8	2,10
Glicerilkaprilat	0	>3
Janeževa kislina	≈31	1,51
Fenoksiethanol	>500	<0,3
Leucidal	>500	<0,3
Benzoidska kislina	203,5	0,70
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0	>3
Mandljeva kislina	>500	<0,3
Izvleček listov rožmarina	>500	<0,3
Negativna kontrola	>500	<0,3
Večja koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	0	>3
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>500	<0,3
Sorbinska kislina	0	>3
Glicerilkaprilat	0	>3
Janeževa kislina	0	>4
Fenoksiethanol	>300	<0,52
Leucidal	7	2,15
Benzoidska kislina	0	>3
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0	>3
Mandljeva kislina	>300	<0,52
Izvleček listov rožmarina	>500	<0,3
Parabeni (pozitivna kontrola)	>500	<0,3

Preglednica 7: Logaritemska sprememba števila *C. albicans* po osemindvajsetih dneh.

Oznaka izdelka	Uporabljeno število kolonij za izračun	R ₂₈ (Logaritemska sprememba števila kolonij)
Manjša koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	0	>3
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>300	<0,52
Sorbinska kislina	0	>3
Glicerilkaprilat	0	>3
Janeževa kislina	65	1,19
Fenoksiethanol	>300	<0,52
Leucidal	>1000	<0
Benzoidska kislina	26	1,59
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0	>3
Mandljeva kislina	>1000	<0
Izvleček listov rožmarina	>500	<0,3
Negativna kontrola	>1000	<0
Večja koncentracija		
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol	0	>3
Dehidroocetna kislina	0	>3
Salicilna kislina	0	>3
Levulinska kislina	>1000	<0
Sorbinska kislina	225	0,65
Glicerilkaprilat	26,5	1,58
Janeževa kislina	0	>4
Fenoksiethanol	139,5	0,86
Leucidal	0,5	2,30
Benzoidska kislina	3,5	2,46
Etanol	0	>3
Izvleček semen grenivke	0,5	3,30
Mandljeva kislina	160	0,80
Izvleček listov rožmarina	>300	<0,52
Parabeni (pozitivna kontrola)	>1000	<0

Kriterij ocenjevanja učinkovitosti konzervansa po standardu ISO 11930, ki je naveden v Prilogi B, zahteva, da se število kolonij *C. albicans* v prvi časovni točki zmanjša za vsaj 1 logaritemsko enoto in da število kolonij v času trajanja preizkusa ostane enako ali pa se zmanjša. Če so ti pogoji doseženi, uporabljeni snov ustrezajo kriteriju A. Za ustrezost formulacije kriteriju B upoštevamo enake pogoje, le da prvo časovno točko izpustimo. Ustreznosti posameznih formulacij določenemu kriteriju so navedene v preglednici 8.

Preglednica 8: Ustrezost testiranih snovi po kriteriju standarda ISO 11930; oznaka n pomeni manjšo, oznaka v večjo koncentracijo.

Uporabljen konzervans	Ustreza kriteriju
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol (n)	A
Dehidroocetna kislina (n)	A
Salicilna kislina (n)	A
Levulinska kislina (n)	ne ustreza
Sorbinska kislina (n)	B
Glicerilkaprilat (n)	A
Janeževa kislina (n)	B*
Fenoksietanol (n)	ne ustreza
Leucidal (n)	ne ustreza
Benzojska kislina (n)	ne ustreza
Etanol (n)	A
Izvleček semen grenivke (n)	A*
Mandljeva kislina (n)	ne ustreza
Izvleček listov rožmarina (n)	ne ustreza
Dehidroocetna kislina, benzilalkohol (v)	A
Dehidroocetna kislina (v)	A
Salicilna kislina (v)	A
Levulinska kislina (v)	ne ustreza
Sorbinska kislina (v)	ne ustreza
Glicerilkaprilat (v)	ne ustreza
Janeževa kislina (v)	B
Fenoksietanol (v)	ne ustreza
Leucidal (v)	B*
Benzojska kislina (v)	ne ustreza
Etanol (v)	A
Izvleček semen grenivke (v)	A
Mandljeva kislina (v)	ne ustreza
Izvleček listov rožmarina (v)	ne ustreza

*na gojščih je prisotna tudi tuja okužba

5. RAZPRAVA

Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, ali so izbrane snovi naravnega izvora zmožne zavirati rast in razvoj *C. albicans* v kozmetični formulaciji in pri kateri od izbranih koncentracij. V ta namen smo kozmetične formulacije, ki so imele kot konzervans dodane samo preiskovane snovi, po namerni masovni okužbi s *C. albicans* pustili starati 28 dni na sobni temperaturi. Po 28 dneh staranja in treh časovnih točkah merjenja smo na podlagi meritev in kriterija za določevanje učinkovitosti konzervansa določili ustreznost ali neustreznost posamezne snovi in njene koncentracije.

Učinkovitost konzervansa po standardu ISO 11930 določamo na podlagi ustreznosti kriteriju A ali B. Kriteriju A konzervans ustreza, če se je v sedmih dneh inkubacije rast *C. albicans* zmanjšala vsaj za desetkrat in v nadaljnjih dneh testiranja ni prišlo do povečanja rasti. V takšnem primeru je formulacija zaščitenaa pred razrastjo *C. albicans*, brez, da bi morali upoštevati dodatne dejavnike zaščite. Za ustreznost kriteriju B pa kot prvo časovno točko upoštevamo 14 dni inkubacije, pri kateri mora priti do zmanjšanja števila *C. albicans* vsaj za 1 log enoto (desetkrat). Po 28 dneh testiranja ne sme priti do povečanja rasti. V takšnem primeru je raven zaščite zadovoljiva le, če analiza tveganja pokaže, da lahko s kontrolnimi dejavniki, ki niso povezani s formulacijo, dvignemo raven zaščite na sprejemljivo. Med takšne kontrolne dejavnike spada predvsem ovojnina in njene lastnosti. Pri vsaki časovni točki je dovoljeno odstopanje vrednosti za 0,5 logaritemske enote.

Kriteriju A, tako v manjši kot večji testirani koncentraciji, ustrezano zmes dehidroocetne kislina in benzilalkohola, dehidroocetna kislina, salicilna kislina in etanol. Izvleček semen grenivke je zavaroval formulacijo le v večji koncentraciji. Pri manjši koncentraciji se *C. albicans* sicer ne razrašča in bi konzervans lahko označili kot ustreznega po kriteriju A, vendar se na gojiščih, ob vseh časovnih točkah razrašča tuja okužba. Prisotna sta namreč dva tuja mikroorganizma. V majhni koncentraciji je formulacijo zavaroval glicerilkaprilat, a pri večji bil neuspešen. Rezultati za glicerilkaprilat so se sprva zdeli presenetljivi, saj bi pričakovali, da bo večja koncentracija bolj uspešna. Kasneje smo iz grafov, ki jih podaja proizvajalec (21) razbrali, da je najboljše rezultate dala ravno majhna koncentracija konzervansa, vendar v kombinaciji s cinkom.

Kriteriju B ustreza janeževa kislina v večji koncentraciji. Manjša koncentracija tudi ustreza kriteriju B, vendar se na gojiščih pojavlja tuja okužba, tako da zanjo ne moremo trditi, da bi bila primerna za uporabo. Enaka situacija se pojavi pri veliki koncentraciji Leucidala, tudi tukaj se na gojiščih pojavita dva tuja mikroorganizma. Manjša koncentracija Leucidala ni bila uspešna pri zaščiti formulacije. Sorbinska kislina v manjši koncentraciji ustreza kriteriju B. Presenetljivo je to, da večja koncentracija sorbinske kisline ni zaščitila kozmetične formulacije. Rezultati za sorbinsko kislino so presenetljivi predvsem zaradi tega, ker literatura navaja, da naj bi bila kislina uspešna predvsem pri zaščiti pred kvasovkami. Navajajo tudi, da sorbinsko kislino nekateri mikroorganizmi presnavljajo, vendar *C. albicans* ni med njimi (37).

Kozmetične formulacije v nobeni koncentraciji niso zaščitili levulinska kislina, benzojska kislina, mandljeva kislina, fenoksietanol in izvleček listov rožmarina. Ker je benzojska kislina že uvrščena med konzervanse smo za obe uporabljeni koncentraciji pričakovali, da bosta uspešno zavrli rast *C. albicans*. Majhna koncentracija v nobeni točki vrednotenja ni pokazala učinkovitosti, večja pa je bila uspešna vse do zadnje točke vrednotenja. Tudi ob upoštevanju dovoljenega odstopanja večja koncentracija ne doseže ustrezne vrednosti, se ji pa zelo približa. Nadaljnje bi bilo smiselno preveriti katera koncentracija med to, ki smo jo preizkusili in največjo dovoljeno zaščiti kozmetično formulacijo pred razrastom *C. albicans*.

Za izvleček listov rožmarina smo pričakovali, da bo uspešen pri zaviranju rasti *C. albicans*, saj tako eterično olje, v emulzijah tipa O/V, kot izvlečke rožmarina že tradicionalno uporabljamo za zdravljenje ustnih kandidoz pri ljudeh (28). Pričakovanja je še podprla ugotovitev, da na rast *C. albicans* vpliva veliko eteričnih olj in izvlečkov (27). Sklepamo, da smo uporabili premajhno koncentracijo izvlečka, saj so v raziskavi (27) kjer so uporabili metodo z redčenjem v agarju ugotovili, da je MIC za *C. albicans* 1 %, pri preizkuusu pa smo uporabljali za več kot pol manjše koncentracije.

Tudi za fenoksietanol smo pričakovali, da bo bolj uspešen pri zaviranju rasti *C. albicans*, saj ga literatura (23) označuje za učinkovitega proti glivam. V raziskavi (38), kjer so preizkušali diazolidinil sečnino, metilkloroizotiazolinon in metilizotiazolinon v kozmetičnih emulzijah, so ugotovili, da emulzije brez dodatka fenoksietanola niso bile ustrezeno zaščitene pred *C. albicans*. Dodatek fenoksietanola h kateremukoli od naštetih konzervansov pa je zagotovil ustrezeno zaščito emulzije. Iz naših rezultatov lahko po tem sklepamo, da uporabljeni koncentraciji fenoksietanola sami po sebi nimata antimikotičnega učinka, lahko pa bi ju uporabili kot dodatek h drugim konzervansom in mogoče dosegli sinergističen učinek.

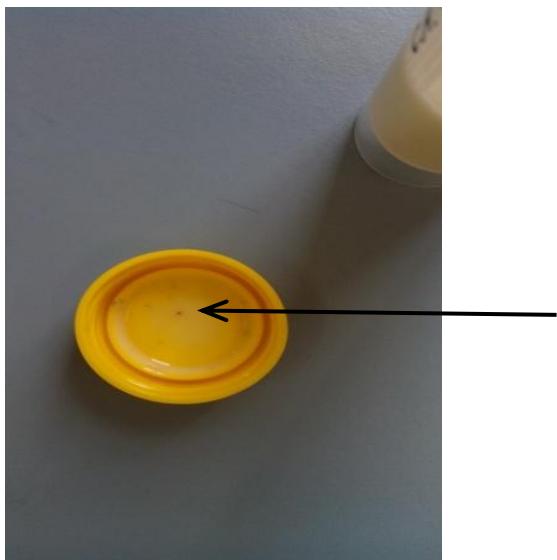
Po vizualnem pregledu smo ugotovili, da so formulacije, ki so vsebovale levulinsko kislino, mandljevo kislino in izvleček listov rožmarina bile že vidno okužene, kot je prikazano na slikah 1, 2 in 3. Zanimivo je, da se po izgledu okužbe med sabo razlikujejo, na ploščah pa so zrasle na pogled iste kolonije. Formulacija, ki je vsebovala fenoksietanol, je imela manjše grudice, nastanek katerih bi lahko pripisali okužbi s tujim mikroorganizmom.



Slika 1: Vidna okužba formulacije, ki vsebuje levulinsko kislino



Slika 2: Vidna okužba formulacije, ki vsebuje mandljevo kislino



Slika 3: Okužba na pokrovčku izdelka, ki vsebuje ekstrakt rožmarina

Pri vseh izdelkih s tujo okužbo je prisoten mikroorganizem, ki tvori male, bele, pikčaste kolonije in se razrašča v velikem številu. Le v primeru treh izdelkov se sočasno pojavlja še drugi mikroorganizem, ki tvori večje belkaste kolonije puhastega videza in je prisoten v manjšem številu. Okužba z mikroorganizmom, ki tvori večje kolonije se pojavi pri formulacijah, ki vsebujejo levulinsko kislino, izvleček grenivkinih semen in izvleček listov rožmarina. Sklepamo, da so bile okužene že osnovne formulacije, saj se ista okužba pojavi v vseh časovnih točkah merjenja in v času trajanja preizkusa počasi narašča.

Ker je delo potekalo v čistem laboratoriju s čisto opremo, inokulacija, redčenje in nanos na gojišče pa v LAF-komori, je najbolj očiten krivec za tujo okužbo izdelka voda, ki predstavlja približno 80 % formulacije in seveda tudi zunanjo fazo emulzije. Voda, ki smo jo uporabili za izdelavo kozmetičnih formulacij je bila prečiščena s postopkom reverzne osmoze. Princip postopka je ta, da vodo z določenim tlakom potiskamo skozi polprepustno membrano v nasprotni smeri procesa osmoze in jo tako očistimo. Kljub temu, da ta postopek zagotavlja do 99 % odstranitev delcev in mikroorganizmov (39), je voda dovedena v laboratorij preko cevovoda. V vodovodni napeljavi pa lahko ta prečiščena voda tudi stoji in se med tem časom okuži.

Prečiščeno vodo smo uporabljali tako pri izdelavi kozmetičnih formulacij kot pri pripravi diluenta, nevtralizatorja in gojišča. Možnosti, da smo formulacije okužili prav z vodo je bilo preko poteka preizkusa veliko, zato je tudi sum na onesnaženo vodo največji. Druge možnosti za okužbo so še ostale sestavine in pribor, ki smo ga uporabljali pri izdelavi formulacij.

Kljub uporabi vode preko celotnega eksperimentalnega dela, sumimo, da je prišlo do napake že na začetku, med izdelavo formulacij. To je smiselno sklepati, saj se je že pri testiranju učinkovitosti nevtralizatorja na gojišču, kjer je bila nanesena negativna kontrola (izdelek, ki ni vseboval konzervansa) pojavila tuja okužba. Tudi pri pozitivni kontroli (izdelek, ki je vseboval mešanico dveh parabenov) se na gojiščih v vseh časovnih točkah pojavi tuja okužba kot tudi *C. albicans*. Zaradi teh napak lahko na podlagi pridobljenih rezultatov le okvirno ocenimo učinkovitost posameznih konzervansov. Za neustreznost preizkusa sumimo slabo proizvodno prakso, onesnažene vhodne sestavine, predvsem pa vodo in premajhno koncentracijo uporabljenih parabenov pri pozitivni kontroli.

Zaradi dodatne okužbe izdelkov smo preizkus s *C. albicans* ponovili in za pripravo kozmetičnih formulacij uporabili sveže prečiščeno vodo. Ugotovil smo, da je za dodatno okužbo res bila kriva onesnažena voda. Prav tako smo potrdili, da smo v našem preizkusu uporabili premajhno koncentracijo parabenov, da bi ti lahko zaščitili izdelek.

6. SKLEP

Cilj diplomskega dela je bilo ugotoviti, ali so snovi naravnega izvora zmožne zavirati rast in razvoj *Candida albicans* v kozmetični formulaciji, emulziji tipa O/V in pri kateri od uporabljenih koncentracijah. Ugotovili smo, da po standardu ISO 11930 kriteriju A ustreza večja in manjša koncentracija zmesi dehidroocetne kisline in benzilalkohola, dehidroocetne kisline, salicilne kisline, etanola in izvlečka semen grenivke, ter manjša koncentracija glicerilkaprilata. Kriteriju B v večji in manjši koncentraciji ustreza janeževa kislina, v visoki Leucidal in v manjši sorbinska kislina. Standardu ne ustreza levulinska kislina, benzojska kislina, mandljeva kislina, fenoksietanol in izvleček listov rožmarina. Največja težava, ki se je pojavljala, je bila tuja okužba izdelkov in neustreznost pozitivne kontrole. Nadaljnja raziskava je zajemala ponovitev preizkusa z na novo pripravljenimi formulacijami v bolj strogih higieniskih razmerah in uporabo ustrezejše kombinacije parabenov. Smiselno bi bilo raziskati katero od kombinacij testiranih snovi v upanju po sinergističnem učinku in tudi kombinacijo testiranih snovi z različnimi vlažilci in kelatorji.

7. LITERATURA

- (1) Smart, R., D. F. Spooner: Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. J. Soc. Cosmet. Chem. 1972; 23: 721-737.
- (2) <http://www.safeinfusiontherapy.com/cps/rde/xchg/hc-safeinfusion-en-int/hs.xsl/7249.html>
(Dostopano: 19.1.2015 15:56)
- (3) Daniel K. Brannan: Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook, 1. Izdaja, CRC Press, Florida, 2000: 143-161.
- (4) Iain Moore: Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry, 2. Izdaja, William Andrew Inc. , New York, 2009: 79-92.
- (5) Kenneth Ryan, C. George Ray, Nafees Ahmad, W. Lawrence Drew, James Plorde: Sherris Medical Microbiology, 5. Izdaja, McGraw-Hill Education, New York City, 2010: 101-738.
- (6) Ray TL: Systemic candidiasis. Dermatologic Clinics 1989; 7: 259-268.
- (7) P. Lelarge, J. Mariot: Candidoses systémiques. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 1992; 11: 558-575.
- (8) R. Baird, Sally F. Bloomfield: Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Toiletries, 2. Izdaja, Taylor & Francis Ltd. , London, 1996: 9-30.
- (9) Buzek, J., and B. Ask. "Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products."Official Journal of the European Union L 342 (2009).
- (10) Varvaresou A., S. Papageorgiou, E. Tsirivas, E. Protopapa, H. Kintziou, V. Kefala, C. Demetzos: Self-preserving cosmetics. International journal of cosmetic science 2009; 31: 163-175.
- (11) Kerdudo, Audrey, Fabien Fontaine-Vive, Alexandre Dingas, Chrystel Faure, and Xavier Fernandez: Optimization of cosmetic preservation: water activity reduction. International journal of cosmetic science 2015; 37: 31-40.
- (12) Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Priloga V. (Dostopno 8.8.2015 na naslovu: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:sl:PDF>)

- (13) Rosamund M. Baird, Norman A. Hodges, Stephen P. Denyer: Handbook of Microbiological Quality Control in Pharmaceuticals and Medical devices, 1. Izdaja, Taylor & Francis Ltd, United Kingdom, 2000: 168-187.
- (14) Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o kozmetičnih izdelkih, 2013, Uradni list republike Slovenije, 7. Člen, 61: 7310
<https://www.uradni-list.si/1/content?id=114088> Dostopno: 12.2.2015)
- (15) Lemini, Cristina, Ruth Jaimez, María Estela Ávila, Yanira Franco, Fernando Larrea, Ana Elena Lemus: In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. Toxicology and industrial health 2003; 19: 69-79.
- (16) Darbre, P. D., A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, G. S. Pope: Concentrations of parabens in human breast tumours. Journal of applied toxicology 2004; 24: 5-13.
- (17) Lonza Inc., Geogard 221 Preservative, USA,
<https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/762/31266/Geogard-221> (Dostopno: 10.8.2015)
- (18) P. Michael Davidson, John N. Sofos, A. Larry Branen: Antimicrobials in Food, 3. Izdaja, CRC Press, Broken Sound Parkway NW, 2005: 11-38.
- (19) Putten, P. L.: Mandelic acid and urinary tract infections. Antonie van Leeuwenhoek 1979; 45: 622-623.
- (20) M. Stratford, T. Eklund: Food Preservatives, 2. Izdaja, Springer Science & Business Media, New York, 2003: 48-84.
- (21) Drstraetmans, Multifunctional additives: Dermosoft GMCY,
<https://www.ulprospector.com/en/la/PersonalCare/Detail/2448/77571/dermosoft-GMCY>
(Dostopno: 10.8.2015)
- (22) McDonnell, Gerald, A. Denver Russell: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical microbiology reviews 1999; 12: 147-179.
- (23) Bohn, S., A. J. Bircher: Phenoxyethanol-induced urticaria. Allergy 2001; 56: 922-923.

- (24) Wineski Lawrence E., A. W. English: Phenoxyethanol as a nontoxic preservative in the dissection laboratory. Cells Tissues Organs 1989; 136: 155-158.
- (25) <http://www.schulke-microsites.de/media-cosmetic-preservation/A-Reliable-Alternative-for-Traditional-Preservative-Systems-SOeFW-2006.pdf> (Dostopno: 11.3.2015 ob 16:45)
- (26) Cowan, Marjorie Murphy: Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews 1999; 12: 564-582.
- (27) Hammer, Katherine A., C. F. Carson, T. V. Riley: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of applied microbiology 1999; 86: 985-990.
- (28) CA, RA: Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian journal of experimental biology 1999; 37: 124-131.
- (29) Heggers, John P., John Cottingham, Jean Gusman, Lana Reagor, Lana McCoy, Edith Carino, Robert Cox, Jian-Gang Zhao: The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. The Journal of Alternative & Complementary Medicine 2002; 8: 333-340.
- (30) Ha, Yu-Mi, Bo-Bae Lee, Hee-Jung Bae, Kyoung-Mo Je, Soon-Rae Kim, Jae-Suk Choi, In-Soo Choi: Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against human skin pathogens. Journal of Life Science 2009; 19: 94-100.
- (31) Active Micro Technologies, Leucidal Liquid, USA,
<http://activemicrotechnologies.com/product/leucidal-liquid-sf/> (Dostopno: 10.8.2015)
- (32) André O. Barel, Marc Paye, Howard I. Maibach: Handbook of Cosmetic Science and Technology, 2. Izdaja, CRC Press, Broken Sound Parkway NW, 2005: 223-231.
- (33) Russell, A. D.: Challenge testing: principles and practice. International journal of cosmetic science 2003; 25: 147-153.
- (34) Pharmacopoeia, British. "Version 6." Efficacy of antimicrobial preservation. Appendix XVI C. London: The Stationery Office (2002): A322-4.
- (35) Siegert, W.: ISO 11930—A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW Journal-Seifen Ole Fette Wachse 2012; 138: 44-52.

(36) Internacionalna organizacija za standarde, ISO, 11930, Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product, 2012.

(37)https://www.extension.iastate.edu/wine/sites/www.extension.iastate.edu/files/wine/Sorbic_Acid1.pdf (Dostopno: 11.8.2015 ob 16:20)

(38) M. D. Lundov J. D. Johansen, C. Zachariae, L. Moesby: Low-level efficacy of cosmetic preservatives. International Journal of Cosmetic Science 2011; 33: 190-169.

(39) Water purification systems purite: The importance of water purification in cosmetics manufacturing. (http://www.purite.com/wp-content/uploads/2014/03/Purite-Cosmetics_The-importance-of-purified-water-White-Paper-Feb-2014.pdf Dostopno: 11.8.2015 ob 10:41)