

# Primjena konzervansa u proizvodnji krema

---

**Mihlin, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* \_\_\_\_\_

*Rights / Prava:* \_\_\_\_\_

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**  
**PRERADA MLIJEKA**

Kristina Mihlin

**PRIMJENA KONZERVANSA U PROIZVODNJI KREMA**

ZAVRŠNI RAD

Karlovac, 2017.

Veleučilište u Karlovcu  
Stručni studij prehrambene tehnologije  
Prerada mlijeka

Kristina Mihlin

## **PRIMJENA KONZERVANSA U PROIZVODNJI KREMA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: dr. sc. Bojan Matijević, prof. v.š.

Broj indeksa autorice: 0314614083

Karlovac, studeni 2017.

# Primjena konzervansa u proizvodnji krema

## *Sažetak*

Primjena konzervansa široko je rasprostranjena, koristimo ih u proizvodnji hrane, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Oni u kozmetičkim proizvodima sprečavaju kvarenje, ali i rast različitih vrsta mikroorganizama. Najpoznatiji konzervans u kozmetičkoj industriji je paraben, ali zbog njegove štetnosti na zdravlje ljudi izbačen je iz upotrebe i zamijenjen neki drugim neškodljivim konzervansima. Osim sintetskih zamjena sve više se koriste prirodni konzervansi kao što je Geogard 221 koji kao aktivan sastojak sadrži dehidroksiocetenu kiselinu. Cilj ovog rada bio je istražiti primjenu Geogarda 221 u proizvodnji krema kako bi se spriječio rast *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*. Uzorci različitih vrsta krema sadržavali su 2mg/g Geogarda 221 i inokulirani su s testnim mikroorganizmima u količini od 5 do 7 logCFU/g. Kontaminirani uzorci krema čuvani pri sobnoj temperaturi i analizirani 0., 2., 7., 14. i 28 dan. Nakon 2. dana čuvanja broj mikroorganizama je pao za oko 2 do 3 ( $\Delta\log\text{CFU/g}$ ). Nakon 7. dan čuvanja u uzorcima krema nije pronađen niti jedan testni mikroorganizam. Dobiveni rezultati pokazuju učinkovito djelovanje Geogarda 221 na različite mikroorganizme i kada su oni prisutni u visokim koncentracijama.

**Ključne riječi:** dehidroksiocetena kiselina, konzervansi, mikroorganizmi, trajnost

## **Application of preservative in cream production**

### *Summary*

The use of preservatives in food production, pharmaceutical and cosmetic industry is widespread. In cosmetic products they prevent spoilage, but also the growth of different types of microorganisms. The most famous preservative in the cosmetic industry is paraben, but because of its harmfulness to human health it was discarded from use and replaced by other harmless preservatives. Apart from synthetic replacements, natural preservatives are increasingly used, such as Geogarda 221 which, as the active ingredient, contain dehydroxyacetic acid. The aim of this work was to explore the application of Geogarda 221 in the production of creams and prevent the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*. Samples of different types of creams contained 2mg/g of Geogarda 221 and were inoculated with test microorganisms in an amount of 5 to 7 logCFU/g. Contaminated samples of creams were kept at room temperature and analyzed 0, 2,7, 14 and 28 days. After the 2nd day of guarding number of microorganisms dropped by about 2 to 3 ( $\Delta\log\text{CFU/g}$ ). After the 7th day of guarding in samples of the cream no test microorganisms were found. The results obtained show effective action of Geogarda 221 on different microorganisms and when they are present in high concentrations.

**Key words:** dehydroxyacetic acid, durability, microorganisms, preservatives

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1 Stabilnost kozmetičkog proizvoda .....	2
2.2. Uzročnici kvarenja kozmetičkog proizvoda.....	3
2.2.1. Fizikalno – kemijski uzročnici kvarenja .....	3
2.2.2. Mikrobiološki uzročnici kvarenja .....	3
2.3. Upotreba probiotika u kozmetici.....	7
2.4. Konzervansi u kozmetici .....	8
2.4.1. Prirodni konzervansi koji se koriste u kozmetici .....	8
2.4.2. Utjecaj konzervansa na zdravlje potrošača .....	12
2.5. Zakonska regulativa o primjeni konzervansa u kozmetici .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.2. Metode rada.....	16
3.2.1. Priprema kreme .....	16
3.2.3. Čuvanje uzoraka i analize kreme .....	17
3.2.4. Određivanje pH – vrijednosti .....	17
3.2.6. Obrada rezultata .....	18
<b>4. REZULTATI</b> .....	19
4.1. pH – vrijednosti različitih krema.....	19
4.2. Utjecaj Geogarda 221 na različite mikroorganizme.....	20
<b>5. RASPRAVA</b> .....	24
5.1. pH – vrijednosti različitih krema.....	24
5.2. Utjecaj Geogarda 221 na različite mikroorganizme.....	25
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	26
<b>7. LITERATURA</b> .....	27

## 1. UVOD

Konzervansi su vrlo zastupljeni i imaju široku primjenu, nalazimo ih u hrani, pićima, kozmetičkim proizvodima, lijekovima i sl. Oni u kozmetičkim proizvodima sprečavaju njihovo kvarenje i sprečavaju rast bakterija te kvasaca i plijesni.

Kao konzervans u kozmetičkoj industriji najviše se koriste parabeni kako bi se produžila trajnost krema, pudera, rumenila, parfema, maskara i sl. Dugo vremena se mislilo da je ovaj konzervans neškodljiv i siguran za primjenu jer se nakon nanošenja na kožu vrlo brzo apsorbira, u organizmu metabolizira i izlučuje urinom. Međutim, istraživanja su pokazala kako kod oštećene kože parabeni izazivaju kontaktni dermatitis, iritiraju kožu, izazivaju preuranjeno starenje i karcinom kože. U tkivu karcinom dojke pronađena je visoka koncentracija parabena što je ovaj konzervans učinilo upitnim za daljnju upotrebu. Također je dokazano da malena količina melitparabena ne djeluje štetno na zdravlje, ali stalnom i dugotrajnom upotrebom nastaje kumulativno djelovanje (Byford i sur., 2002).

Europska komisija je u rujnu 2014. godine donijela mnogobrojne zabrane u vezi primjene konzervansa u kozmetičkoj industriji, ali je ograničila maksimalnu koncentraciju. Sve je ovo potaknulo razmišljanja o utjecaju konzervansa na ljudsko zdravlje. Osim toga, sve veći broj ljudi koji su alergični na kozmetiku zahtijevaju veću pažnju u odabiru sastojaka koje nanose na kožu. Danas brojne kozmetičke linije više ne zadrže paraben, koji su zamijenili drugi konzervansi neškodljivi za ljudsko zdravlje.

Posljednjih godina sve više raste primjena prirodnih konzervansa. Najdjelotvorniji prirodni konzervansi su Geogard 221, Silverion 2400 i Leucidal. Svojim djelovanjem Geogard 221 uspješno zamjenjuje primjenu parabena.

Cilj ovog rada bio je istražiti primjenu Geogarda 221 u proizvodnji krema kako bi se spriječio rast *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Stabilnost kozmetičkog proizvoda

Kozmetički proizvod je svaka tvar ili smjesa koja je namijenjena dodiru sa vanjskim dijelovima ljudskog tijela (koža, kosa, nokti, usnice ) ili sa zubima i sluznicom usne šupljine radi njihova čišćenja, zaštite, održavanja u dobrom stanju, mijenjanja njihova izgleda ili korekcije tjelesnih mirisa. U kozmetičke proizvode ubrajamo: kreme, losione, emulzije, gelove, maske, ulja, pudere, dezodoranse, parfeme, sapune. Kozmetički proizvodi moraju odgovarati zahtjevima propisanim Uredbom br. 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima koja propisuje da se za sve kozmetičke proizvode mora izraditi Izvješće o sigurnosti kozmetičkog proizvoda (*Cosmetic Product Safety Report*) i Procjena sigurnosti (*Safety assessment*). Izvješće se sastoji od podataka o sigurnosti kozmetičkih proizvoda (podaci o sastavu proizvoda, fizikalno-kemijski podaci, mikrobiološka čistoća, procjena mikrobiološke stabilnosti, toksikološki profil).

Svaki proizvođač kozmetike prilikom stavljanja kozmetičkog proizvoda na tržište mora priložiti odgovarajući test stabilnosti koji je prihvatljiv i učinkovit, te mora biti dokumentiran u proizvođačkoj dokumentaciji. Pritom, svaka sirovina bilo da je aktivna ili ne u proizvodu može utjecati na stabilnost proizvoda. Osim formulacije, na stabilnost utječe i proces proizvodnje (brzina miješanja, temperatura, količina punjenja), vrsta ambalaže, uvjeti skladištenja te transport. Testove stabilnosti potrebno je provoditi kod razvoja novih formulacija kozmetičkih proizvoda, u slučajevima značajnih promjena tijekom proizvodnog procesa, validacije nove opreme ili proizvodnog postupka, promijenjenih ulaznih sirovina te vidljivih promjena na pakovini koja je bila u dodiru s gotovim proizvodom.

Proizvođač za svaku formulaciju odabire parametre prema svojem iskustvu i provodi evaluaciju kod jedne ili više temperatura. Odabir parametara ispitivanja mora biti procijenjen od stručnjaka, a odluka se donosi za svaki kriterij temeljem interne procedure proizvodnje proizvođača i iskustva. Evaluacija kriterija dopušta predviđanje stvarne stabilnosti proizvoda i procjenu roka valjanosti. Neki od parametara varijabilnosti unutar roka valjanosti su: boja, izgled, miris, pH - vrijednost, viskoznost, promjena ambalaže, promjena mase, udio vode u proizvodu.



## 2.2. Uzročnici kvarenja kozmetičkog proizvoda

### 2.2.1. Fizikalno – kemijski uzročnici kvarenja

Fizikalno – kemijski čimbenici kvarenja kozmetičkih proizvoda mogu se razvrstati kao:

#### 1. Vanjski čimbenici :

- Rok trajnosti proizvoda (starenje proizvoda) može dovesti do promjena u senzorskim, fizikalno-kemijskim, mikrobiološkim i toksikološkim svojstvima.
- Temperatura - visoke i niske temperature tijekom postupka proizvodnje i skladištenja utječu na svojstva kozmetičkih proizvoda.
- Vlaga ima poseban utjecaj na pudere, toaletni sapun, sjenila, kupke od soli koje mogu postati mekane i ljepljive te sklone mikrobiološkom kvarenju.
- Ambalaža – vrsta ambalaže (staklena, metalna ili plastična) može utjecati na propusnost kisika, a samim time i na stabilnost kozmetičkog proizvoda.
- Manipulacija kozmetičkih proizvoda dovodi do vibracija što može utjecati na odvajanje faza, skrućivanje ili promjene u viskoznosti.

#### 2. Unutarnji čimbenici:

- Fizikalna nekompatibilnost sastojaka kozmetičkog proizvoda može dovesti do precipitacije, odvajanje faza, kristalizacija, nastajanje pukotina i sl.
- Kemijska nekompatibilnost sastojaka: promjena pH – vrijednosti (osigurava stabilnost proizvoda), oksido-redukcijske reakcije (dovode do promjene u djelotvornosti aktivnih sastojaka, senzorskim i fizikalnih promjena), reakcije hidrolize estera i amina, reakcije između sirovina i pakovine.

### 2.2.2. Mikrobiološki uzročnici kvarenja

Kada govorimo o izvorima mikroba koji dolaze u kozmetičkim proizvodima, to se prvenstveno odnosi na okoliš u kojem mikrobi obitavaju i iz kojeg se prenose na proizvod. Opće poznata činjenica je da su mikrobi svuda oko nas, kako u zraku tako i u tlu, vodama i na svemu što je dio okoliša. Međutim njihova koncentracija nije svugdje uvijek ista kao što nisu ni tipovi mikroba koji nastanjuju određena područja. Sastav i koncentracija mikrobne populacije ovisi o mnogim uvjetima, a također i o načinu rukovanja proizvodom pri samoj proizvodnji i skladištenju . Vrlo bitna nam je faza skladištenja odnosno pohrane gotovog proizvoda gdje nam

je prioritet te iste proizvode očuvati što duže i održati pri tome njihovu kvalitetu koliko god je moguće. Kako bi se kvaliteta i trajnost proizvoda što duže očuvala, moramo poznavati zakonitosti koje vladaju u prirodi i navedene uvjete rasta i razmnožavanja mikroba koji su prisutni u našem okolišu kao i načine kako adekvatno smanjiti populacije istih. Neki od parametara koji utječu na rast i razvoj mikroorganizama su: sadržaj vode, temperatura, osmotski i hidrostatski tlak, prisutnost i djelovanje drugih mikroba, pH vrijednost, sadržaj nutrijenata, antimikrobne zapreke i biološke strukture. Najvažniji uzročnici mikrobiološke kontaminacije kozmetičkih proizvoda su: bakterije, kvasci i plijesni.

Mikroorganizmi značajni za kozmetičke proizvode su:

### *Pseudomonas aeruginosa*

Gram negativne bakterije vrlo svestranih prehrambenih sposobnosti i lako se prilagođavaju novim sredinama. Uzrokuju upalu pluća kod osoba koje uzimaju imunosupresivne lijekove, te inficiraju rane i opekline. U kozmetici često uzrokuju infekcije oka i gubitak vida. Proizvod se najčešće kontaminira bakterijom u proizvodnom pogonu kao posljedica neuspjeha kontrole i nadzora vodovodnih cijevi, biofilmova koji se stvaraju na cijevima te lošim saniranjem cijevi. Koriste ciklus trikarboksilne kiseline za oksidaciju supstrata na ugljikov dioksid. Vrlo važna metabolička osobina je sposobnost razgradnje složenih ugljikohidrata, kloriranih pesticida i biocida. *P. aeruginosa* pokazuje svoje faktore virulencije tako što luči različite toksine, enzime i druge aktivne supstance koje se mogu prepoznati u oboljeloj osobi. Endotoksin je sličan endotoksinima crijevnih bakterija, ali se razlikuju u djelovanju jer izaziva nakupljanje tekućine (piocinski enterokolitis). Egzotoksin A je enzim koji djeluje inhibitorno na sintezu proteina, slično mehanizmu djelovanja fragmenta A egzotoksina *Corynebacterium diphtheriae*. Najčešće, mukoidni sojevi *P. aeruginosa* proizvode ekstraćelijsku sluz koja poseduje antifagocitno djelovanje. Fosfolipaza enzim koji hidrolizira lecitin i ima hemolitička svojstva. Izaziva upalne procese praćene edemom, eritemom i hemoragijom. Većina sojeva stvara proteaze koje razgrađuju kazein. Preživljava zahvaljujući svojim skromnim potrebama u hrani i brzom razmnožavanju. Mjesecima može živjeti u vodi. Sposobnost ove bakterije da izazove razaranje tkiva je posljedica djelovanja brojnih ekstracelularnih enzima (proteaza, elastaza), pigmenata koji inhibiraju rast drugih bakterija i hemolizina. Egzotoksin A izaziva destrukciju tkiva i nagomilavanje inflamatornih stanica. Slično aerobnim gram-negativnim bacilima, *P. aeruginosa* poseduje endotoksin koji je uzročnik enterokolitisa.

## *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je gram-pozitivna fakultativno anaerobna bakterija kuglasta oblika, nepokretna, ne tvori spore. Bakterijske stanice ove vrste promjera su između 0,5 i 1,5 µm. Nakon diobe stanice mogu ostati pojedinačne, u parovima, kratkim lancima, tetradama, a najkarakterističnije su nepravilne nakupine stanica u obliku grozda. Stafilocoki tvore mnoge ekstracelularne enzime i toksine i o tome ovisi patogenost i virulencija pojedinih sojeva. Vegetativne oblike bakterije (ne toksine) ubija temperatura od 60°C tijekom 8 minuta. Stafilokokno trovanje hranom (stafiloenterotoksikoza, stafiloenterotoksemija) je naziv za bolest čovjeka koju uzrokuju enterotoksini bakterije *Staphylococcus aureus* koji su prema svojem antigenom sastavu podijeljeni u tipove A, B, C1, C2, D i E. Ti enterotoksini uzrokuju alimentarne intoksikacije, termostabilni su (otporni na temperaturu od 100°C tijekom 30 minuta, 90%-tnu redukciju količine toksina uzrokovat će temperatura od 100°C tijekom 135 minuta) i otporni na djelovanje proteolitičkih enzima. Otrovanja najčešće uzrokuju enterotoksini A i D. Količina toksina manja od jednog mikrograma u kontaminiranoj hrani može uzrokovati simptome stafilokokne intoksikacije. Ako u 1 gramu hrane ima  $10^5$  stanica bakterije *S. aureus* u hrani se može naći količina toksina dostatna za uzrokovanje intoksikacije. Nastup znakova bolesti je brz, a karakteristično je da se svi inficirani gotovo istodobno razbole. Inkubacija je vrlo kratka, 2 do 6 sati. Najčešći znakovi bolesti su povraćanje, mučnina, grčevi u trbuhu i iscrpljenost. Proljev i povišena temperatura nisu uvijek izraženi. Pojedinci ne očituju uvijek sve navedene znakove intoksikacije. Dehidracija može biti znatna. U ozbiljnijim slučajevima mogu se javiti glavobolje, grčevi mišića i prolazni poremećaji u krvnom tlaku i bilu. Bolest je burna i kratkotrajna, oboljele osobe su nakon rehidracije obično dobro za 12 do 48 sati. Zlatni stafilocoki također uzrokuju infekcije kože i mekih tkiva u obliku rana, bubuljica ili gnojnih čireva/apscesa (impetigo, folikulitis, celulitis itd.), a mogu dospjeti u krv i uzrokovati trovanje krvi (sepsu), upalu pluća (pneumoniju), srčanog mišića (endokarditis) i kostiju (osteomijelitis). Neki sojevi stafilokoka proizvode toksine koji uzrokuju želučano-crijevnu upalu (gastroenteritis), stafilokokno trovanje hranom praćeno mučninom i povraćanjem, sindrom opečene kože obilježen velikim mjehurima i ljuštenjem kože, sindrom toksičnog šoka (moguć razvoj zbog uporabe vaginalnih tampona, nakon porođaja ili kao komplikacija postoperativne infekcije), gdje riječ sindrom predstavlja skupinu simptoma. Procjenjuje se da do 30 % zdravih osoba ima *S. aureus* u nosu i na drugim mjestima koja su vlažna ili obrasla dlakama. Ubrzo nakon porođaja stafilocoki koloniziraju kožu i sluznicu nosa i ždrijela novorođenčeta te tu kod nekih osoba trajno ostaju. *Staphylococcus aureus* se hrani ljudskim

hemoglobinom, proteinom iz crvenih krvnih zrnaca. Najčešći prijenosnici su osobe kojima je stafilokok normalna flora kože i sluzokože, a to su zdravstveni radnici, kulinarsko osoblje i veterinarski djelatnici. Stafilokok na koži izaziva tipične kožne infekcije gdje se koža manifestira oteklinama, crvenilom, bolovima i gnojnim apcesima.

Impetigo je prepoznatljiv po manjim dijelovima kože prekrivenim sitnim plikovima i gnojnim mjehurićima.

Furunkul je duboka infekcija koja u potpunosti zahvaća folikul dlake i obližnje tkivo, te predstavlja veliki čir koji se pojavljuje na vratu, licu i leđima.

### *Candida albicans*

*Candida albicans* je gljivica koja se normalno nalazi u ljudskom organizmu, a može se pronaći u ustima, probavnom traktu, vagini, koži, ali i u ostalim organima. No njezin rast uslijed brojnih čimbenika može izmaknuti kontroli i tada se pojavljuju infekcije, a u slučaju da se ne liječi širi se po čitavom organizmu sve do stanja kada je ona postaje nemjerljiva i time narušava cjelokupno zdravstveno stanje pojedinca. Zahvaljujući svojim korijenima *Candida albicans* se hvata za crijevni zid i ako tada nije zaustavljen njen rast, dolazi do bušenja i stvaranja sićušnih rupica u crijevnom zidu. Rupice dozvoljavaju djelomično probavljenim proteinima, toksinima, ali i samoj *Candidi albicans* ulazak u cirkulaciju te širenje po cijelom tijelu. Ovo stanje poznato je kao sistemska kandidijaza i može imati vrlo loše posljedice za cjelokupno psihofizičko stanje osobe. Parazitski oblik kandidate izlučuje otpadne tvari koje opterećuju jetru i cijeli organizam. *Candida albicans* proizvodi i jednu vrstu lažnog estrogena koji daje signal tijelu da ga ima dovoljno i time narušava prirodnu proizvodnju hormona, što ostavlja posljedice na endokrini sistem. Kada je razina šećera u krvi visoka, gljivica proizvodi etanol (alkohol), a nusprodukt aktivnosti gljivica je i acetaldehid, tvar slična formaldehidu, koji se može zamijetiti u lošem zadahu iz usta. Infekcija kandidom dovodi i do raznih biokemijskih poremećaja u organizmu; ometanje proizvodnje kolagena, oksidacije masnih kiselina, blokiranja normalnih živčanih funkcija i sprečavanja imunološkog sustava da se bori s infekcijama. Gljive mogu izazvati infekciju na sluznici čovjeka, koži ili jednom ili više unutranjih organa. Može se pronaći u tlu, zraku i u otpadnim vodama. *Candida albicans* je gljiva koja je sastavni dio čovjekove normalne flore, a može postati patogena ukoliko dođe do raznih poremećaja zdravlja. Primjenom kozmetičkog preparata zagađenog Candidom postoji mogućnost infekcije kože, koja se manifestira, crvenilom, osipom, svrabom i nepravilnim oblicima lezija na koži.

## *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* se nalazi među najčešćim plijesnima u okolišu, često se nalazi u raspadajućoj vegetaciji (u gomilama komposta), na izolacijskom materijalu, u uređajima za zagrijavanje/hlađenje zraka ili odvodima toplana, u kirurškim dvoranama i bolesničkim sobama, na bolničkim uređajima i na česticama prašine u zraku. Invazivne infekcije obično nastaju udisanjem spora ili, katkad, direktnim prodorom kroz oštećenu kožu. U nekih ljudi *Aspergillus* na površini kože izaziva alergiju, premda nije ušao u tkiva da bi uzrokovao infekciju. Alergije na koži se manifestiraju crvenilom, osipom, bolnim i osjetljivim plikovima te svrbežom. Toksin koji proizvode razne vrste *Aspergillus* je aflatoksin kojeg povezuju sa kancerogenim djelovanjem na jetru. Prisutnost *Aspergillus niger* u kozmetičkim pripravcima dokazujemo metodom HRN EN ISO 16212:2011.

### **2.3. Upotreba probiotika u kozmetici**

Riječ probiotik potječe od grčkih riječi “*pro bios*” što znači za život. Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene kod životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture. Mogu djelovati u probavnom traktu - kada se uzimaju hranom ili u obliku kapsula, u obliku aerosola pogodni su za gornje dišne putove ili se lokalno primjenjuju u području urogenitalnog trakta, na kožu lica i tijela. Vrste probiotičkih kompleksa koriste se i kao pomoćna terapija kod Crohnove bolesti, malignosti, enterovirusnih infekcija, gastritisa, čira želuca i dvanaesnika.

Pozitivanom učinku probiotičkih krema na kožu pridonosi mliječna kiselina koju tijekom rasta i fermentacije stvaraju probiotičke kulture. Mliječna kiselina (*acidum lacticum*) ima malu molekularnu masu, pa lako prodire odnosno upija se u kožu, ubrzava odstranjivanje odumrlih stanica, a ujedno pomaže dubokom ovlaživanju kože. Biološki aktivan mliječni protein pomaže obnavljanju osjetljive, jako suhe, upaljene kože. Probiotičke kulture proizvode organske kiseline koje zaustavljaju rast i razmnožavanje mikroorganizama, ali i specifične supstancije zbog kojih im se pripisuju svojstva prirodnog antibiotika širokog spektra. Same proizvode i vitamine B skupine, neobično važne za zdravlje kože.

Ispitivanja i praćenje zdravlja kože pacijenata pokazala su vidljive rezultate pri upotrebi ovakvih krema kod kože zahvaćene atopijskim dermatitisom, neurodermatitisom, seboroičnim dermatitisom. Već kod prvog nanošenja postala je puno vlažnija, smirenija, nestalo je peckanje, ljuskanje i iritacija. Poznato je da kod neurodermatitisa često dolazi do sekundarnih infekcija što je, ako se koriste probiotičke kreme, izbjegnuto zahvaljujući bakteriocinima, specifičnim

supstancijama koje na bakterije djeluju poput antibiotika. Upravo zato probiotičke kreme pomažu u tretmanu akni, gnojnih prištića. Upotrebom probiotičkih krema oštećena i iritirana koža vidljivo se obnavlja u vrlo kratkom roku, pa se preporučuje kod tegoba suhe i ispucale kože, alergija, crvenila i ljuskanja kože, neurodermatitisa, za kožu s aknama i kod stanja oštećene i stanjene kože nakon tretmana kortikosteroidima. Iz svih tih razloga sve je veća i potpuno opravdana primjena probiotičkih krema kako u kozmetici tako i u dermatologiji. Probiotičke kreme pravi su hit u kozmetologiji i u dermatologiji. Probiotici na kožu djeluju poput prirodnog antibiotika. Najbolji su izbor za suhu, oštećenu, ispucalu kožu, akne, upale, ali i liječenje bakterijskih i gljivičnih infekcija urogenitalnog i probavnog sustava, kao pomoćna terapija kod brojnih drugih bolesti.

## **2.4. Konzervansi u kozmetici**

### **2.4.1. Prirodni konzervansi koji se koriste u kozmetici**

Proizvodi koji u svom sastavu sadrže visok postotak vode su posebno osjetljivi na kvarenje, stoga im se dodaju razne kemijske supstance s ciljem sprečavanja rasta i razmnožavanja mikroorganizama, uzročnika njihovog kvarenja. Takve kemijske supstance nazivamo konzervansima. Njihova zadaća je da produlje trajnost kozmetičkog proizvoda bez promjena pozitivnih organoleptičkih osobina proizvoda (boja, miris, izgled), naročito prilikom dužeg životnog vijeka u skladištim proizvođača, distributera te na trgovačkim policama, i ono najvažnije – osigurati zdravstvenu ispravnost kozmetičkog proizvoda. Najčešće promjene kozmetičkog proizvoda izazvane djelovanjem mikroorganizama su formiranje kolonija na samoj površini proizvoda (znaju biti raznih boja, poput plijesni na starom kruhu ili nekom zaboravljenom limunu), zatim promjena boje i mirisa proizvoda, te promjena same teksture proizvoda.

Primarna kontaminacija kozmetičkog proizvoda rezultat je nepridržavanja smjernica dobre proizvođačke prakse prilikom proizvodnje, pa su u tom slučaju – kontaminirane sirovine, nesterilna ambalaža u proizvodnji, neadekvatna higijena pribora, opreme, samog proizvodnog pogona i zaposlenika u proizvodnji.

Sekundarna kontaminacija rezultat je prijenosa mikroorganizama u proizvod od strane potrošača. Događa se da prilikom aplikacije, potrošač nečistim rukama ili prijenosom s nečiste kože / kose potrošač “zarazi” proizvod. Najopasnije po zdravlje potrošača su patogene vrste mikroorganizama, uzročnici raznih bolesti (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*). Mnoge vrste gljivica proizvode metaboličke

produkte, tzv. mikotoksine vrlo opasne po zdravlje čovjeka. Mikotoksine je nemoguće odstraniti iz kozmetičkog proizvoda, čak i nakon odstranjivanja vidljivih nakupina gljivica sa površine proizvoda. Golim okom nevidljive stanice gljivica i mikotoksini zaostaju u proizvodu i predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača.

Jedna od glavnih karakteristika idealnog konzervansa jest širok spektar djelovanja, što znači da djeluje na više različitih vrsta mikroorganizama (najčešće se radi o bakterijama, gljivicama, plijesnima i kvascima). U proizvodnji prirodne kozmetike prednost se daje prirodnim konzervansima poput ekstrakta sjemenki grejpa, raznim kombinacijama eteričnih ulja i drugih biljnih ekstrakata te rijetkim sintetskim ekokonzervansima poput vrlo popularnog benzilnog alkohola, koji se na tržištu nalazi u kombinaciji sa dehidrooctenom kiselinom pod trgovačkim nazivom Geogard 221 ili INCI nazivom dehidroksi octena kiselina i benzil alkohol koji se lako pročita na deklaraciji proizvoda u popisu sastojaka. Nakon svega navedenog, može se zaključiti da je prisutnost konzervansa u kozmetičkim proizvodima sasvim opravdana. Štoviše, nužna je i potrebna, radi zaštite zdravlja potrošača, a znak je i odgovornog ponašanja proizvođača prema svojim kupcima, neovisno radi li se o prirodnoj ili konvencionalnoj kozmetici.

### **Geogard 221**

Benzilni alkohol organski spoj je iz klase kojoj pripada i benzaldehid i benzoati, koji su poznati konzervansi u zimnicama. Benzilni alkohol je inače široko primjenjivan farmaceutski konzervans koji se čak koristi i u injekcijskim oblicima. Dozvoljen je kao konzervans u eko kozmetici. Koristi se obično u koncentracijama 0,3-2%, što je puno, ali je vrlo djelotvoran konzervans. Kompanija Lonza prodaje konzervans koji je smjesa dehidrooctene kiseline i benzil alkohola. I dehidrooctena kiselina (DHA) je dozvoljena u eko kozmetici premda je petrokemijski dobivena, a komercijalna smjesa Geogard 221 sadrži 8% DHA, 87% benzilnog alkohola i 5% vode. Koristi se u koncentracijama od 0,3-0,8% i odličan je konzervans, jedan od rijetkih koji bez problema stoji uz bok parabenima i fenoksietanolu po djelotvornosti. Djeluje na pH od 2-7. U tako malim koncentracijama, uglavnom ne predstavlja nikakav teret za metabolizam, čak i kad se primjenjuje na djeci i na relativno velikoj površini tijela. Dapače, benzilni alkohol ima sposobnost smanjuje svrbež kože, što može biti korisno kod kožnih tegoba praćenih njime. Usprkos svemu, kao i na sve molekule, opisani su slučajevi alergija na ove proizvode, pa to ponekad treba imati na umu. Po mom iskustvu dobro djeluje već i kod 0,3%

kada relativno rijetko utječe na miris emulzija. Ipak, za komercijalne proizvode uobičajeno se koristi 0,6%.

### **Salicilna kiselina**

Salicilna kiselina davno je izolirana iz vrbove kore i poznata je farmaceutska supstancija. Čak ju i stručnjaci rijetko vezuju uz svojstvo konzerviranja, ali ona doista jest dobar konzervans, već u količini od 0,1-0,5% i kod pH od 4-6. Ipak, ona ima i jedno nezgodno svojstvo, a to je keratolitičko djelovanje, odnosno svojstvo da ljušti gornji sloj kože. Zbog toga treba biti oprezan s njom kod osoba sa suhom i stanjenom kožom, ali je odličan konzervans za proizvode namijenjene osobama s masnom kožom i aknama. Klasičan tonik sa salicilnom kiselinom i dan danas se koristi za liječenje akni. Zanimljivo, odobren je za upotrebu u eko kozmetici, uglavnom u sinergiji s drugim antimikrobnim tvarima.

### **Fenil – etil alkohol**

Fenil - etilni alkohol poznati je konzervans, a sama molekula se pojavljuje u prirodnim spojevima poput eteričnog ulja ruže. On sam ima lagani, cvjetni miris koji ima miris ruže, ali ne kontaminira jako konačni miris proizvoda. U komercijalnom emulgatoru tvrtke Sinerga pod nazivom feniol, dolazi otopljen u kaprilil-glikolu (1,2 butan-diol), gdje ga bude 55-65%. Dodaje ga se 0,8-1,2%. Smije ga se dodati do 1,5%, pogotovo ako računamo na rizik razvoja plijesni. Vrlo sličan njemu je proizvod Fenicap, koji sadrži vrlo sličan spoj fenil-propanol, opet otopljen u kaprilil-glikolu. Koristi se u istoj koncentraciji kao i Feniol. Ovaj konzervans dodaje se na kraju izrade konačne emulzije. Velika je prednost ova dva alkohola što su aktivni u vrlo širokom pH spektru, od 4-8. Feniol i Fenicap mala su igra birokracije: naime, kako *nisu* klasificirani u regulatornim agencijama kao konzervans, tako se njihovim korištenjem može deklarirati “bez konzervansa”, premda su u biokemijski gledano – konzervansi. Premda su daleko sigurniji do parabena, nisu službeno dozvoljeni prema COSMOS regulativi, ali znaju završiti u prirodnoj kozmetici.

### **Leucidal**

Leucidal je potpuno prirodni konzervans. Njegova antimikrobna aktivnost počiva djelomično na antimikrobnim peptidima koje luči mikroorganizam *Leuconostoc kimchii* tijekom fermentacije rotkve i kupusa. Stvorila ga je mala biotehnološka tvrtka Active Microtechnologies. To je vodeni ekstrakt bez mirisa i boje i upoznali smo ga kod tonika. Neke



tvrtke koje proizvode hidrolate koriste ga kao konzervans. Uobičajeno se dodaje u koncentracijama od 2-4%, no u emulzijskim sustavima mora ga biti 3-4%. Ne smije se zagrijavati na temperaturu veću od 70 °C jer postaje neaktivan i djeluje u pH području od 3-8. Ipak, on sadrži salicilate, u dovoljno niskoj koncentraciji da ne šteti niti jednom tipu kože, ali se ne koristi kod ljudi koji su alergični na salicilate. Premda je vrlo koristan za tonike, emulzijski sustavi ipak nisu prigodni za ovaj konzervans. Slabije je djelotvoran od Geogarda 221, a druga mu je mana što ga većina emulgatora teško podnosi i često čini emulzijske sustave rjeđima. Koristi se u kombinacijama oko 2-3% Leucidala, a malim udjelom Geogarda 221, oko 0,2-0,3%, pogotovo kada želimo postići minimalni efekt mirisa benzilnog alkohola.

### **Ekstrakt sjemenki grejpa**

Ekstrakt sjemenki grejpa dugo je godina bio fetiš većine zaljubljenika u prirodnu kozmetiku. Antimikrobno djelovanje glicerolnog ekstrakta sjemenki grejpa otkriveno je prije četrdesetak godina i pripisuje se dr. Jacob Harichu, inače fizičaru. U sastavu mu se ističu flavonoidi, limonoidi, steroli, vitamin C i E i limunska kiselina. Ekstrakt sjemenki grejpa pod komercijalnim nazivom se naziva Citricidal . Prirodni je proizvod, međutim nešto manje djelotvornosti. Ovisno o proizvođaču, dodaje ga se razrijeđenog 1000 – 10000 puta (0,1-0,01%) ako se radi o profesionalnom 60% ekstraktu. Premda je ekstrakt kompatibilan s većinom kozmetičkih sirovina, ekstrakt nije kompatibilan s anionskim organskim spojevima . Ekstrakt sjemenki grejpa ima jednu manu, a to je destabilizacija nekih emulzijskih sustava. Smanjuje viskoznost i kreme pretvara u mlijeka, a i uništava strukturu mnogih gelova, što uključuje i gel algi, ksantanski i karbopolni gel.

### **Silverion**

Silverion je odsjaj stare farmacije u novom ruhu. Srebro se stoljećima koristi u njezi kože kao blagi antiseptik i kao sredstvo za poticanje regeneracije kože. No najčešće se koristio srebrni nitrat koji je prilično nestabilan. Stoga je razvijen kelat iona srebra s limunskom kiselinom koji je daleko stabilniji. Srebro je kod nas bilo popularno najčešće u obliku koloidnog srebra. Ima farmaceutska industrija i svojih vrlina, a jedna od njih je svakako kontrola kvalitete, stoga je Silverion uvijek reproducibilnog sastava. Njegova radna koncentracija je 0,1-0,3%. Preporuča se da se koristi u rasponu između 0,2-0,3%. Silverion ne mijenja miris emulzijskim sustavima. Srebro kao plemeniti metal sklono je redukciji, odnosno iz kationa srebra nastaje elementarno srebro koje se može izlučiti po stijenkama posudice. Taj proces je uvelike ubrzan svjetlom,

stoga emulzijske sustave obavezno čuvajte u tamnim staklenim posudicama. Usprkos tome može nastati sivkasti rub na površini emulzija zbog izlučivanja elementarnog srebra. To ponekad neki protumače kao kvarenje kreme, premda takvo srebro nije opasno. Morate paziti i kada radite s njim. Ako vam se čisti Silverion prosipa po koži, taj dan će vam nastati tamne, sivo smeđe mrlje na koži. One nastaju zbog reakcije proteina (aminokiselina sa sumporom) i srebra, prilikom čega nastaje stabilan spoj tamne boje. Ova boja se ne da oprati s kože (jer se bojenje desilo u dubljim slojevima), već spontano nestane u roku nekoliko dana, taman toliko koliko treba da se obojene stanice kože prirodno odljušte. Srećom, ova je pojava potpuno bezopasna i ne ostavlja trajno obojenje. Silverion je odličan konzervans za tonike, a nešto je manje djelotvoran od Geogarda kod emulzija. Glavni Silverionov adut je odsustvo ikakvog mirisa.

#### 2.4.2. Utjecaj konzervansa na zdravlje potrošača

Mnogi ne znaju da nam velike kozmetičke kuće često nude proizvode koji su jeftino proizvedeni i predstavljaju ih kao najnovija dostignuća u njezi kože. Neki od proizvođača čak koriste i kvalitetne aktivne sastojke koje ističu na pakiranju, ali je njihov udio u cjelokupnom proizvodu izrazito malen. Naravno, pri tome se ne naglašavaju da se u proizvodu nalaze neke komponente koje su potencijalno opasne. Certificirana prirodna kozmetika, za razliku od spomenutih, brine se o ljudskom tijelu, te ga uljepšava zahvaljujući prirodnim sastojcima koji našoj koži neće naškoditi. Važno je napomenuti da prirodna kozmetika, prema kojoj se cijeli svijet u zadnjih nekoliko godina počinje okretati, istovremeno stimulira i održava prirodne funkcije kože, te zaista brine o vašem zdravlju. Kao konzervansi u prirodnoj kozmetici se koriste biljna i eterična ulja, propolis i prirodni alkohol, te odgovarajući postupci prilikom proizvodnje koji utječu na trajnost proizvoda. Prirodna kozmetika ne sadrži parafine, parabene, silikone, umjetna bojila, naftne derivate i dr.

Konzervansi poput nekih vrsta parabena i fenoksietanola mogu utjecati na reproduktivne sposobnosti, dok često korišten konzervans PEG (polietilen glikol) utječe na stvaranje preosjetljivosti kože, kao i sastojci poput mineralnih ulja i parafina. Umjetne boje i pesticidi dugoročno uzrokuju slabljenje imunološkog sustava, a česti u upotrebi u kozmetičkim proizvodima su i silikoni koji spadaju u iznimno teško razgradive spojeve u organizmu. Naravno, upotreba svih njih zakonski je regulirana te su doze koje se koriste u kozmetici dermatološki provjerene no ono što ostaje nerazjašnjeno jest pitanje njihovog taloženja u organizmu uslijed višegodišnje upotrebe.

Neki od štetnih sastojaka koje možemo naći u velikoj ponudi kozmetike su parabeni. Oni se koriste kao mikrobiološki konzervansi u kozmetici, farmaceutskim pripravcima, hrani, te predstavljaju najrasprostranjeniju grupu konzervansa. Metilparaben je toliko jak konzervans da stvara poremećaj u aktivnosti enzima, dok butilparaben utječe na rad ženskih spolnih organa. Najnovija istraživanja pokazuju da uzrokuju ženske probleme poput endometrioze, cista na jajnicima, PMS i menstrualnih grčeva, te potiču rast tumorskih stanica. Kod parabena je bitno naglasiti da se oni nakupljaju u masnom tkivu u tijelu, te tamo mogu ostati i više godina. Zatim glikol ester koji se također upotrebljava kao konzervans, značajno utječe na živčani sustav i stanice jetre. Konzervans kao što je EDTA izaziva jake dermatitise.

Naftni derivati, kao što su vazelin, petrolej, parafin i mineralno ulje koje često nalazimo u kozmetici (kreme, voskovi za depilaciju, dekorativna kozmetika, zaštitne kreme), a oni kreme čine mazivim, omekšavaju kožu i čine ju baršunastom izazivaju alergijske reakcije.

Propilenglikol je jedan od najčešće upotrebljivanih sastojaka u kozmetičkim pripravcima jer veže na sebe velike količine vode i ima veliku moć prodiranja u kožu, bolju nego glicerol. Obzirom da se smatra da ima neurotoksično djelovanje, preporuča se da se koristi sigurniji butilenglikol i polietilenglikol.

Vro je bitno za naglasiti da sve što nanesimo na kožu ima dovoljno sitnu molekulu da direktno prodire u naš krvotok, te je iznimno bitno znati što proizvodi sadrže, kako bi znali što nanosimo na našu kožu kroz naše dnevne rutine.

## **2.5. Zakonska regulativa o primjeni konzervansa u kozmetici**

Pristupanje Republike Hrvatske Europskoj Uniji za posljedicu je imalo brojne promjene u vidu direktiva i/ili smjernica svih regulatornih organa Europske Unije, koji su postrožili kriterije za vrednovanje maksimalnih dopuštenih koncentracija kemijskih sastojaka u kozmetičkim proizvodima i preparatima.

Jedna od značajnijih uredbi je Uredba br. 1223/2009 Europskog parlamenta i Vijeća o kozmetičkim proizvodima, koja za cilj ima pojednostaviti postupke i uskladiti terminologiju te time smanjiti administrativno opterećenje i dvosmislenost. Nadalje, njome se jačaju određeni elementi regulatornog okvira za kozmetičke proizvode, poput unutarnjeg nadzora nad tržištem s ciljem postizanja visoke razine zaštite zdravlja ljudi. U slučaju ozbiljne sumnje u pogledu sigurnosti bilo koje tvari sadržane u kozmetičkim proizvodima, nadležno tijelo države članice u kojoj je proizvod koji sadrži takvu tvar dostupan na tržištu, može putem obrazloženog zahtjeva zatražiti od odgovorne osobe da dostavi popis svih kozmetičkih proizvoda za koje je odgovoran i koji sadrže tu tvar. U tom je popisu potrebno navesti koncentraciju te tvari u

kozmetičkim proizvodima. Europska komisija je donijela mnogobrojne zabrane za primjenu konzervansa u kozmetičkoj industriji. Uz brojne zabrane i ograničenja koje Uredba donosi s ciljem zaštite zdravlja ljudi posebice je naglašena uoptreba konzervansa u kozmetičkim proizvodima.

**Tablica 1.** Popis dozvoljenih konzervansa u kozmetici.

Red. br.	Naziv	Max dopuštena koncentracija	Ograničenja i zahtjevi	Upozorenja na ambalaži
1.	Benzojeva kiselina i Na - sol	Proizvodi koji se ispiru, osim proizvoda za oralnu njegu: 2,5% (izraženo kao kiselina). Proizvodi za oralnu njegu: 1,7% (izraženo kao kiselina) Proizvodi koji ostaju na koži ili kosi 0,5% (izraženo kao kiselina)		
2.	Propionska kiselina i soli	2,0 % (izraženo kao kiselina)		
3.	Salicilna kiselina i soli	0,5% (izraženo kao kiselina)	Ne smije se koristiti u proizv. za djecu ispod 3god. starosti, osim za šampone	Ne koristiti za djecu ispod 3god. starosti
4.	Sorbinska kiselina i soli	0,6% (izraženo kao kiselina)		
5.	Formaldehid i Paraformaldehid	0,2% (osim za proizvode za oralnu higijenu) 0,1% (proizvodi za oralnu higijenu) Izražen kao slobodni formaldehid		
6.	Cinkov pirition	0,5%	Samo za proizvode koji se ispiru. Zabranjen u proizvodima za usnušupljinu.	
7.	Klorbutanol	Proizvodi za kosu: 1,0% Ostali proizvodi: 0,5%	Zabranjen za aerosole	Sadrži klorobutanol
8.	4 – hidroksibenzojeva kiselina, soli i esteri	0,4% (izraženo kao kiselina) za 1 ester 0,8% (izraženo kao kiselina) za smjesu estera		
9.	Dehidrooctena kiselina i soli	0,6% (izraženo kao kiselina)	Zabranjena za aerosole	
10.	Benzilni alkohol	1,0%		

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za istraživanje korišteni su slijedeći materijali:

1. Autoklav Systec 2540 EL, Bel-Art products, Pequannock, ZDA
2. Hladnjak, Gorenje, Slovenija
3. Inkubator WTB, Binder, Tuttlingen, Njemačka
4. Magnetska mješalica Rotamix 606 MMH – 550 MMH, Slovenija
5. pH metar 780, Metrohm, Herisan, Švicarska
6. Sabouraud bujon, Biomerieux, Marcy – Etoile, Francuska
7. Columbia agar, Fluka Analytical, Sigma – Aldrich, Španjolska
8. TSA, Biomerieux, Marcy – Etoile, Francuska
9. Dehidroctena kiselina, Sigma – Aldrich, Aldrichchemistry, Švicarska
10. Benzojeva kiselina, Sigma – Aldrich, Aldrichchemistry, Švicarska
11. Hidratantna krema s ružom
12. Krema s tratinčicom
13. Krema s peršinom
14. Krema s čajevcem

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema kreme

Sirovi za određenu kremu se odvagaju i doziraju u stroj za miješanje prema određenom redoslijedu. Postupak miješanja provodi se pri određenoj temperaturi, brzini miješanja i vakuumkroz određeno vrijeme. Započinje laganim zagrijavanjem karite ili kokosovog maslaca kako bi se otopio. Zatim se dodaju krute, tekuće i uljne sirovine kako bi se otopile, a smjesa postala homogena. Vrijeme miješanja je vrlo važno radi nekih karakteristika samog proizvoda, kao što je tekstura i viskoznost. Smjesa se zatim hladi i dodaju se sirovine osjetljive na visoku temperaturu.

Sastojci hidratantne kreme s ružom: voda, ulje badema, cvjetna vodica damašćanske ruže, karite maslac, bijeli vosak, ulje divlje ruže, ulje alpske ruže, vitamin E, ulje avokada, benzilni alkohol, alanin, citonolol, dehidrooctena kiselina.

Sastojci kreme s tratinčicom: voda, alkoholni ekstrakt tratinčice, alkoholni ekstrakt peršina, glicerol stearat, vitamin E, ulje slatke naranče, kakao maslac, dehidrooctena kiselina.

Sastojci kreme s peršinom: voda, alkoholni ekstrakt peršina, glicerol, ulje pasiflore, glicerol stearat, vitamin E, dehidrooctena kiselina, karite maslac, ulje smilja, benzilni alkohol.

Sastojci kreme s čajevcem: voda, glicerol, dikapril-karbonat, propilheptil - kaprilat, ciklodekstrin, ulje čajevca, natrij - poliakrilat, benzilni alkohol, natrij sterol glutamat, limonen, dehidrooctena kiselina.

### 3.2.2. Priprema mikrobnih kultura i uvjeti čuvanja

Testiranje konzervansa Geogarda 221 provedeno je sa slijedećim mikrobnim kulturama: *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candidaalbicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis (niger)* ATCC 16404. Površina TSA ili SDA inokulirane su sasvežom kulturom mikroorganizama. Bakterijske kulture su inkubirane na 30 – 35 °C / 18-24h, kultura *Candidaalbicans* pri 20-25 °C / 48 h i *A. Brasiliensis* pri 20-25 °C / 7 dana. Porasle kolonije na hranjivoj podlozi su isprane sterilnom fiziološkom otopinom i prenesene u prikladnu posudu. Volumen suspenzije mikroorganizama se nadopuni kako bi se postiglo 10<sup>8</sup>CFU/mL. Kulture *A. brasiliensis* ispiru se s fiziološkom otopinom uz dodatak polisorbata 80 (0,5 g/L). Pripremljena suspenzija mikrobne kulture se zatim nacijepi kako bi se utvrdio početni broj mikroorganizama. Kremi se doda 1% vol mikrobne kulture.

### 3.2.3. Čuvanje uzoraka i analize kreme

Za procjenu utjecaja konzervansa na preživljavanje različitih mikrobnih kultura u kremi, pripremljeni uzorci su čuvani pri 20-25 °C. Tijekom pohrane uzorci su analizirani 0., 2., 7., 14. i 28. dan. Pokusi su ponovljeni tri puta.

### 3.2.4. Određivanje pH - vrijednosti

pH - vrijednost je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini. Koncentracija vodikovih iona mjeri se pH – metrom. Elektroda pH – metra se ispiru sa destiliranom vodom i suši staničevinom. Prije početka provođenja analize provodi se kalibracija elektroda pH - metra. Princip rada je takav da se elektroda uroni u čašu u kojoj se nalazi krema i očita vrijednost pH.



Slika 9: pH – metar Metrohm 780.

### 3.2.5. Mikrobiološka analiza uzoraka kreme

#### *Dokazivanje prisutnosti Pseudomonas aeruginosa (HRN EN ISO 22717:2010)*

U prvoj fazi ispitivanja treba uzeti prikladnu količinu proizvoda i dodaje se TSA agar. Tako pripremljeni uzorak se inkubira na 30-35 ° C na 18-24 sati. Nakon inkubacije prenosi se 0,1 mL uzorka na ploču agara centrimid i inkubira na 30-35 °/18-72h C. Pojava zelenih kolonija na TSA agaru ukazuje na prisutnost *Pseudomonas aeruginosa*.

#### *Dokazivanje prisutnosti Staphylococcus aureus (HRN EN ISO 22718:2010)*

U prvoj fazi ispitivanja treba uzeti prikladnu količinu proizvoda i dodaje se TSA agar. Tako pripremljeni uzorak se inkubira na 30-35 ° C na 18-24 sati. Nakon inkubacije prenosi se 0,1 mL uzorka na agar ploče s manitolom i natrijevim kloridom i inkubira se pri 30-35 ° / 18-72h C. Rast žućkasto-bijelih kolonija okruženih žutom zonom ukazuje na moguću prisutnost *Staphylococcus aureus*.

#### *Dokazivanje prisutnosti Candida albicans i Aspergillus brasiliensis (niger) (HRN EN ISO 16212:2011)*

U prvoj fazi ispitivanja uzima se odgovarajuća količina proizvoda i dodaje se Sabouraud bujon s dekstrozom. Uzorak se inkubira na 30-35°C 3-5 dana. Nakon inkubacije prenosi se 0,1 mL uzorka na Sabouraud agar ploču s dekstrozom i inkubira se na 30-35 °C / 24 – 48 h.

### 3.2.6. Obrada rezultata

Svi rezultati su provedeni u programu Microsoft office Excelu 2003 i prikazani su kao srednja vrijednost u tablicama.



## 4. REZULTATI

### 4.1. pH – vrijednosti različitih krema

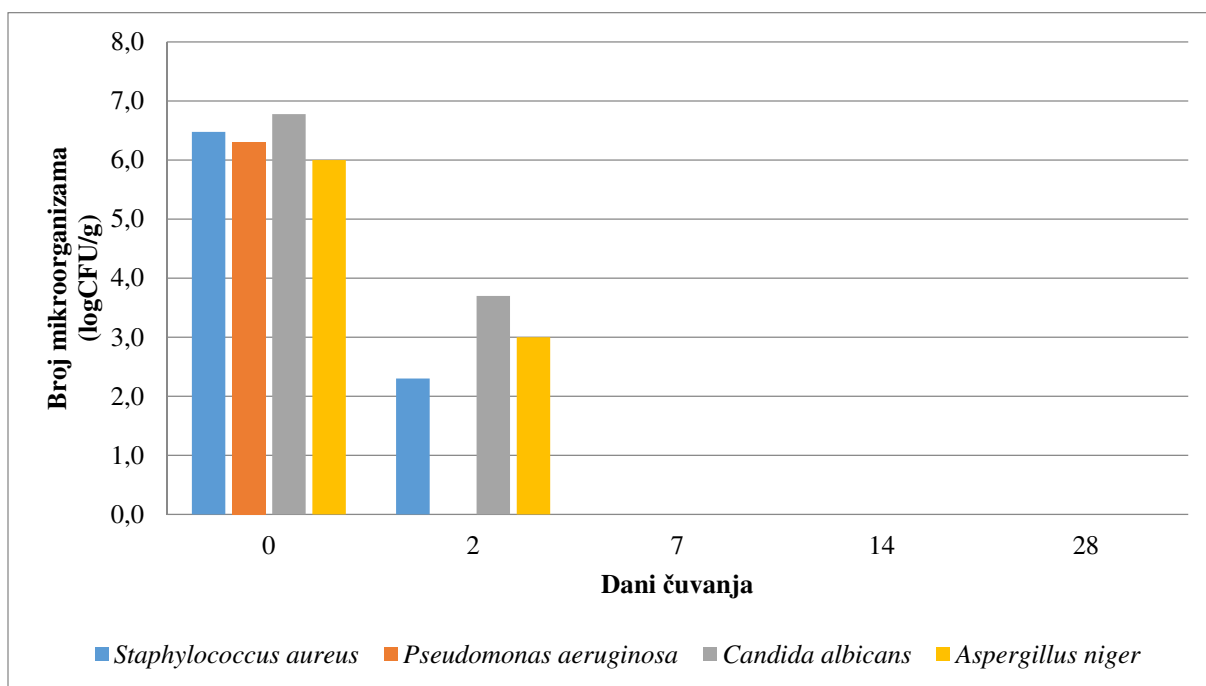
**Tablica 2.** pH - vrijednosti različitih vrsta krema kojima je dodan konzervans Geogard 221 u količini od 2mg/g.

Vrsta kreme	pH - vrijednost
Krema s peršinom	6,4
Krema s tratinčicom	6,1
Krema s čajevcem	6,0
Hidratantna krema s ružom	6,0

## 4.2. Utjecaj Geogarda 221 na različite mikroorganizme

**Tablica 3.** Preživljavanje različitih vrsta mikroorganizama u hidratantnoj kremi s ružom kojoj je dodan Geogard 221 u količini od 2mg/g.

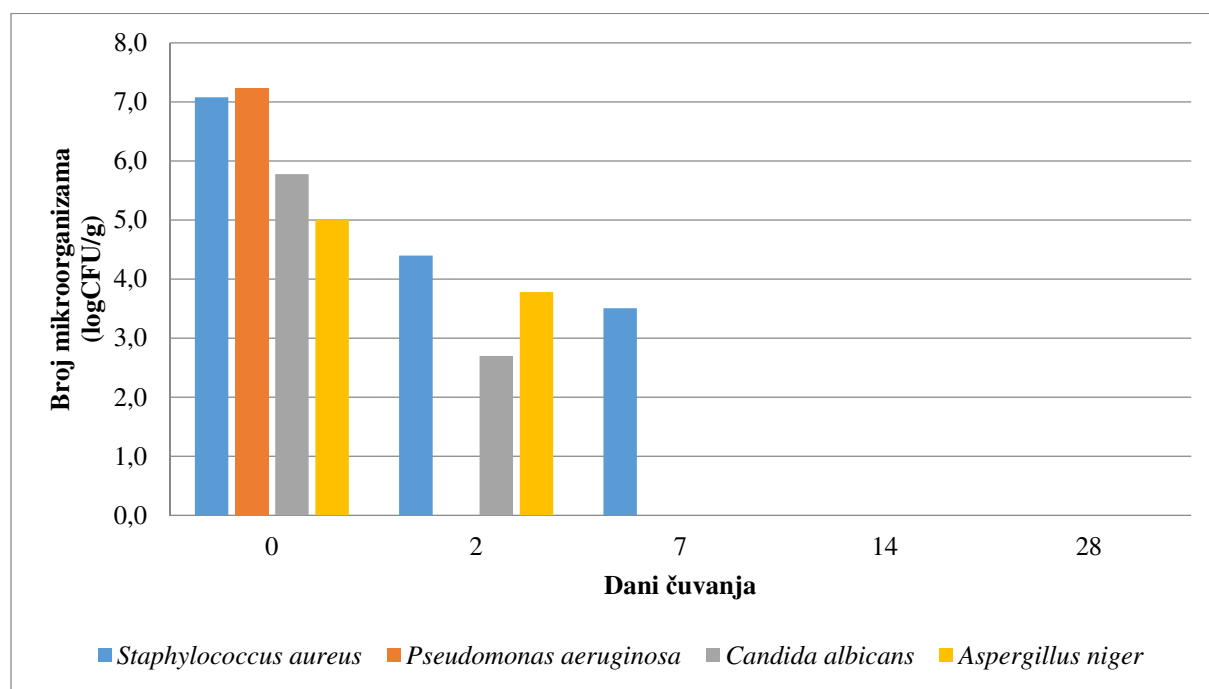
		Broj mikroorganizama CFU/g			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Dani čuvanja	0	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
	2	$2,0 \times 10^2$	0	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
	7	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0



**Slika 1.** Promjena broja mikroorganizama u hidratantnoj kremi s ružom i Geogardom 221 (2 mg/g) tijekom 28 dana čuvanja.

**Tablica 4.** Preživljavanje različitih vrsta mikroorganizama u kremi s peršinom kojoj je dodan Geogard 221 u količini od 2mg/g.

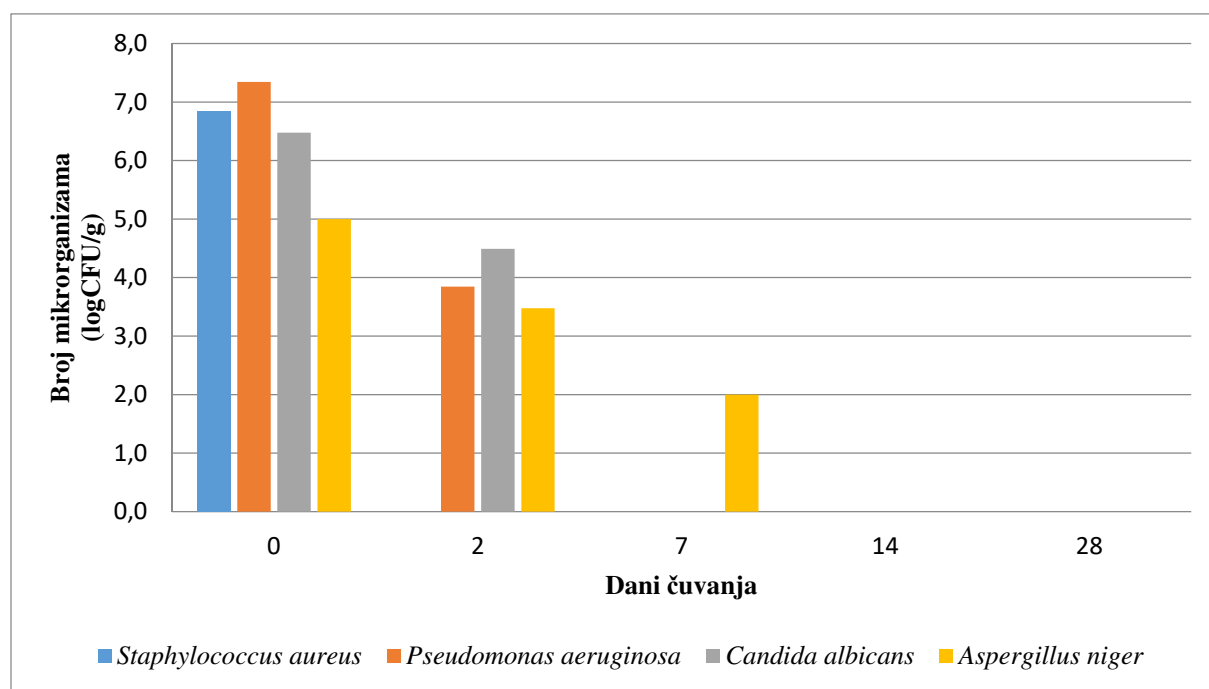
		Broj mikroorganizama CFU/g			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Dani čuvanja	0	$1,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
	2	$2,5 \times 10^4$	0	$5,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3$
	7	$3,2 \times 10^3$	0	0	0
	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0



**Slika 2.** Promjena broja mikroorganizama u kremi s peršinom i Geogardom 221 (2 mg/g) tijekom 28 dana čuvanja.

**Tablica 5.** Preživljavanje različitih vrsta mikroorganizama u kremi s čajevcem kojoj je dodan Geogard 221 u količini od 2mg/g.

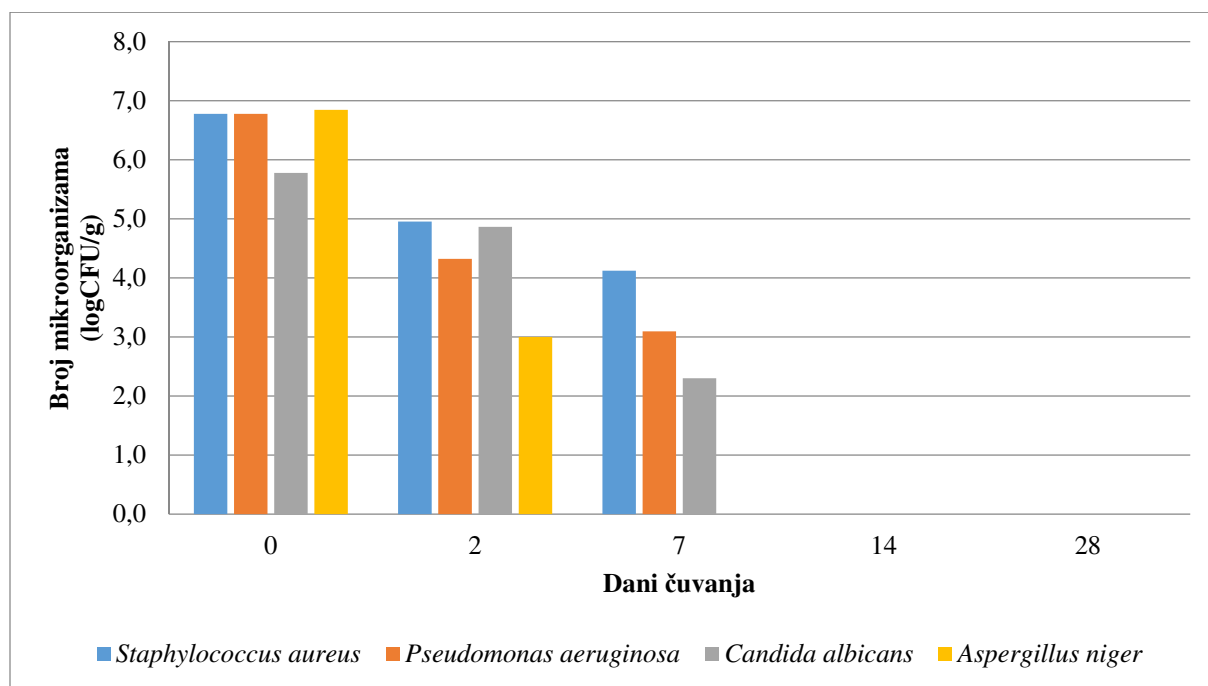
		Broj mikroorganizama CFU/g			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Dani čuvanja	0	$7,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
	2	0	$7,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
	7	0	0	0	$1,0 \times 10^2$
	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0



**Slika 3.** Promjena broja mikroorganizama u kremi s čajevcem i Geogardom 221 (2 mg/g) tijekom 28 dana čuvanja.

**Tablica 6.** Preživljavanje različitih vrsta mikroorganizama u kremi s tratinčicom kojoj je dodan Geogard 221 u količini od 2mg/g.

		Broj mikroorganizama CFU/g			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Dani čuvanja	0	$6,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$
	2	$9,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
	7	$1,3 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	0
	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0



**Slika 4.** Promjena broja mikroorganizama u kremi s tratinčicom i Geogardom 221 (2 mg/g) tijekom 28 dana čuvanja.

## 5. RASPRAVA

Konzervansi su tvari koje se dodaju u kozmetičke proizvode kako bi spriječile rast mikroorganizama i spriječile kvarenje. Ukoliko postoje i minimalni uvjeti za život (vlažnost, temperatura, izvor hrane) doći će do rasta i razvoja mikroorganizama. Stoga kozmetika predstavlja povoljan supstrat za mikroorganizme. Kozmetički proizvodi bez konzervansa iako proizvedeni u sterilnim uvjetima imali bi vrlo kratak rok trajnosti, trebali bi se transportirati u hladnim uvjetima, a već samo otvaranje proizvoda dovelo bi do ulaska različitih mikroorganizama i do kvarenja. Sve ovo govori u prilog upotrebe konzervansa u kozmetičkim proizvodima kako bi se spriječio rast mikroorganizama, što može izazvati razgradnju samog proizvoda, ali i infekciju kože. Ovo je situacija u kojoj dodatak konzervansa u manjim koncentracija je bolje rješenje i stvara manje štete koži od različitih mikroorganizama i produkata njihovog metabolizma. Osim sintetskih konzervansa u posljednje vrijeme sve više se koriste prirodni konzervansi kao što je Geogard 221, a nemaju štetni utjecaj na zdravlje pojedinca. Ovaj konzervans kao aktivan sastojak sadrži dehidroksiocetenu kiselinu. Stoga je cilj ovog rada bio je istražiti primjenu Geogarda 221 u proizvodnji krema kako bi se spriječio rast *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*.

### 5.1. pH – vrijednosti različitih krema

Jedan od čimbenika djelovanje konzervansa, ali i za rast i razvoj mikroorganizama kiselost ili alkalnost sredine, odnosno pH – vrijednost. Geogard 221 svoju aktivnost pokazuje pri pH od 2 do 7, pri čemu optimalna aktivnost je u rasponu od 6 do 7.

Proizvedene kreme imale su pH u rasponu od 6,0 do 6,4, što odgovara vrijednosti optimalnog djelovanja Geogarda 221 (tablica 2). Najviša vrijednost je izmjerena kod kreme s tratinčicom 6,4, a ostale kreme imale su pH oko 6,0.

Svaka vrsta mikroorganizama za svoj rast zahtjeva određenu pH – vrijednost, koje mogu biti: optimalne (pri kojima se najbolje razvijaju), minimalne i maksimalne. Najveći broj bakterija najbolje raste u neutralnoj do slabo kiseloj sredini u granicama pH od 6,5 do 8,0. Kvasci i plijesni trebaju kiselu sredinu pH od 3,0 do 6,0.

Sve vrste krema svojim pH – vrijednostima ne predstavljaju idealan supstrat za pojedine testne mikroorganizme. *Pseudomonas aeruginosa* najbolje raste oko 7,5 pH jedinica, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis* najbolje rastu oko 4,5 pH jedinica. Kreme svojim pH vrijednostima najbolje odgovaraju *Staphylococcus aureusu* koji najbolje raste od 6,0 do 7,0.

## 5.2. Utjecaj Geogarda 221 na različite mikroorganizme

Geogard 221 je konzervans koji se dodaje u kozmetičke proizvode u količini od 0,2 do 1,0%. Za konzerviranje različitih vrsta krema korištena je koncentracija od 0,2% i istražen je njen utjecaj na testne mikroorganizme tijekom 28 dana čuvanja na 8°C.

*Staphylococcus aureus* inokuliran je u količinama od  $3 \times 10^6$  do  $1,2 \times 10^7$  CFU/g. Broj živih stanica počeo je padati već nakon 2 dana čuvanja. Najveći pad stanica zabilježen je u kremi s čajevcem (tablica 5) gdje je nakon 2 dana iznosio oko 6,85 logCFU/g i nakon tog vremena više nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 3). *Staphylococcus aureus* najbolje je preživljavao u kremi s peršinom i kremi s tratinčicom (tablica 4 i 6). U ove dvije kreme nakon 2 dana čuvanja pad broja stanica bio je od 1,82 do 2,60 logCFU/g, a nakon 14 dana čuvanja nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 2 i 4).

*Pseudomonas aeruginosa* inokulirana je u količinama od  $2 \times 10^6$  do  $2,2 \times 10^7$  CFU/g. Broj živih stanica počeo je padati već nakon 2 dana čuvanja. Najveći pad stanica zabilježen je u kremi s ružom (tablica 3) i kremi s peršinom (tablica 4) gdje je nakon 2 dana više nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 1 i 2). *Pseudomonas aeruginosa* najbolje je preživljavala u kremi s tratinčicom (tablica 6). U ovoj kremi tek nakon 14 dana čuvanja nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 4).

*Candida albicans* inokulirana je u količinama od  $6 \times 10^5$  do  $6,0 \times 10^6$  CFU/g. Broj živih stanica počeo je padati već nakon 2 dana čuvanja. Najveći pad stanica zabilježen je u kremi s ružom (tablica 3) i kremi s peršinom (tablica 4) gdje je nakon 7 dana više nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 1 i 2). *Candida albicans* najbolje je preživljavala u kremi s tratinčicom (tablica 6) gdje tek nakon 14 dana čuvanja nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 4).

*Aspergillus niger* inokuliran je u količinama od  $1,0 \times 10^5$  do  $7,0 \times 10^6$  CFU/g. Broj živih stanica počeo je padati već nakon 2 dana čuvanja. Najveći pad stanica zabilježen je u kremi s gotovo u svim vrstama krema nakon 7 dana kad više nije izolirana niti jedna živa stanica. *Aspergillus niger* najbolje je preživljavala u kremi s tratinčicom (tablica 6) gdje tek nakon 14 dana čuvanja nije izolirana niti jedna živa stanica (slika 4).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata praćenja utjecaja konzervansa Geogard 221 na testne mikroorganizme (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger*) tijekom čuvanja od 28 dana može se zaključiti slijedeće:

1. Broj živih stanica testnih mikroorganizama počinje padati već nakon 2 dana čuvanja.
2. Geogard 221 uspješno reducira broj živih stanica u kremi već nakon 7 dana čuvanja.
3. Stanice testnih mikroorganizama najbolje su preživljavale u kremi s tratinčicom.
4. Dobiveni rezultati pokazuju učinkovito djelovanje Geogarda 221 na različite mikroorganizme i kada su oni prisutni u visokim koncentracijama.



## 7. LITERATURA

1. Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., Kumar Bansal, A. (2010.): Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **75** (2), 206-212.
2. Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., Kumar Bansal, A.(2010): Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **75** (2), 206-212.
3. Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G.B., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D. (2002): Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells, *Journal of Steroid Biochemistry*, **80**, 49–60.
4. Chan Hew Wai, A., Becasse, P., Tworski, S., Pradeau, D., Planas, V.(2014): Optimising concentrations of antimicrobial agents in pharmaceutical preparations: Case of an oral solution of glycerol and an ophthalmic solution containing cysteamine. *Annales Pharmaceutiques Françaises* , **72** (6), 415-421.
5. Geis, P.A.(2006): *Cosmetic Microbiology - A Practical Approach*, 2 nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
6. Ghelardi, E., Celandroni, F., Gueye, S. A., Salvetti, S., Campa, M., Senesi, S.(2013): Antimicrobial activity of a new preservative for multiuse ophthalmic solutions, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **29** (6), 586-590.
7. ISO (2010): Kozmetika - Mikrobiologija - Dokazivanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, HRN EN ISO 22717.
8. ISO (2010): Kozmetika - Mikrobiologija - Dokazivanje bakterije *Staphylococcus aureus*, HRN EN ISO 22718.
9. ISO (2011): Kozmetika - Mikrobiologija - Brojenje kvasaca i plijesni, HRN EN ISO 16212.
10. Narodne novine (2013): Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Narodne novine 83.
11. Narodne novine (2013): Zakon o lijekovima, Narodne novine 76.
12. Narodne novine (2014): Zakon o lijekovima, Narodne novine 90.
13. Palijan, G.(2002): *Praktikum iz mikrobiologije – bakteriologija*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

14. Sanchez-Prado, L., Alvarez-Rivera, G., Lamas, J.P., Lompart, M., Lores, M., Garcia-Jares, C.(2013.): *Content of suspected allergens and preservatives in marketed baby and child care products*, 416–427.