

# Izrada funkcionalnog kozmetičkog pripravka s probioticima i postbioticima uz dodatak vodenog ekstrakta maginje

---

**Horvatinović, Marta**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:042503>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marta Horvatinović**  
0291004402

**IZRADA FUNKCIONALNOG KOZMETIČKOG PRIPRAVKA S PROBIOTICIMA I  
POSTBIOTICIMA UZ DODATAK VODENOG EKSTRAKTA MAGINJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

**Mentor:** dr. sc. Deni Kostelac

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Izrada funkcionalnog kozmetičkog pripravka s probioticima i postbioticima uz dodatak vodenog ekstrakta maginje  
Marta Horvatinović, 0291004402

**Sažetak:** Posljednjih godina raste interes potrošača za funkcionalnu kozmetiku i dermatokozmetiku. Navedene grupe proizvoda sadrže aktivne komponente kao što su probiotici i biljni ekstrakti s visokim sadržajem flavonoida, polifenola i vitamina te kao takvi pokazuju sposobnost poboljšanja različitih stanja kože. Različite neistražene vrste probiotika i postbiotika potencijalne su aktivne komponente u proizvodnji kozmetičkih pripravaka. Stoga je cilj ovoga rada bio izraditi funkcionalni kozmetički pripravak uz dodatak probiotičke kulture *Lactiplantibacillus plantarium* S1 te vodenog ekstrakta maginje (*Arbutus unedo* L.) te ispitati njegov antimikrobni potencijal, sposobnost inhibicije formiranja biofilмова patogene *Candida albicans* ATCC®10231™, sposobnost koagregacije s istim patogenom te antioksidacijski potencijal pri uklanjanju DPPH slobodnih radikala. Dobiveni rezultati pokazali su kako stanice *Lpb. plantarium* S1 značajno inhibiraju formaciju biofilмова *C. albicans* i rast ovog patogena. Također, dodatak vodenog ekstrakta maginje u uzorak kreme uvelike je povećao antioksidacijsku sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala ovog pripravka.

**Ključne riječi:** kozmetički pripravci, probiotici, biljni ekstrakti, postbiotici, antimikrobna svojstva, antioksidacijska svojstva, biofilmovi

**Rad sadrži:** 27 stranica, 8 slika, 1 tablicu, 48 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Deni Kostelac

**Datum obrane:** 17. lipnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Production of a functional cosmetic preparation with probiotics and postbiotics with  
the addition of Strawberry tree water extract**

**Marta Horvatinović, 0291004402**

**Abstract:** In recent years, there has been a growing interest among consumers in functional cosmetics and dermocosmetics. These product groups contain active components such as probiotics and plant extracts with high contents of flavonoids, polyphenols, and vitamins, and as such, they show the ability to improve various skin conditions. Various unexplored types of probiotics and postbiotics are potential active components in the production of cosmetic preparations. Therefore, the aim of this study was to create a functional cosmetic preparation with the addition of the probiotic culture *Lactiplantibacillus plantarum* S1 and an aqueous extract of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) and to examine its antimicrobial potential, its ability to inhibit biofilm formation by the pathogen *Candida albicans* ATCC®10231™, its co-aggregation ability with the same pathogen, and its antioxidant potential in scavenging DPPH free radicals. The obtained results showed that *Lpb. plantarum* S1 cells significantly inhibit the formation of *C. albicans* biofilms and the growth of this pathogen. Additionally, the addition of the aqueous extract of strawberry tree to the cream sample greatly increased the antioxidant ability to scavenge DPPH free radicals of this preparation.

**Keywords:** cosmetical preparations, probiotics, plant extracts, postbiotics, antimicrobial activity antioxidant activity, biofilms

**Thesis contains:** 27 pages, 8 figures, 1 table, 48 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Deni Kostelac, PhD

**Thesis defended:** June 17<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. FUNKCIONALNA KOZMETIKA.....	2
2.2. PROBIOTICI U KOZMETICI.....	3
<b>2.3. MEHANIZMI DJELOVANJA PROBIOTIKA U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA.....</b>	<b>4</b>
2.3.1. DJELOVANJE PROBIOTIKA NA USPORAVANJE PROCESA STARENJA KOŽE.....	4
2.3.2. DJELOVANJE PROBIOTIKA NA UPALNE PROCESSE KOŽE .....	6
<b>2.4. POSTBIOTICI U KOZMETICI.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5. BILJNI EKSTRAKTI U KOZMETICI.....</b>	<b>8</b>
<b>2.6. BILJNI EKSTRAKT MAGINJE.....</b>	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. MIKROORGANIZMI.....	12
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE .....	12
3.1.3. KEMIKALIJE .....	13
3.1.4. APARATURA I PRIBOR.....	13
3.2. METODE.....	14
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>18</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>23</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>24</b>

## 1. UVOD

Trenutni rast i pravci razvoja tržišta kozmetike za osobnu njegu uvjetovani su porastom svijesti potrošača o porijeklu i funkcionalnim karakteristikama aktivnih tvari i ostalih komponenti sadržanim u kozmetičkim proizvodima. Tijekom godina, potrebe korisnika kozmetike uvelike su se promijenile te su zahvaljujući procesima certifikacije korisnici bolje upućeni u prisutnost kontaminanata u proizvodima koje kupuju i o njihovim potencijalnim posljedicama za ljudsko zdravlje i okoliš (Musarra i sur., 2017). Sukladno tome, porastao je interes za funkcionalnom kozmetikom koja djeluje na određene aktivnosti stanica. Nova kategorija kozmetičkih proizvoda naziva se kozmeceutika. To su proizvodi čija je učinkovitost i kvaliteta veća od tradicionalnih kozmetičkih proizvoda, a manje kvalitete i učinkovitosti od farmaceutskih pripravaka. Ova vrsta pripravaka sadrži aktivne sastojke koji potiču obnavljanje stanica kože u dubljem sloju od ostale kozmetike. Aktivni sastojci koje nalazimo u ovim proizvodima mogu biti vitamini (A,B,C,E), koenzim Q10, razni peptidi, protuupalne tvari poput likokalkona A te polisaharidi (Choi i Berson, 2006). Kao potkategorija ove skupine ističe se dermatokozmetika koja sadrži aktivne sastojke kao što su probiotici i biljni ekstrakti koji obećavaju dugotrajnu i dubinsku njegu kože. Kozmetika iz ove kategorije najčešće se proizvodi u obliku preparata za njegu i čišćenje lica, njegu kože i zaštitu od sunca (Matutinović, 2023). Koža je najveći organ te je zbog toga češće izložena različitim vrstama infekcija kao što su gljivične i bakterijske. Dobro je poznata činjenica da probiotici pomažu kod specifičnih poremećaja, a uz to su i brojne kliničke studije pokazale da imaju pozitivan učinak na obnavljanje stanica kože (Roudsari i sur., 2015). Osim probiotika, kao aktivne tvari u funkcionalnoj kozmetici koriste se i biljni ekstrakti. Biljni ekstrakti u svom sastavu imaju visoke koncentracije polifenola koji su prirodni antioksidansi. Oni su važni, jer prekidaju lančane reakcije oksidacije te sprječavaju daljnji nastanak slobodnih radikala procesima oksidacije koji u lančanim reakcijama mogu ozbiljno oštetiti kožu. Upravo zbog toga brojni kozmetički pripravci sadrže kombinaciju biljnih ekstrakata dobivenih iz biljaka kao što su ružmarin, zeleni čaj, rajčica, borovnica (Kusumawat i Indrayanto, 2013).

S obzirom na navedeno, u ovom radu je razvijena krema za ruke uz dodatak probiotika, postbiotika i biljnog ekstrakta maginje zbog povećanja njezine funkcionalnosti.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Funkcionalna kozmetika**

Upotreba kozmetičkih pripravaka poznata je otprilike tisuću godina te od tada ima važnu ulogu u životu ljudi. Kao takvi, koristili su se za poboljšanje ljepote, zaštitu kože i desni te čak za oslikavanje kože. U to vrijeme, sastojci kozmetike bile su sirovine isključivo prirodnog podrijetla, koje su kasnije počele zamjenjivati sintetske sirovine sve do otprilike 1990.-tih godina prošlog stoljeća, kada su se u proizvodnji kozmetike ponovno počele koristiti sirovine na prirodnoj bazi kao aktivne tvari u kozmetičkim pripravcima koje izazivaju biološke reakcije u koži koje poboljšavaju strukturni integritet kože, pružaju zaštitu od UV zraka te smanjuju efekt kroničnog i foto- starenja (McMullen, 2018). Kasno 20. stoljeće te početak 21. stoljeća svjedočili su značajnom porastu aktivnosti u kozmetičkoj industriji u pogledu proizvodnje održivih proizvoda temeljenih na prirodnim sastojcima (Dini i Laneri, 2021). Taj razvoj započeo je sastojcima temeljenim na prirodno deriviranim polisaharidima dobivenim iz celuloze, guar gume, škroba i sličnih sastojaka. Ovi funkcionalni biopolimeri imaju ulogu emulgatora te potpomažu stvaranje filmova. U posljednjih par godina, uloženi su veliki naponi u razvoj aktivnih sastojaka za njegu kože. To spada pod granu kozmeceutike koja uključuje intervenciju peptida i biljnih komponenti u epidermisu i dermisu koji čine površinske slojeve kože. Različiti biljni ekstrakti sadrže velik broj antioksidansa koji pomažu koži da izvršava biokemijske reakcije ili sprječavaju oksidacijske procese u koži kojima nastaju slobodni radikali (McMullen i Dell'Acqua, 2023).

## 2.2. Probiotici u kozmetici

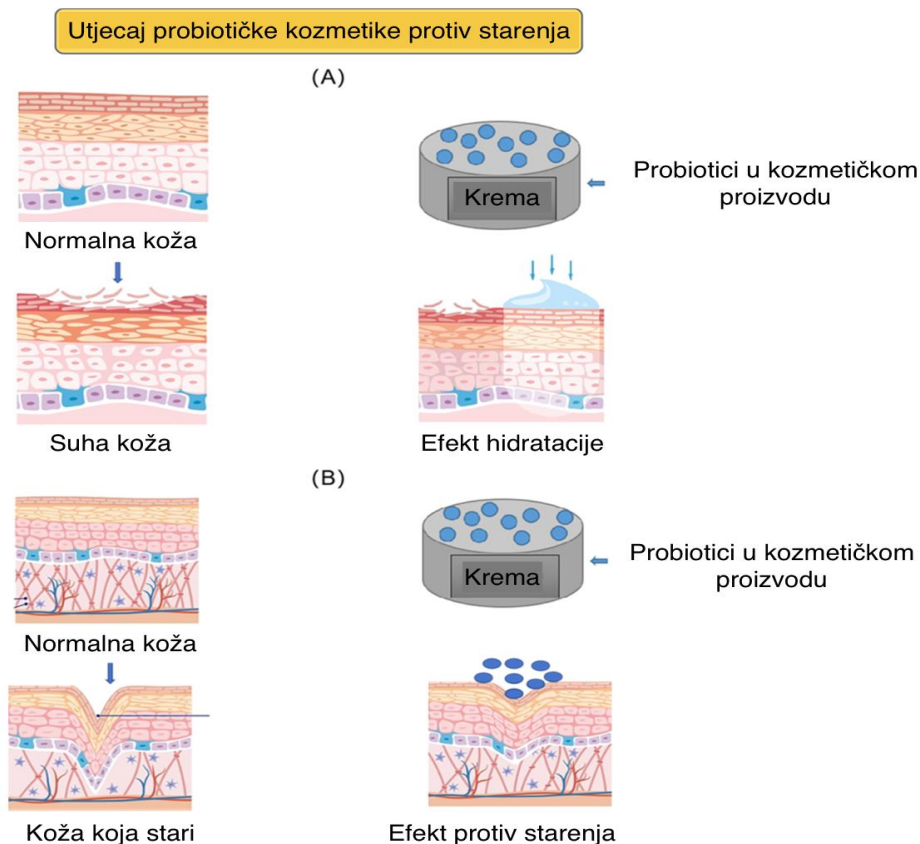
Probiotici su živi mikroorganizmi koji pružaju zdravstvene dobrobiti kada se konzumiraju u odgovarajućoj količini (Souak i sur, 2021). Sojevi koji se najčešće koriste u okviru probiotika su bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije (Bermudez-Brito i sur., 2012). Zbog svog raznolikog biološkog djelovanja probiotici, kao i njihovi ekstrakti, imaju značajan utjecaj na kozmetiku. Znanstveno je dokazano kako probiotici posjeduju niz blagotvornih svojstava za kožu, uključujući sposobnost smanjenja upalnih procesa na koži, liječenje pojedinih stanja kože te stvaranje zaštite od alergijskog kontaktnog dermatitisa. Osim toga, probiotici su neophodni za jačanje kožne barijere pospješujući upijanje vode te odgađanje procesa starenja kože (Kober i Bowe, 2015). Odnedavno se probiotici koriste u skoro svim uobičajenim proizvodima za njegu. Ovi kozmetički preparati, kao što su hidratantni losioni, kreme za lice, tonici, gelovi za tijelo, proizvodi za kosu te maske, sadrže komadiće staničnih stijenki te inertne bakterije. Neki proizvođači proizvode probiotičku kozmetiku uz dodatak probiotika, dok neki dodaju prebiotike koji su tzv. "probiotička hrana", a čine ih oligosaharidi, galaktooligosaharidi ili fruktooligosaharidi (Krutmann J., 2009). Dodatak prebiotika može spriječiti rast neželjenih bakterija dok podupire rast korisnih bakterija. Osim toga, u kozmetičke preparate moguće je dodati i bakteriocine koji su "aktivni produkti" probiotika, metabolite kao što su produkti fermentacije bakterija iz roda *Lactobacillus* i produkti fermentacije kvasca. Njihova uloga u kozmetičkim proizvodima za njegu kože je pomoći koži u postizanju mikroekološke ravnoteže zbog dobre stabilnosti, malih molekula, otpornosti na visoke temperature te otpornosti na kiseline i lužine (Dou i sur, 2023).



## 2.3. Mehanizmi djelovanja probiotika u kozmetičkim proizvodima

### 2.3.1. Djelovanje probiotika na usporavanje procesa starenja kože

Postoje dva tipa starenja kože: prirodno starenje i foto-starenje. Prirodno starenje kože opisujemo doprinosom unutarnjih komponenti u tijelu koje izazivaju izložena i neizložena područja te se taj tip starenja očituje pojavom bora i opuštanjem kože. Drugi tip starenja kože, foto starenje, uzrokovano je najčešće ultraljubičastim (UV) zračenjem koje prodire duboko u kožu te na taj način može uzrokovati starenje kože pa čak i rak kože (Gilchrest, 1989). Promjene u mikrobnim zajednicama koje su povezane s kožom, povišeni pH kože, postojanje visoko reaktivnih kisikovih vrsta i stvaranje novih te smanjena količina proizvodnje kolagena karakteristika su foto-ostarjele kože. Probiotička kozmetika koja se trenutno nalazi na tržištu nudi učinke protiv starenja na koži (slika 1) putem sljedećih mehanizama: dubinska hidratacija i obnavljanje funkcija kožne barijere, obnavljanje elastina i kolagena u koži te upotreba antioksidansa (Teng i sur., 2022).



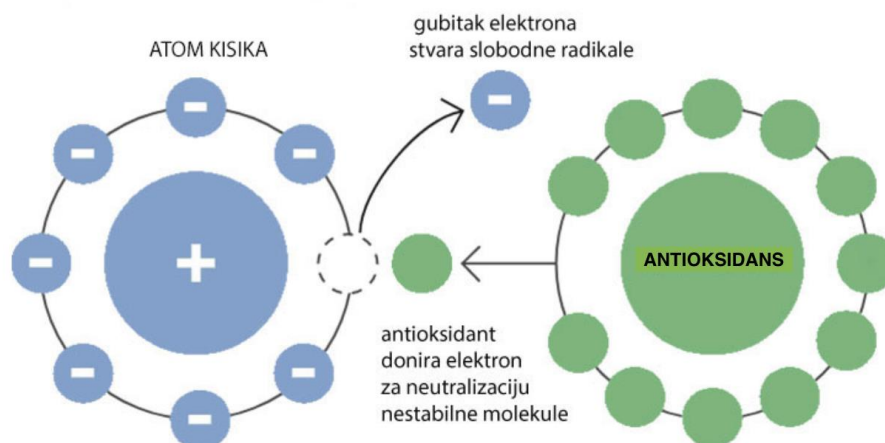
**Slika 1.** Utjecaj probiotičke kozmetike na efekt starenja kože (prema Dou i sur., 2023)

### 2.3.1.1. Hidratacija i obnavljanje kožne barijere

Hidratacija i obnavljanje kožne barijere su dvije najvažnije karakteristike koje za funkciju moraju imati svi kozmetički proizvodi protiv starenja. Suha koža, koja je važan pokazatelj starenja, nastat će zbog smanjenje funkcije barijere epiderme. U koži postoje prirodne hidratantne komponente koje nalazimo u keratinocitima i u membranama sebuma koje štite površinski sloj kože i sprječavaju isparavanje vode te na taj način održavaju kožu vlažnom. Oštećene lojne membrane, oštećena epidermalna barijera te u konačnici suha koža, simptomi su starenja kože. Kako bi se poboljšao učinak kozmetike protiv starenja, potrebno je u takve preparate inkorporirati aktivne tvari koje za funkciju imaju pružanje dubinske hidratacije i obnavljanje kožne barijere. Dodavanje bioaktivnih komponenti, kao na primjer bakterije *Streptococcus thermophilus* S244 i *Streptococcus salivarium* spp. u kozmetičke preparate mogu rezultirati proizvodnjom veće količine enzima koji za ulogu imaju hidrataciju kože, redukciju suhoće te usporavanje cjelokupnog procesa starenja kože (Elmahdy i Maibach, 2017).

### 2.3.1.2. Antioksidacijski učinak

Kod pretjeranih napada slobodnih radikala na biološka tkiva poput mitohondrija i kromosoma, vezivnog tkiva i staničnih membrana, dolazi do starenja tijela (Bernstein, 2002). Istraživanja pokazuju kako su superoksid dismutaza (SOD), glutation (GSH), vitamin E i koenzim Q10 primarne aktivne tvari koje posjeduju antioksidacijsku aktivnost. SOD kao biološki antioksidacijski enzim učinkovito eliminira previše nastalih superoksidnih slobodnih radikala iz tijela (na slici 2 prikazano je djelovanje antioksidansa na slobodne radikale kisika). Također, vitamin E ima primarnu ulogu antioksidansa koji također eliminira slobodne radikale iz tijela. Osim toga, vitamin E djeluje kao zaštita enzimu SOD te na taj način smanjuje brzinu kojom topljivi kolagen postaje netopljiv. Koenzim Q10 je prirodni antioksidans koji proizvode same stanice te je jedan od elemenata u dišnom lancu mitohondrija. Novija istraživanja pokazala su kako kombinacija β-nikotinamid mononukleotida (NMN) i bakterija mliječne kiseline (LAB) točnije *Lactobacillus fermentum*, može povećati razinu SOD-a, katalaze (CAT) i interleukina u koži, smanjiti oksidativno oštećenje kože nastalo djelovanjem UV zraka te poboljšati ukupni antioksidativni kapacitet kože (Dou i sur, 2023). Probiotici imaju sposobnost stvaranja različitih metabolita kao što su organske kiseline, flavonoidi, probiotički peptidi, alkoholi i polifenoli nakon zagrijavanja nekih bakterijskih komponenti kao što su lipoteihonična kiselina, peptidoglikan, egzopolisaharidi (EPS) i proteini stanične površine. Lipoteihonična kiselina koja se izolira iz probiotika smanjuje vidljive znakove fotostarenja (Vinderola i sur, 2022).



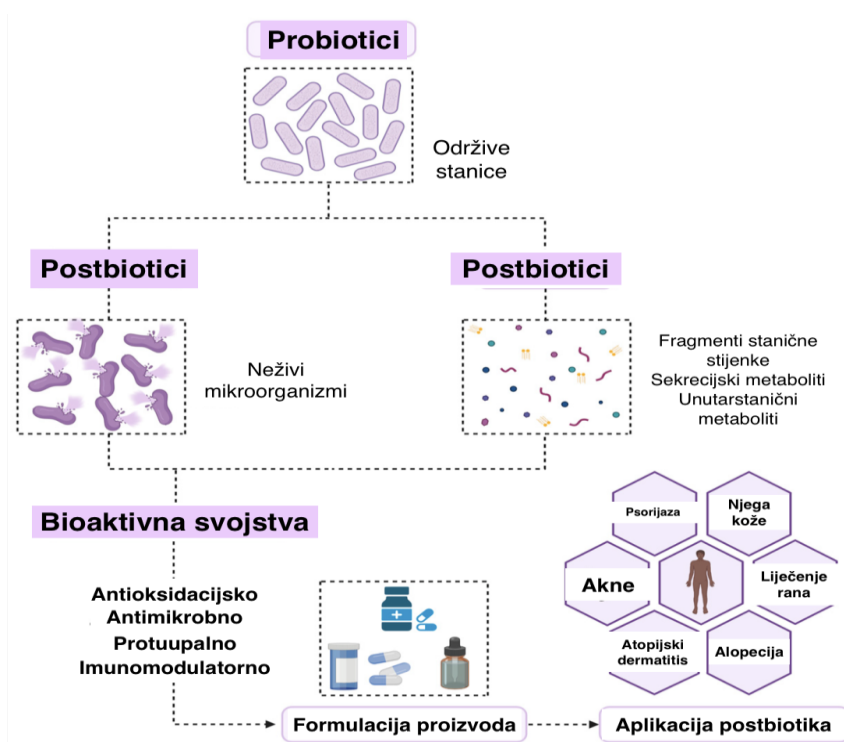
**Slika 2.** Djelovanje antioksidansa na slobodne radikale kisika (izvor <https://wellbis.hr/vitamini-u-kozmetici/>)

### 2.3.2. Djelovanje probiotika na upalne procese kože

Uz brzo širenje različitih oralnih probiotika, pojavila se ideja o upotrebi raznih topikalnih probiotičkih komponenti kod liječenja kožnih mikroekoloških bolesti te za poticanje imunološke homeostaze balansiranjem mikrobiote kože. Topikalni probiotici proizvode protuupalne i antibakterijske tvari kako bi zaustavili rast patogena i oportunističkih bakterija s ciljem održavanja mikro ekološke ravnoteže kože (Cogen i sur., 2008). Upotreba topikalnih probiotika u kozmetičkim preparatima značajno je smanjila simptome i znakove rozaceje, atopijskog dermatitisa te akni u nekoliko manjih kliničkih studija (Knackstedt i sur., 2019; Lolou i Panayiotidis, 2019). Iako točan mehanizam djelovanja ovakvih probiotika nije sasvim poznat, smatra se da ostvaruju protuupalno djelovanje pomicanjem T-regulatornih jedinica, proizvodnjom protuupalnih citokina, natjecanjem s patogenima za potrebne nutrijente te agregacijom i isključenjem patogena. Probiotički sojevi sa simbiotičkim kožnim mikroorganizmima kao što su *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* povezani su s imunomodulacijskim učincima na koži, sprječavanjem razvoja biofilmova, smanjenjem broja citokina koji uzrokuju sistemsku upalu te direktno konkurentnim inhibiranjem vezivnih mjesta (Lopes i sur., 2017).

## 2.4. POSTBIOTICI U KOZMETICI

Postbiotici se definiraju kao pripravci neživih mikroorganizama i/ili njihovih komponenti koje pružaju zdravstvenu dobrobit domaćinu. Ovi novi sastojci u kozmetici i dermatologiji definiraju se kao „pripravci neživih mikroorganizama i/ili njihovih komponenti koje donose koristi za zdravlje domaćina“ (slika 3). Glavne prednosti upotrebe postbiotika vezane su uz njihovu veću specifičnost djelovanja na lokalnu mikrobiotu i interakciju sa stanicama domaćina u odnosu na probiotike. Većina ovih spojeva dobiva se obično iz bakterija mliječne kiseline poput bakterija roda *Lactobacillus* i/ili kvasca, posebice *Saccharomyces cerevisiae*. Postbiotici obuhvaćaju različite molekule, poput metabolita kao što su teihoične kiseline sve pa sve do polisaharida, i pokazuju značajna biološka svojstva kao što su antioksidativna, protuupalna, antiproliferativna i imunomodulatorna svojstva, što opravdava njihovu upotrebu u kozmetičkim formulacijama (da Silva Vale i sur., 2023). Za razliku od probiotika, postbiotici imaju dulji rok trajanja i veću sigurnost te im nije potrebna održivost u lokalnoj formulaciji, što ih čini inovativnim pristupom na tržištu kozmetičkih sastojaka. (Duarte i sur., 2022).



**Slika 3.** Konceptualizacija pojma postbiotika i shematski prikaz dobrobiti za zdravlje kože (prema da Silva Vale i sur., 2023)

## **2.5. BILJNI EKSTRAKTI U KOZMETICI**

Potražnja za kozmetičkim proizvodima koji u svom sastavu sadrže biljne ekstrakte na tržištu sve je veća. Bioaktivni ekstrakti i fitokemikalije dobivene iz različitih biljaka imaju dvije osnovne uloge u njezi kože: njegu tijela i utjecaj na biološke funkcije kože kako bi se osigurali hranjivi sastojci za njezino zdravlje (Sumpio i sur., 2006). Biljni proizvodi sadrže bogatu paletu komponenti poput polifenola, vitamina, antioksidansa, esencijalnih ulja, hidrokoloida, proteina i terpenoida, svaka s različitim svojstvima na temelju svojeg sastava. Moderna kozmetika za njegu kože karakterizira multiaktivnost, što omogućuje složene i multidirektne učinke čak i u relativno jednostavnim formulacijama. Biljke su dobro poznate po svojoj proizvodnji prirodnih antioksidacijskih spojeva koji mogu značajno smanjiti količinu oksidacijskog stresa uzrokovanog sunčevom svjetlošću i kisikom (Aune, 2019). Ekstrakti biljaka koriste se u raznim patentima i kao sastojci kozmetičkih pripravaka. Zeleni čaj, sjeme grožđa, ružmarin, bosiljak, borovnica, rajčica, sjeme bora i čičak neki su od najčešćih biljnih ekstrakata koji se koriste u izradi kozmetičkih pripravaka za njegu kože. Bioaktivne komponente koje su dobivene iz biljnih ekstrakata koje su od iznimne važnosti su polifenoli i vitamini (Hoang i sur., 2021).

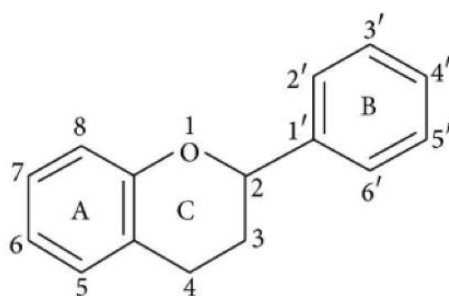
### **2.5.1. Polifenoli**

Polifenoli i terpeni najčešći su fitoantioksidansi. Polifenoli imaju benzenske prstene s pričvršćenim -OH skupinama te broj i položaj -OH skupina na benzenskom prstenu određuje njihovu antioksidacijsku aktivnost (Pandey i Rizvi, 2009). Mehanizmi djelovanja ovih spojeva uključuju poticanje antiupalnih i imunoloških odgovora, detoksikaciju, modulaciju antioksidansa te promjene u izražavanju gena. Polifenoli su temeljito proučeni kroz brojna istraživanja te je dokazano da imaju antioksidativna i protuupalna svojstva te su pokazali pozitivne učinke na ljudsku kožu i zbog toga se sve više uključuju u kozmetičke i ljekovite proizvode (Hoang i sur., 2021).

### **2.5.2. Flavonoidi**

Flavonoidi su najveća skupina svih biljnih aktivnih komponenti. Izolirano je i identificirano preko 5000 flavonoida (Hajheydari i sur., 2013). Prirodno se nalaze u obliku glikozida koji su ponekad nazvani bioflavonoidi (na slici 4 prikazana je njihova strukturna formula). Glikozidi flavonoida sastoje se od stvarnog flavonoida (aglikona) i ugljikovodika (Kitture i sur., 2015). Najpoznatija flavonoidna aktivnost na koži povezana je s njihovim antioksidativnim svojstvima. Većina flavonoida koji sadrže fenol ima relativno visoki potencijal redukcije i oblike

stabiliziranih anionskih radikala rezonancije. Struktura te fizikalno-kemijska svojstva flavonoida utječu na njihovu sposobnost čišćenja slobodnih radikala (Arct i Pytkowska, 2008). U biljnim ekstraktima koji se uobičajeno koriste uvijek su prisutne mješavine različitih flavonoida u obliku aglikona i lipofilnih glikozida. Takve mješavine omogućuju široki spektar antiradikalnog djelovanja jer te vrste hvataju gotovo sve vrste slobodnih radikala i reaktivne vrste kisika koji uzrokuju starenje kože. Antiradikalno djelovanje flavonoida potkrjepljuje njihova sposobnost apsorpcije ultraljubičastog zračenja u širokom spektru s maksimalnim UVB (250-280 nm) i UVA (350-385 nm). Protuupalno djelovanje flavonoida dokazuje njihovu višestruku aktivnost te se ovakvo djelovanje najčešće koristi u području kozmetologije. Protuupalno djelovanje ovih spojeva proizlazi iz njihovih složenih reakcija s proupalnim čimbenicima i enzimima, koji direktno ili indirektno sudjeluju u stvaranju ili širenju upalnih procesa (Hoang i sur., 2021).



**Slika 4.** C6-C3-C6 struktura flavonoida (prema Perica, 2020).

### 2.5.3. Vitamini

Konsumacija i apsorpcija vitamina i antioksidansa primarno putem hrane te upotreba dodataka prehrani ključni su za ljudsko zdravlje (Kim i sur., 2015). Kako je koža naš najveći organ i kao vanjska zaštitna barijera, nalazi se na čelu borbe protiv štetnih slobodnih radikala iz vanjskih izvora. Vjeruje se kako upotreba vitamina i antioksidansa u kozmetici na lokalnoj osnovi može pomoći u zaštiti kože od slobodnih radikala te pomoći obnavljanje oštećene kože. Osim toga, pojedini vitamini mogu biti korisni za kožu zbog svojih učinaka kao što su smanjenje hiperpigmentacije i modrica, aktivacija proizvodnje kolagena te protuupalno djelovanje (Lobo i sur., 2010).

Vitamin A je prvi vitamin koji je odobren od strane Uprave za hranu i lijekove SAD-a (FDA) kao sredstvo protiv bora koje poboljšava izgled površine kože i ima svojstva protiv starenja. To je tvar koja je topiva u mastima i pripada porodici retinoida (De Oliveira Pinto i sur., 2021). Vitamin A i njegovi derivati su među najučinkovitijim sredstvima u borbi protiv

starenja kože Svojstva retinoida koja djeluju protiv bora potiču proliferaciju keratinocita, jačaju zaštitnu funkciju epidermisa, ograničavaju transepidermalni gubitak vode te sprječavaju degradaciju kolagena (Hoang i sur., 2021).

Vitamin B je u vodi topljivi nutrijent kojeg pronalazimo u različitoj hrani, najviše u zelenom lisnatom povrću i u cjelovitim žitaricama. Pantenol je alkoholna verzija pantotenske kiseline, poznate kao vitamin B5. Koristi se u kozmetici za njegu kose već godinama (Kim i sur., 2015). Osim u njezi kose, pantenol je učinkovit ovlaživač i u kozmetici za njegu kože zbog sposobnosti privlačenja vode u stratum corneum (gornji sloj epiderme) i omekšavanja kože (Hoang i sur., 2021). Lokalna primjena niacinamida ima stabilizirajući učinak na funkciju epidermalne barijere što se očituje smanjenjem gubitka transepidermalne vode i poboljšanjem sadržaja vode u rožnatom sloju kože (Duvic i sur., 1997). Niacinamid dovodi i do povećanja sinteze proteina kao što je keratin, djeluje stimulativno na sintezu ceramida te podiže unutarstaničnu razinu NADP. Kod starenja kože, lokalna primjena niacinamida poboljšava površinsku strukturu kože te izgladuje bore (Hoang i sur., 2021).

Vitamin C je snažan antioksidans koji može neutralizirati oksidativni stres putem procesa doniranja/prijenosa elektrona. Osim regeneriranja drugih antioksidansa u tijelu, poput  $\alpha$ -tokoferola, vitamin C može smanjiti količine nestabilnih vrsta kisika, dušika i sumpornih radikala. Kada se primjenjuje lokalno, vitamin C može neutralizirati reaktivne kisikove spojeve uzrokovane sunčevim zračenjem i okolišnim faktorima poput onečišćenja i dima. Pokazao se još učinkovitim kod liječenja hiperpigmentacije, melazme i sunčevih pjega (Pullar i sur., 2017).

Vitamin E je vitamin topljiv u mastima, nalazimo ga u raznim vrstama hrane, osobito u soji, orašastim plodovima, cjelovitim žitaricama i različitim uljima. Najvažnije svojstvo ovog vitamina je snažno antioksidacijsko djelovanje. Također, djeluje i protiv starenja kože na način da smanjuje bore kao i smanjenje formacije tumora na koži (Brigelius-Flohé i sur., 2002).

Vitamin K primarno se dobiva iz zelenog lisnatog povrća, kao i iz bakterija u crijevima. Lokalna primjena 1 % vitamina K primijenjenog dva puta dnevno pokazala se učinkovitim za ubrzavanje zacjeljivanja modrica kao i za sprječavanje pojave novih. To se pripisuje sposobnosti vitamina K da spriječi nastanak i ukloni postojeću ekstravaziranu krv u koži (Fitzmaurice i sur., 2011).

## **2.6. BILJNI EKSTRAKT MAGINJE**

Maginja (*Arbutus unedo* L.) je plod divlje mediteranske zimzelene biljke koja se naziva obična planika. To su okrugle bobice, čija boja varira od žuto-zelene do crvene, ovisno o stupnju zrelosti. Sirove bobice su jestive, trpkog okusa zbog velike količine tanina u svom sastavu te se trpkost smanjuje sazrijevanjem bobica. Svi dijelovi biljke planike su iskoristivi te su u narodu korišteni različiti pripravci s ciljem liječenja pojedinih zdrastvenih tegoba. Čaj od korijenja i lišća koristi se u narodnoj medicini kao laksativ, diuretik i antiseptik (Rada, 2019).

### **2.6.1. Antioksidacijska aktivnost**

Maginja je bogata antioksidansima, od kojih se u najvećoj količini nalaze derivati galne kiseline, antocijani i proantocijanidini koji su vrlo aktivni. U toj skupini antioksidansa, proantocijanidini čine čak 80 % ukupnih flavonoida. Osim navedenih antioksidansa, maginja sadrži i manju količinu kvercetina i elaične kiseline te vitamine C, E i karotenoide. Fenolne komponente imaju sposobnost jačanja ljudskog obrambenog sustava za uklanjanje stanica raka i blokiranje angiogeneze (Zitouni i sur., 2020).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Soj bakterija mliječne kiseline korišten u ovom istraživanju je *Lactiplantibacillus plantarum* S1 preuzet iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Iz komercijalnih zbirki mikroorganizama (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i American Type Culture Collection) pribavljeni su standardni sojevi test-mikroorganizama koji su korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti te inhibiciju biofilmova:

- *Escherichia coli* ATCC®25922™
- *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™
- *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™
- *Listera monocytogenes* ATCC®23074™
- *Candida albicans* ATCC®10231™

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline i test-mikroorganizama korištene su sljedeće hranjive podloge:

- HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g/L; agar 18,0 g/L; destilirana voda; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min
- HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara
- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g/L; goveđi ekstrakt 10,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; amonijev citrat 2,0 g/L; magnezijev sulfat 0,2 g/L; manganov sulfat 0,05 g/L; agar 15,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješšan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C/15 min.

- Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g/L; pepton 6 g/L; glukoza 20 g/L; agar 15 g/L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- Sladni bujon sastava istog kao sladni agar, samo bez dodatka agara.

### 3.1.3. Kemikalije

- Lanette N (Lively Pharm, Zagreb, Hrvatska)
- Ulje marelice (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Ulje badema (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Ulje masline (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Dexpanthenol (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Geogard (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Eterično ulje limuna (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- etanol, 96 %-tni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1 %-tna otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- deionizirana voda

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Eppendorf tubice (2 mL)
- Erlenmeyerove tikvice
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0,22 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- laboratorijske čaše
- menzura (100 mL)
- mikrobiološke epruvete (16×160 mm, 18×180 mm)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- štapići po Drigalskom
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

- vibromješač EV-102 (Tehnica, Slovenija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- kivete (15 i 50 mL)
- mikrobiološka ušica
- mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica (Falcon, SAD)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema uzoraka kreme za ruke**

Uzorak kreme pripremljen je odvagom 7 g Lanette N, 10 g ulja marelice, 3 g ulja badema te 7 g ulja masline u tarionik. Ove komponente, koje čine masnu fazu kreme, zagrijane su na 70 °C u vodenoj kupelji. Vodenu fazu u ovoj kremi čine glicerol, dexpanthenol, geogard i destilirana voda. Odvagano je 2 g glicerola, 1 g dexpanthenola te dodano 9 kapi geogarda. Navedene komponente su zagrijane na temperaturu od 70 °C. Zatim se masna faza skine s kupelji i vodena faza se u obrocima dodaje masnoj fazi uz neprestano miješanje. Nakon hlađenja, dodane su 4 kapi eteričnog ulja limuna te je ponovno promiješano.

### **3.2.2. Priprema vodenog ekstrakta maginje**

Za pripremu vodenog ekstrakta maginje korištena je tehnologija ultrazvuka visoke snage (engl. *High Power Ultrasound*, HPU) pomoću uređaja za ultrazvučno procesiranje UP400St, 400W, DN22, 24 Hz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka). Izabrani parametri ekstrakcije bili su: amplituda 50 %, puls 100 % te vrijeme ekstrakcije 5 min pri čemu je ukupna energija ultrazvuka iznosila 6,869 Wh, snaga 96 W i temperatura ekstrakta 80 °C. Postupak ekstrakcije proveden je u odvaganom uzorku kaše maginje ( $10 \pm 0,0001$  g) kojem je dodano 60 mL destilirane vode. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopunjen ekstrakcijskim otapalom do oznake.

### **3.2.3. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline**

Nakon uzgoja u MRS bujonu preko noći, bakterijske stanice odvojene su od hranjive podloge centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen, a stanice koje su se istaložile ponovno su suspendirane u 9 mL sterilne deionizirane vode te je provedeno ponovno centrifugiranje u istim uvjetima. Postupak ispiranja stanica sterilnom deioniziranom vodom ponovljen je dva puta te su se nakon ispiranja

istaložene stanice još jednom suspendirale u 10 mL sterilne deionizirane vode formirajući tako suspenziju stanica potrebnu za rad.

### **3.2.4. Priprema inaktiviranih stanica bakterija mliječne kiseline**

#### **3.2.4.1. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom**

Broj bakterijskih stanica u uzorcima određen je naciepljivanjem decimalnih razrijeđenja uzorka na MRS agar. Nakon inkubacije, izbrojane su porasle kolonije na agaru te je izračunat broj stanica u ispitivanim uzorcima kreme za ruke koji je izražen kao jedinice koje tvore kolonije po mililitru (CFU, engl. *colony forming units*).

### **3.2.5. Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija mliječne kiseline prema test-mikroorganizmima**

Nakon uzgoja u MRS bujonu preko noći, stanice bakterija mliječne kiseline odvojene su od medija centrifugom provedenom na 6000 okretaja/min tijekom 10 min. Supernatanti su odvojeni te filter sterilizirani kroz filtere od 0,22 µm.

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost prema sljedećim test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 190 µL ispitivanog uzorka kreme s dodatkom stanica bakterija mliječne kiseline gdje je 0,1 g uzorka kreme sa stanicama bakterija mliječne kiseline suspendirano u 9 mL sterilne vode, 80 µL medija za patogene (hranjivi bujon, uz iznimku sladnog bujona za kvasac *Candida albicans*) te su inokulirane s 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 48 h te je u intervalima mjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Praćen je rast u navedenom razdoblju te je izračunata inhibicija pomoću izraza:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad (1)$$

gdje je:

$A_t$  = apsorbancija u vremenu  $t$

$A_0$  = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci su umjesto supernatanta sadržavali neinokulirani MRS bujon tretiran isto kao i ostali uzorci, a slijepe probe bili su uzorci bez dodatka patogenih mikroorganizama.

### 3.2.6. Sposobnost formiranja biofilmova bakterijskih izolata

Sposobnost formiranja biofilmova određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). Ispitivane izolate bakterija mliječne kiseline klasificiralo se prema jačini nastalih biofilmova nakon inkubacije.

U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 24 jažice dodano je 2 mL MRS bujona. Uzorci su naciepljeni sa 100  $\mu$ L suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura te su pločice inkubirane na 37 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako ne bi došlo do grebanja dna jažica, a talog bakterijskih stanica je ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom kroz 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen, a pločice su osušene na zraku. Dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min obojane su adhezirane stanice. Višak boje uklonjen je temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom. Vezana boja otpuštena je dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline te je mjerena optička gustoća (OD) pri 595 nm pomoću spektrofotometra. Negativna kontrola bili su neinokulirani uzorci.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole te su klasificirani prema Borges i sur. (2012). Klasifikacije su prikazane u tablici 1.

**Tablica 1.** Klasifikacija formacije biofilmova usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole (prema Borges i sur., 2012).

Usporedba OD i ODC vrijednosti	Klasifikacija proizvodnje biofilma
OD < ODC	nema formacije
ODC < OD < 2×ODC	slaba formacija
2×ODC < OD ≤ 4×ODC	umjerena formacija
4×ODC < OD	jaka formacija

### 3.2.7. Autoagregacija

Stupanj autoagregacije određen je prema metodama Kos i sur. (2003), s izmjenom metode Kostelac i sur. (2021). Provedeno je mjerenje apsorbancije pri 620 nm gornjeg sloja suspenzija u intervalima od 1,2,3,4 i 24 h te je mjerenje modificirano na OD vrijednosti  $0,5 \pm 0,05$  kako bi se standardizirao broj bakterijskih stanica kroz 24 h. Stopa autoagregacije izračunata je prema formuli:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad (2)$$

gdje je  $A_t$  apsorbancija u vremenu  $t$ , a  $A_0$  apsorbancija u vremenu 0

### **3.2.8. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima**

Za određivanje stupnja koagregacije, pomješani su jednaki volumeni suspenzija bakterija mliječne kiseline i suspenzija odabranih test-mikroorganizama. Test-mikroorganizam koji je korišten u ovom ispitivanju je *Candida albicans* ATCC®10231™.

Pažljivo uzorkovanje s vrha pripremljenih suspenzija u mirovanju provodilo se tijekom 24 h inkubacije na 37 °C, mjerenje apsorbancije provedeno je ekvivalentno prethodno opisanoj metodi autoagregacije.

### **3.2.9. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala**

Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala, kao mjera ukupne antioksidativne aktivnosti, određena je prema Kostelac i sur. (2021) uz minimalne prilagodbe. Nakon uzgoja u MRS podlozi, bakterijske stanice odvojene su od hranjivog medija centrifugiranjem na 6000 okretaja/min tijekom 20 min te ponovno suspendirane u sterilnoj demineraliziranoj vodi. Stanične suspenzije izolata bakterija mliječne kiseline prilagođene su tako da im broj stanica iznosi ~10<sup>8</sup> stanica po mililitru poradi kvalitetnije usporedbe aktivnosti.

U 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM) dodano je 0,1 g uzorka kreme, 300 µL suspenzije bakterijske kulture stanica mliječne kiseline te 200 µL vodenog ekstrakta maginje te se nakon kratke homogenizacije uzorak inkubirao u mraku 30 min. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 517 nm pomoću spektrofotometra. Slijepa proba sadržavala je samo etanol i uzorak kreme, dok su kontrole sadržavale etanolnu otopinu DPPH i dodatak sterilne demineralizirane vode bez bakterijskih stanica. Postotak uklanjanja preostalih DPPH slobodnih radikala izračunat je prema izrazu:

$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - Abl / Ac)] \times 100 \quad (3)$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka

Abl - apsorbancija slijepa probe

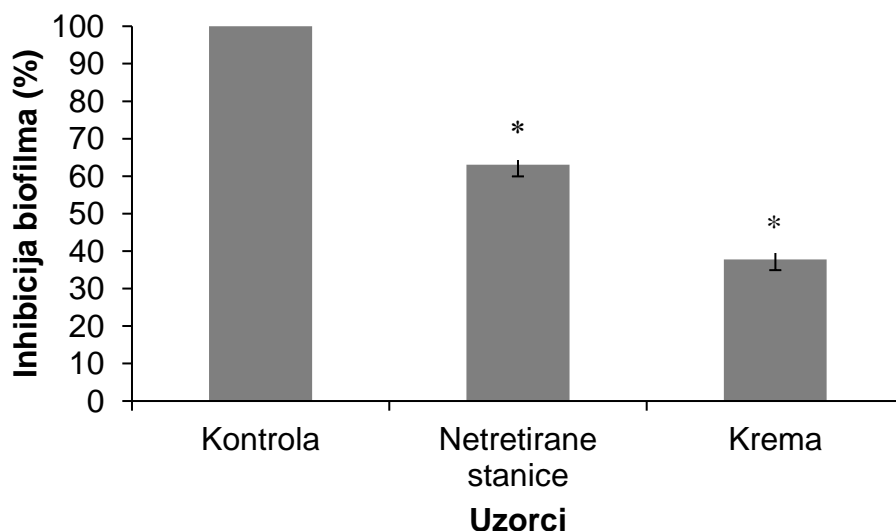
Ac - apsorbancija kontrolnog uzorka

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu razvijen je funkcionalni kozmetički pripravak uz dodatak probiotičke bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* S1 te je određen njegov potencijal koagregacije s patogenim mikroorganizmima, potencijal inhibicije patogenih test-mikroorganizama te je određeno koliko su izolati bakterija mliječne kiseline implementirani u kozmetički pripravak uspješni u inhibiciji formacije patogenih biofilmova *C. albicans*. Dodatkom vodenog biljnog ekstrakta maginje (*Arbutus unedo* L.) u kozmetički pripravak ispitana je potencijalna antioksidacijska aktivnost dobivenog pripravka. Izrada ovakvog funkcionalnog pripravka uvelike bi olakšala liječenje pojedinih kožnih stanja te omogućila farmaceutskoj industriji razvoj pripravka s višestrukim djelovanjem na stanja kože i višestrukim benefitima za kožu.

### 4.1. Sposobnost inhibicije formiranja biofilmova patogena uz pomoć stanica izoliranih iz bakterija mliječne kiseline roda *Lactobacillus*

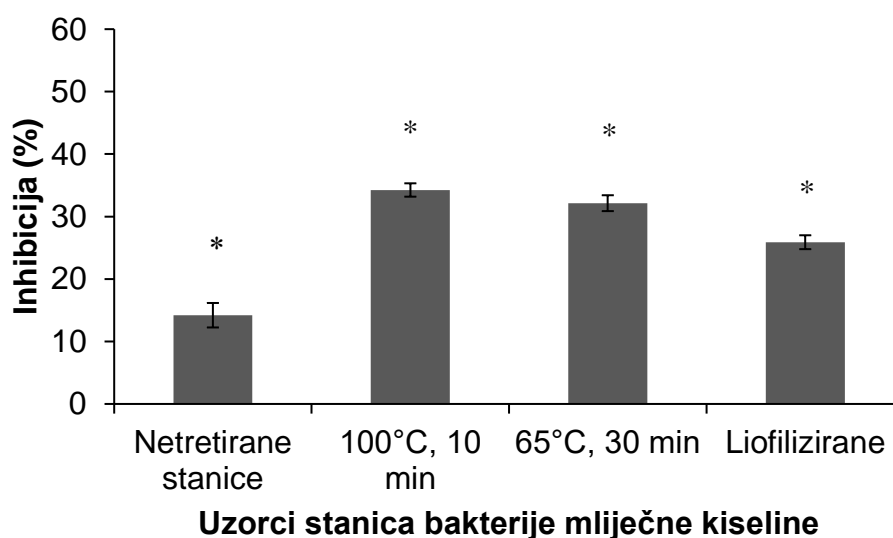
Rezultati inhibicije biofilmova patogena *C. albicans* uz pomoć živih stanica *Lpb. plantarum* S1 te uzorka kreme za ruke, prikazani su na slici 5. Rezultati su izraženi u postotcima inhibicije tvorbe biofilmova izmjerene pri apsorbanciji 595 nm.



**Slika 5.** Sposobnost inhibicije biofilma *Candida albicans* ATCC®10231™ u prisutnosti netretiranih stanica *Lpb. plantarum* S1 te uzorka kreme (rezultati su prikazani kao postotak inhibicije u usporedbi s kontrolnim rastom ± standardna devijacija. \*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka pri  $p < 0,05$ ).

Za patogeni test – mikroorganizam *C. albicans* (slika 5) dobiveni rezultati pokazuju kako su oba uzorka statistički značajno inhibirala formaciju biofilma *C. albicans*. Viši stupanj inhibicije pokazale su vijabilne (netretirane) stanice *Lpb. plantarum* S1 čiji je postotak iznosio 63 %, dok je uzorak kreme bez dodatka stanica pokazao inhibiciju od 37,80 %. U skladu s dobivenim rezultatima inhibicije biofilma *C. albicans*, istraživanja koje su proveli Parolin i sur. (2021) te Xu i sur. (2024) također su pokazala kako *Lpb. plantarum* S1 inhibira formaciju biofilma *C. albicans* u postotku sličnom kao u ovoj studiji (65 %).

#### 4.2. Antimikrobna aktivnost *Lpb. plantarum* S1 prema *Candida albicans* ATCC®10231™



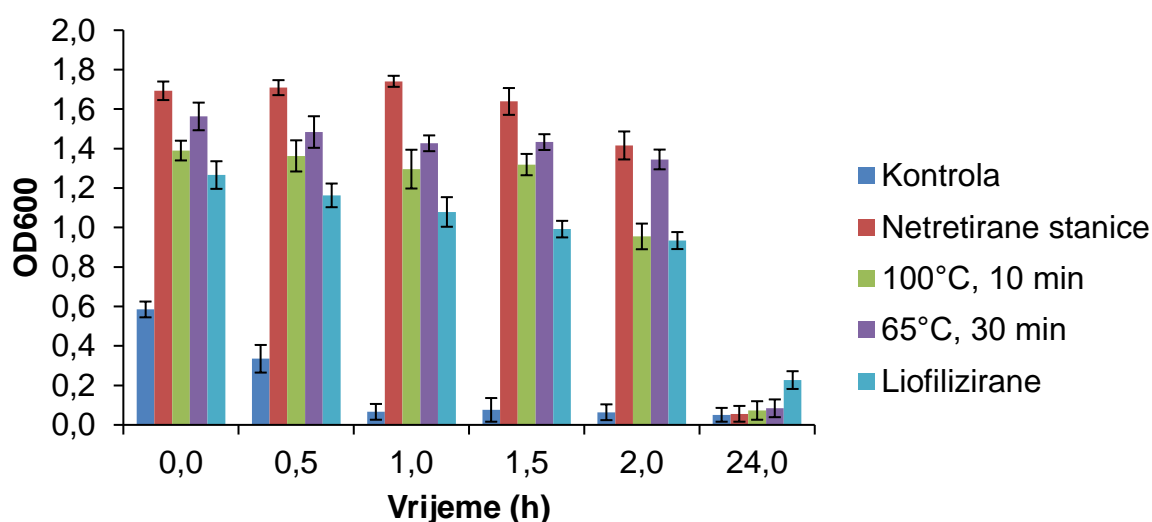
**Slika 6.** Inhibicija rasta *Candida albicans* ATCC®10231™ u prisutnosti različito toplinski tretiranih, liofiliziranih te netretiranih uzoraka stanica *Lactiplantibacillus plantarum* S1 pri 37 °C u vremenskom intervalu od 24 h (rezultati su prikazani kao postotak inhibicije u usporedbi s kontrolnim rastom ± standardna devijacija. \*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka pri  $p < 0,05$ ).

Iz rezultata (slika 6) vidljivo je kako je u slučaju inhibicije *C. albicans* najveći postotak (34,25 %) inhibicije ostvaren djelovanjem toplinski tretiranih stanica *Lpb. plantarum* S1 na 100 °C kroz 10 min te stanica tretiranih na 65 °C kroz 30 min, čiji je postotak inhibicije nešto niži te on iznosi 32,14 %. Suprotno tome, najniži postotak inhibicije pokazuju netretirane stanice koji iznosi 14,20 %. Liofilizirane stanice pokazuju stupanj inhibicije od 25,9 %, što je znatno više od postotka netretiranih stanica, a malo niže od postotka inhibicije toplinski tretiranih stanica bakterija mliječne kiseline. U istraživanju koje je proveo Lertcanawanichakul (2011) također je



dobiven rezultat kako su toplinski obrađene bakterije mliječne kiseline pri nešto višoj temperaturi od 121 °C kroz vremenski interval od 15 min pokazale najveću antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans*, dok je do potencijalnog smanjenja antimikrobne aktivnosti u ovom istraživanju došlo kod liofiliziranih stanica uslijed nestabilnosti *C. albicans* uzrokovane ireverzibilnim procesom taloženja odnosno denaturacijom ovog patogena.

#### 4.3. Koagregacija stanica *Lpb. plantarum* S1 s patogenim mikroorganizmom *Candida albicans* ATCC®10231™

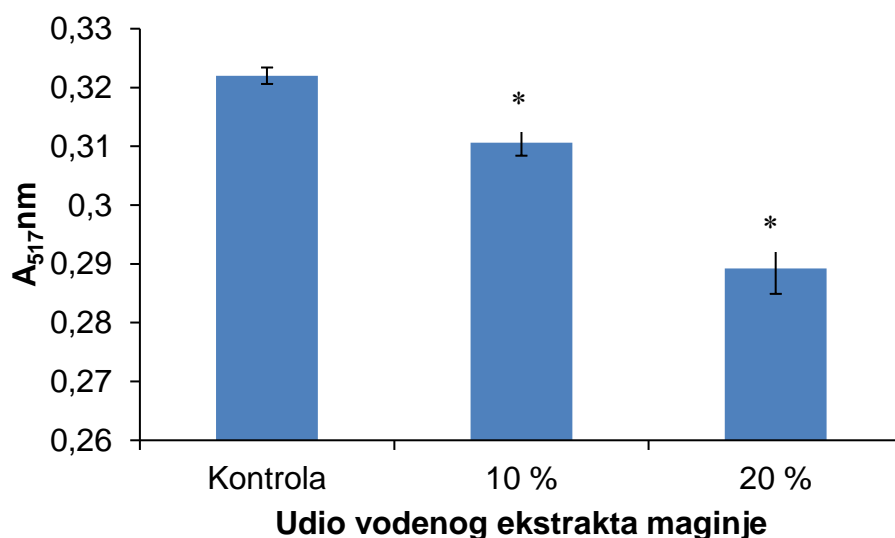


**Slika 7.** Stupanj koagregacije stanica *Lpb. plantarum* S1 toplinski tretiranih na dvije različite temperature, liofiliziranih te netretiranih stanica s patogenom *Candida albicans* ATCC®10231™ kroz vremenski interval od 24 h (rezultati su prikazani kao razina optičke gustoće kroz 24 h ± standardna devijacija).

Iz dobivenih rezultata koagregacije (slika 7), jasno je vidljivo kako je zabilježena značajna razlika za sva 4 uzorka u odnosu na kontrolu. Postignuta je najbolja koagregacija kod netretiranih stanica *Lpb. plantarum* S1 u vremenskom intervalu od 0 – 2 h te je ovdje optička gustoća najveća. Najveći pad optičke gustoće stanica uočava se nakon 24 h eksperimenta. Osim kod netretiranih stanica, visoka optička gustoća javlja se i kod toplinski tretiranih stanica na nižoj temperaturi, odnosno na 65 °C kroz 30 min. Kod stanica koje su toplinski tretirane pri temperaturi od 100 °C koagregacijska sposobnost je nešto niža nego kod netretiranih i toplinski tretiranih stanica pri 65 °C. U usporedbi s netretiranim te toplinski tretiranim

stanicama, liofilizirane stanice pokazuju znatno manju sposobnost koagregacije s patogenom *C. albicans*. Sukladno tome, u istraživanju koje su proveli Jorgensen i sur. (2017), dobiveni su rezultati koji pokazuju da dva testirana probiotička soja bakterija roda *Lactobacillus* (*L. reuteri* ATCC PTA 5289 i *L. reuteri* DSM 17938) pokazuju dobru koagregacijsku sposobnost s kliničkim i s referentnim sojevima *Candida* te kako je koagregacija rasla u vremenskom intervalu od 1 - 4 h za sve kombinacije probiotičkih sojeva i sojeva *Candida*. Također, u istraživanju koje su proveli Pithva i sur. (2014), rezultati su pokazali visok stupanj koagregacije izolata roda *Lactobacillus* s *Candida* spp i enterobakterijama te je stupanj koagregacije nakon 4 sata iznosio 39 – 74 %.

#### 4.4. Antioksidacijska sposobnost stanica *Lpb. plantarium* S1 uz dodatak vodenog ekstrakta maginje (*Arbutus unedo* L.)



**Slika 8.** Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala pomoću stanica *Lpb. plantarium* S1 uz dodatak vodenog ekstrakta maginje u različitim koncentracijama izražena kao apsorbancija pri 517 nm ± standardna devijacija. \*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka pri p< 0,05

Iz dobivenih rezultata (slika 8) vezanih uz antioksidacijsku sposobnost bakterija mliječne kiseline bez i uz dodatak vodenog ekstrakta maginje koji su implementirani u kozmetičkom pripravku koji je u ovom istraživanju krema za ruke, vidljivo je kako su uzorci ukonili statistički značajno više slobodnih radikala u eksperimentalnom sustavu. Najniža zabilježena apsorbancija očitana je kod uzorka koji je sadržavao najveći postotak vodenog ekstrakta

maginje te je antioksidacijsko djelovanje ovdje najjače. Nešto viša apsorbancija zabilježena je kod uzorka koji je sadržavao vodeni ekstrakt maginje u iznosu od 10 %. Sukladno tome, u istraživanju koje su proveli Kostelac i sur. (2024) dobiveni rezultati ukazuju na to kako sami vodeni ekstrakt maginje ima visoku antioksidacijsku sposobnost koja je iznosila 98,98 %, ali se ta sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala značajno smanjila na 77,15% nakon fermentacije vodenog ekstrakta sa stanicama bakterija roda *Lactobacillus*. Pretpostavka je kako je do smanjenja antioksidacijske sposobnosti došlo zbog fermentacijske aktivnosti bakterija mliječne kiseline.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Zasebno, pripravljeni uzorak kreme za ruke i bakterijske stanice soja *Lactiplantibacillus plantarum* S1 značajno su inhibirali formaciju biofilma *Candida albicans* ATCC®10231™ tijekom 48 h inkubacije.
2. Termički tretirane stanice *Lpb. plantarium* S1 pri temperaturi 100 °C te vremenskom intervalu od 10 min, pokazale su najveću antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans* izraženu kao postotak inhibicije rasta.
3. Najviši stupanj koagregacije s patogenom *C. albicans* kod postignut je u vremenskom intervalu od 0 – 2 h kod svih ispitanih uzoraka (tretirane i netretirane bakterijske stanice). Najvišu zabilježenu aktivnost pokazale su vijabilne, netretirane stanice *Lpb. plantarium* S1, što ukazuje na smanjenje koagregacijske sposobnosti kao rezultat toplinskog tretmana i liofilizacije.
4. Uzorci kreme sa stanicama *Lpb. plantarium* S1 kojima je dodan vodeni ekstrakt maginje u različitim koncentracijama, pokazuju dobre antioksidacijske sposobnosti kod uklanjanja DPPH slobodnih radikala. Viša koncentracija vodenog ekstrakta maginje u uzorku kreme pokazuje višu antioksidacijsku aktivnost, iz čega slijedi da vodeni ekstrakt maginje poboljšava antioksidacijsku sposobnost kozmetičkog pripravka ovog tipa.

## 6. POPIS LITERATURE

Arct J, Pytkowska K (2008) Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin. Dermatol.*, **26**, str. 347–357 <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.01.004>

Aune D (2019) Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv. Nutr.*, **10**, str 404–421. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz042>

Bermudez – Brito M, Plaza - Diaz J, Munoz - Quezada S, Gomez – Llorente C, Gil A (2012) Probiotic Mechanisms of Action, *Ann Nutr Metab*, **61(2)**, str. 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>

Bernstein EF (2002) Reactive oxygen species activate the human elastin promoter in a transgenic model of cutaneous photoaging. *Dermatol. Surg.*, **28**, str. 132–135. [https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/abstract/2002/02000/reactive\\_oxygen\\_species\\_activate\\_the\\_human\\_elastin.7.aspx](https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/abstract/2002/02000/reactive_oxygen_species_activate_the_human_elastin.7.aspx)

Borges S, Silva J, Teixeira P (2012) Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(3), 677–682. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-96>

Brigelius – Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A (2002) The European perspective on vitamin E: Current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, str. 703–716. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.4.703>

Choi, C.M., Berson, D.S., (2006) Cosmeceuticals. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. <https://scmsjournal.com/wp-content/uploads/2016/08/v25i3-Choi.pdf>

Cogen AL, Nizet V, Gallo RL (2008) Skin microbiota: a source of disease or defence?, *British Journal of Dermatology*, str. 442–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x>

da Silva Vale A, de Melo Pereira GV, de Oliveira AC, de Carvalho Neto DP, Herrmann LW, Karp SG, Soccol VT, Soccol CR (2023) Production, Formulation, and Application of Postbiotics in the Treatment of Skin Conditions. *Fermentation*, **9(3)**, str. 264. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030264>

De Oliveira Pinto CA, Martins TE, Martinez RM, Freire TB, Velasco MV, Baby AR (2021) *Vitamin E in Human Skin: Functionality and Topical Products*, str. 3 – 17. [https://www.intechopen.com/chapters/77087?crsi=66249662&cicada\\_org\\_src=solvadermstore.com&cicada\\_org\\_mdm=direct](https://www.intechopen.com/chapters/77087?crsi=66249662&cicada_org_src=solvadermstore.com&cicada_org_mdm=direct)

Dini I, Laneri S (2021) The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules*, **26**, str. 3921. <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>

Dou J, Feng N, Guo F, Chen Z, Liang J, Wang T, Guo X, Xu Z (2023) Applications of Probiotic Constituents in Cosmetics, *Molecules*, **28(19)**, 6765 <https://doi.org/10.3390/molecules28196765>

Duarte M, Oliveira AL, Oliveira C (2022) Current postbiotics in the cosmetic market—an update and development opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**, str. 5879–5891. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12116-5>

Duvic M, Nagpal S, Asano TA, Chandraratna ASR (1997) Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(97\)80396-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(97)80396-9)

Gilchrest BA (1989) Skin aging and photoaging: An overview., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, str. 610–613. [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(89\)70227-9/pdf](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(89)70227-9/pdf)

Elmahdy A, Maibach H.I. (2017) *Textbook of Aging Skin* <https://doi.org/10.3390/molecules28196765>

Fitzmaurice S, Sivamani R, Isseroff R (2011) Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. *Ski. Pharmacol. Physiol.*, **24**, str. 113–126. <https://doi.org/10.1159/000322643>

Frece J, Markov K, Kovačević D (2011) Određivanje Autohtone Mikrobne Populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso* : prvi hrvatski časopis o mesu. **12**(2), 92–98.

Hajheydari Z, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Soltani A (2013) Effect of *Aloe vera* topical gel combined with tretinoin in treatment of mild and moderate acne vulgaris: a randomized, double-blind, prospective trial. *Journal of Dermatological Treatment*, **25**(2), str. 123–129. <https://doi.org/10.3109/09546634.2013.768328>

Jorgensen MR, Kragelund C, Jensen PO, Keller MK, Twetman S (2017) Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*. *Journal of Oral Microbiology*, **9**(1) <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>

Kitture R, Ghosh S, More PA, Date K, Gaware S, Datar S, Chopade BA, Kale SN (2015) Curcumin-Loaded, Self-Assembled Aloevera Template for Superior Antioxidant Activity and Trans-Membrane Drug Release. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **15**, str. 4039–4045.

Kim DY, Kim MK, Kim BW (2015) The Antioxidant and Skin Whitening Effect of *Withania somnifera* (Winter Cherry). *J. Food Hyg. Saf.*, **30**, str. 258–264. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.258>

Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J (2019) The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies, str. 15-19. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/exd.14032>

Kober MM, Bowe WP, (2015) The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging, *International Journal of Women's Dermatology*, Volume 2, Issue 2, str. 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2015.02.001>

Kostelac D, Dolenc F, Markovinović AB, Markov K, Bursać Kovačević D, Frece J. (2024) The Application of Probiotic Bacteria from Strawberry (*Fragaria ananassa* × Duch.) in the Fermentation of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo* L.) Extract. *Microorganisms*, **12**, 1000 <https://doi.org/10.3390/microorganisms12051000>

- Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I i sur. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *Int J Dairy Sci*, 112, 104828. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828>.
- Krutmann J (2009), Pre- and probiotics for human skin, *Journal of Dermatological Science*, Volume 54, Issue 1, str. 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.01.002>
- Kusumawati I, Indrayanto G (2013) Natural Antioxidants in Cosmetics, *Studies in Natural Products Chemistry*, Volume 40, str. 485-505. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1>
- Lertcanawanichakul M (2011) Isolation and Selection of Anti-Candida albicans Producing Lactic Acid Bacteria. *Walailak Journal of Science and Technology*, 2(2), str. 179–187. <https://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/162>
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, 4, str. 118–126. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>
- Lolou V, Panayiotidis MI (2019) Functional Role of Probiotics and Prebiotics on Skin Health and Disease. *Fermentation*, 5, str. 41. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020041>
- Lopes EG, Moreira DA, Gullón P, Gullón B, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK (2017) Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm *in vitro* assays, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 122, Issue 2, str. 450-461. <https://doi.org/10.1111/jam.13349>
- Matutinović D (2023) Razvoj kozmetičke industrije u Republici Hrvatskoj (završni rad) Sveučilište u Rijeci Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu, Rijeka <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:191:676102>
- McMullen RL, Dell'Acqua G, (2023) History of Natural Ingredients in Cosmetics, *Cosmetics*, 10(3), str. 71. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10030071>
- McMullen RL, (2018) *Antioxidants and the Skin*. <https://doi.org/10.1201/9781315207254>
- Musarra M, Amendola C, (2018) the Cosmetics Industry: Market Evolution and Customer Behaviors. *Fashion through History: Costumes, Symbols, Communication*, 1, str. 337. [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=ZJ9fDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA337&dq=musarra+and+amendola&ots=oYracf8pv6&sig=XDa4ehRkHk73ycPrfUEI0PK9Sxl&redir\\_esc=y#v=onepage&q=musarra%20and%20amendola&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=ZJ9fDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA337&dq=musarra+and+amendola&ots=oYracf8pv6&sig=XDa4ehRkHk73ycPrfUEI0PK9Sxl&redir_esc=y#v=onepage&q=musarra%20and%20amendola&f=false)
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, str. 1-9. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Parolin C, Croatti V, Laghi L, Giordani B, Tondi MR, De Gregorio PR, Foschi C and Vitali B (2021) Lactobacillus Biofilms Influence Anti-Candida Activity. *Front. Microbiol.* 12:750368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750368>

Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BRM (2014) Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**(1), str. 259–277. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0839-9>

Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM (2017) The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, **9**, str. 866. <https://doi.org/10.3390/nu9080866>

Rada M. (2019) Zbirka radova za popularizaciju znanosti [https://www.bib.irb.hr:8443/1050191/download/1050191.IMI\\_znanstveni\\_dalekozor\\_web.pdf](https://www.bib.irb.hr:8443/1050191/download/1050191.IMI_znanstveni_dalekozor_web.pdf)

Roudsari MR, Karimi R, Sohrabvandi S, Mortazavian AM (2015). Health Effects of Probiotics on the Skin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**(9), str. 1219–1240. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.680078>

Souak D, Barreau M, Courtois A, André V, Duclairoir Poc C, Feuilleley MGJ, Gault M (2021) Challenging Cosmetic Innovation: The Skin Microbiota and Probiotics Protect the Skin from UV-Induced Damage. *Microorganisms*, **9**, str. 936. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050936>

Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH (2006) Green tea, the “Asian paradox,” and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Surg*, **202**, str. 813–825. [https://journals.lww.com/journalacs/citation/2006/05000/green\\_tea,\\_the\\_asian\\_paradox,\\_and\\_cardiovascular.12.aspx](https://journals.lww.com/journalacs/citation/2006/05000/green_tea,_the_asian_paradox,_and_cardiovascular.12.aspx)

Teng Y, Huang Y, Danfeng X, Tao X, Fan Y (2022) The Role of Probiotics in Skin Photoaging and Related Mechanisms: A Review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **15**, str. 2455–2464. <https://doi.org/10.2147/CCID.S388954>

Vinderola G, Sanders ME, Salminen S (2022) The Concept of Postbiotics. *Foods*, **11**, str. 1077. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>

Zitouni H, Hssaini L, Ouaabou R, Viuda-Martos M, Hernández F, Ercisli S, Ennahli S, Messaoudi Z, Hanine H (2020) Exploring Antioxidant Activity, Organic Acid, and Phenolic Composition in Strawberry Tree Fruits (*Arbutus unedo* L.) Growing in Morocco. *Plants*; **9**(12), str. 1677. <https://doi.org/10.3390/plants9121677>

Xu Z, Li Y, Xu A, Xue L, Soteyome T, Yuan L, Ma Q, Seneviratne G, Hong W, Mao Y, Kjellerup BV, Liu J (2024) Differential alteration in *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* quorum-sensing systems and reduced *Candida albicans* yeast survival and virulence gene expression in dual-species interaction. *Microbiol Spectr.*, **12**: e00353-24 <https://doi.org/10.1128/spectrum.00353-24>



### Izjava o izvornosti

Ja \_\_\_\_\_Marta Horvatinović\_\_\_\_\_izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
Vlastoručni potpis