



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Милица И. Станковић

**ПРИМЕНА КОНЦЕПТА ДИЗАЈНА
КВАЛИТЕТА У РАЗВОЈУ ЛИПОФИЛНОГ
КРЕМА СА БИЉНИМ ЕКСТРАКТИМА И
МАСНИМ УЉИМА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Milica I. Stanković

**THE APPLICATION OF QUALITY BY DESIGN
CONCEPT IN THE DEVELOPMENT OF
LIPOPHILIC CREAM WITH PLANT EXTRACTS
AND FATTY OILS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Ивана Нешић, ванредни професор, Универзитет у Нишу,
Медицински факултет

Наслов: Примена концепта дизајна квалитета у развоју липофилног крема
са биљним екстрактима и масним уљима

Резиме: Циљ докторске дисертације је био фармацеутски развој липофилног крема са активним компонентама биљног порекла, који садржи оптималну комбинацију стандардизованог екстракта и масног уља плодова трњине, дивље руже, зове и јаребике (*Prunus spinosa* L., *Rosa canina* L., *Sambucus nigra* L. и *Sorbus aucuparia* L.), задовољавајуће стабилности, безбедности, ефикасности и апликативних својстава, применом концепта дизајна квалитета. *In vitro* испитивање екстраката плодова добијених ултразвучном екстракцијом са различитим растварачима (метанол, 70% етанол, 45% пропиленгликол, пречишћена вода) обухватало је одређивање физичко-хемијских особина, анализу садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина, процену антиоксидативне, антитирозиназне активности и утицаја екстраката на вијабилност фибробласта. Као најбогатији извор испитиваних биоактивних једињења, са добром антиоксидативном и антитирозиназном активношћу и позивитним утицајем на вијабилност фибробласта, одабран је водени екстракт шипурка у концентрацији од 3,5% за инкорпорирање у липофилни крем. Упоређивањем приноса масних уља из плодова након Soxhlet и наткритичне екстракције, утврђена је боља ефикасност методе наткритичне екстракције за изоловање масних уља из семена. Анализиран је садржај масних киселина у добијеним масним уљима из плодова и семена применом гасне хроматографије. Одабрана су масна уља из семена трњине, шипурка и зове за формулацију крема, у концентрацијама које одговарају садржају линолне киселине од

0,815%. Органолептичком проценом липофилних крема, испитивањем физичко-хемијске стабилности (pH вредност, електрична проводљивост, тест центрифугирања) у студији у трајању од 12 месеци, анализом сензорних карактеристика и *in vivo* проценом иритационог потенцијала (као аспекта безбедности примене на кожу) и ефикасности (утицај на влажност, садржај површинских липида, pH коже, меланин индекс, као и трансепидермални губитак воде), показано је да липофилни крем са комбинацијом екстракта шипурка (35 mg/g) и масног уља семена трњине (22,4 mg/g) поседује оптималне сензорне карактеристике, стабилност, повољан безбедносни профил и највећу ефикасност у примени, па се предлаже као потенцијални фармацеутски препарат за лечење суве коже, промена на кожи у склопу атопијског дерматитиса (пруритис, ксероза, екцем), у третману хиперпигментација коже, у заштити коже од UV зрачења и оксидативног стреса, који доводе до губитка виталности коже и фотостарења коже.

Научна област:

Фармација

Научна
дисциплина:

Фармацеутска технологија

Кључне речи:

дизајн квалитета; липофилни крем; екстракти плодова трњине, дивље руже, зове и јаребике; масна уља; наткритична екстракција; линолна киселина; сува кожа; атопијски дерматитис; оксидативни стрес

УДК:

665.584.2:615.322.012

CERIF
класификација:

B 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација, токсикологија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: dr Ivana Nešić, associate professor, University of Niš, Faculty of Medicine

Title: The application of quality by design concept in the development of lipophilic cream with plant extracts and fatty oils

Abstract: The aim of the PhD thesis was pharmaceutical development of lipophilic cream with active components of plant origin, which contains optimal combination of standardized fruit extract and fatty oil of blackthorn, dog rose, elderberry and rowanberry (*Prunus spinosa* L., *Rosa canina* L., *Sambucus nigra* L. and *Sorbus aucuparia* L., respectively), with satisfactory stability, safety, efficiency and applicative properties, using quality by design concept. *In vitro* examination of ultrasonic fruit extracts with different solvents (methanol, 70% ethanol, 45% propylene glycol, purified water) included physico-chemical properties determination, polyphenolic compounds, organic acids and vitamins contents analyses, evaluation of antioxidant and anti-tyrosinase activity and influence on fibroblasts viability. As the richest source of bioactive compounds, with good antioxidative and anti-tyrosinase activity and positive influence on fibroblasts viability, an aqueous extract of rose hip at concentration of 3.5% was selected for incorporation into lipophilic cream. After the yields of fruit fatty oils obtained by Soxhlet and supercritical extraction were compared, a better efficiency of the supercritical extraction method for fatty oil isolation from seeds was found. Analysis of fatty acid content in the fruit and seed oils was carried out by gas chromatography. Blackthorn, rose hip and elderberry seed oils were selected for cream formulation at concentrations corresponding to the linoleic acid content of 0.815%. Organoleptic evaluation of lipophilic creams, physicochemical stability testing (pH value, electrical conductivity, centrifugation test) during the 12 months study, sensory characteristics analysis and *in vivo* estimation of

irritation potential (as an aspect of skin application safety) and efficiency (effects on hydration, surface lipid content, skin pH, melanin index, as well as transepidermal water loss), showed that lipophilic cream with rose hip extract (35 mg/g) and blackthorn seed oil (22.4 mg/g) had optimal sensory characteristics, stability, favorable safety profile and the highest application efficiency, so it is suggested as potential pharmaceutical preparation for the treatment of dry skin, changes associated with atopic dermatitis (pruritis, xerosis, eczema), hyperpigmentations, UV radiation protection and oxidative stress, which lead to the loss of skin vitality and photoaging.

Scientific
Field:

Pharmacy

Scientific
Discipline:

Pharmaceutical Technology

Key Words:

quality by design; lipophilic cream; blackthorn, dog rose, elderberry and rowanberry fruit extracts; fatty oils; supercritical extraction; linoleic acid; dry skin; atopic dermatitis; oxidative stress

UDC:

665.584.2:615.322.012

CERIF
Classification:

B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

др Ивана Нешић, ванредни професор, ментор и члан

Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Светлана Ибрић, редовни професор, председник

Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду

др Славица Сунарић, редовни професор, члан

Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Јелена Живковић, доцент, члан

Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Вања Тадић, научни саветник, члан

Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ Београд

Датум одбране: _____

Захвалница

Искрено се захваљујем свом ментору, члановима комисије и колегама на сарадњи, сугестијама и стручним саветима који су допринели изради ове докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем својој породици на разумевању и свестраној подршци.

Mojoj porodici

To my family

Листа скраћеница

•OH_NS – способност неутрализације слободних хидроксилних радикала, неспецифична за место везивања (енг. *Hydroxyl Radical Scavenging, Nonsite Specific*)

•OH_SS – способност неутрализације слободних хидроксилних радикала, специфична за место везивања (енг. *Hydroxyl Radical Scavenging, Site Specific*)

ASTM – интернационална организација за стандарде (енг. *American Society for Testing and Materials*)

BCB – обезбојавање β-каротена (енг. *β-Carotene Bleaching*)

BHT – 3,5-ди-терц-4-бутилованихидрокситолуен (енг. *3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene*)

CE – еквивалент катехина (енг. *Catechin Equivalents*)

CG – цијанидин-3-О-глукозид хлорид

CMAs – критични атрибути материјала (енг. *Critical Material Attributes*)

CO₂ – угљеник(IV)-оксид

CPPs – критични процесни параметри (енг. *Critical Process Parameters*)

CQAs – критични атрибути квалитета (енг. *Critical Quality Attributes*)

DAD – диодни детектор (енг. *Diode Array Detector*)

DMSO – диметил-сулфоксид (енг. *dimethyl sulfoxide*)

DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (енг. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

dw – маса сувог екстракта (енг. *dry weight*)

DMEM – медијум за ћелијске културе (енг. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

EFA – есенцијалне масне киселине (енг. *Essential Fatty Acids*)

ЕДТА – етилендиаминтетрасирћетна киселина (енг. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FAMEs – метил естри масних киселина (енг. *Fatty Acid Methyl Esters*)

FBS – фетални говеђи серум (енг. *Fetal Bovine Serum*)

FC – енг. *Folin-Ciocalteu*

FIC – хелатациона активност према јонима гвожђа (енг. *Ferrous Ion Chelating Activity*)

FID – пламено-јонизујући детектор (енг. *Flame Ionization Detector*)

FLD – флуоресцентни детектор (енг. *Fluorescence Detector*)

FRAP – способност редукције јона гвожђа (енг. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

GAE – еквивалент галне киселине (енг. *Gallic Acid Equivalents*)

GC – гасна хроматографија (енг. *Gas Chromatography*)

GC-MS – гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (енг. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

HPLC – течна хроматографија високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography*)

ICH – Интернационална конференција за хармонизацију (енг. *International Conference on Harmonisation*)

LDL – липопротеин ниске густине (енг. *Low-Density Lipoprotein*)

L-DOPA – L-3,4-дихидроксифенил-аланин (енг. *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*)

MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (енг. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

MUFAs – мононезасићене масне киселине (енг. *Monounsaturated Fatty Acids*)

Na₂EDTA x 2H₂O – динатријумова со етилендиаминететраацетне киселине, дихидрат (енг. *ethylenediaminetetraacetic acid disodium dihydrate*)

NMF – природни влажећи фактор (енг. *Natural Moisturizing Factor*)

NOS – азот-оксид синтетаза (енг. *Nitric Oxide Synthase*)

НКЕ – наткритична екстракција

PAT – процесна аналитичка технологија (енг. *Process Analytical Technology*)

PBS – раствор пуфера (енг. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCA – анализа главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis*)

PUFAs – полинезасићене масне киселине (енг. *Polyunsaturated Fatty Acids*)

QbD – дизајн квалитета (енг. *Quality by Design*)

QTTP – циљани профил квалитета производа (енг. *Quality Target Product Profile*)

RD – релативна густина (енг. *Relative Density*)

RE – еквивалент рутина (енг. *Rutin Equivalents*)

RI – индекс рефракције (енг. *Refractive Index*)

RNS – реактивне азотне врсте (енг. *Reactive Nitrogen Species*)

ROS – реактивне кисеоничне врсте (енг. *Reactive Oxygen Species*)

RP-HPLC – реверзно-фазна течна хроматографија високих перформанси (енг. *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography*)

RSC – способност неутрализације слободних радикала (енг. *Radical Scavenging Capacity*)

SC – површински слој коже (лат. *stratum corneum*)

SCH – хидратација најповршнијег слоја епидермиса *stratum corneum*-а (енг. *Stratum Corneum Hydration*)

SD – стандардна девијација (енг. *standard deviation*)

SFAs – засићене масне киселине (енг. *Saturated Fatty Acids*)

SPE – екстракција на чврстој фази (енг. *Solid Phase Extraction*)

SSL – садржај површинских липида коже (енг. *Skin Surface Lipids*)

TAC – садржај укупних антоцијана (енг. *Total Anthocyanin Content*)

TBA – тиобарбитурна киселина (енг. *thiobarbituric acid*)

TCA – трихлорсирћетна киселина (енг. *trichloroacetic acid*)

TEWL – трансепидермални губитак воде (енг. *Transepidermal Water Loss*)

TFC – садржај укупних флавоноида (енг. *Total Flavonoid Content*)

TIA – анти tiroзиназна активност, односно инхибиција ензима тирозиназе (енг. *Tyrosinase Inhibition Assay*)

TPAC – садржај укупних проантоцијанидина (енг. *Total Proanthocyanidin Content*)

TPC – садржај укупних фенола (енг. *Total Phenolic Content*)

TPTZ – 2,4,6-трис-(2-пиридил)-s-триазин (енг. *2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine*)

TTC – садржај укупних танина (енг. *Total Tannin Content*)

UFAs – незасићене масне киселине (енг. *Unsaturated Fatty Acids*)

UV – ултраљубичасто (енг. *ultraviolet*)

В/У – вода/уље

Листа табела

Табела 1. Преглед биљних врста коришћених у експерименталном раду	31
Табела 2. Преглед сировина коришћених за израду испитиваних липофилних крема (В/У емулзија)	34
Табела 3. Састав испитиваних липофилних крема (% m/m).....	60
Табела 4. Опис атрибута коришћених у различитим фазама сензорне студије	64
Табела 5. Циљани профил квалитета производа (QTPP) и критични атрибути квалитета (CQAs) у фармацеутском развоју липофилног крема са екстрактима и масним уљима плодова	70
Табела 6. Садржај влаге у испитиваним дивљим плодовима, изражен у процентима (g/100 g свежих плодова)	73
Табела 7. Преглед израђених ултразвучних екстраката дивљих плодова и одговарајући приноси екстракције	74
Табела 8. Вредности физичко-хемијских параметара испитиваних екстраката плодова	76
Табела 9. Укупан садржај одређених група полифенолних једињења: фенола (TPC), флавоноида (TFC), танина (TTC); проантоцијанидина (TPAC) и антоцијана (TAC) у испитиваним екстрактима плодова	78
Табела 10. Квалитативни и квантитативни садржај полифенолних једињења (mg/100 g екстракта) у екстрактима испитиваних плодова.....	86
Табела 11. Квалитативни и квантитативни садржај органских киселина (mg/100 g екстракта) у екстрактима испитиваних плодова.....	93
Табела 12. Квалитативни и квантитативни садржај анализираних витамина ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ екстракта) у екстрактима испитиваних плодова.....	96
Табела 13. Антиоксидативна активност екстраката плодова: способност неутрализације DPPH радикала (DPPH), азот-оксид радикала (NO), хидроксилних радикала – неспецифична за место везивања ($\cdot\text{OH}_{\text{NS}}$) и специфична за место везивања ($\cdot\text{OH}_{\text{SS}}$).....	103
Табела 14. Антиоксидативна активност екстраката плодова: способност хелатације јона гвожђа (FIC), способност обезбојавања β -каротена (BCB) и способност редукције јона гвожђа (FRAP)	105
Табела 15. Резултати GC-FID и GC-MS анализе масних уља плодова и семена, добијених у процесу наткритичне екстракције (приказане су само компоненте од значаја за приказани експериментални рад).....	125
Табела 16. Средња вредност резултата процене сензорних атрибута за липофилне кремове .	134
Табела 17. Приказ резултата сензорне процене испитиваних узорака липофилних крема за атрибуте за које су коришћени описни термини.....	138

Листа слика

Слика 1. Дивљи плодови испитиваних биљних врста: а) трњина (<i>Prunus spinosa</i> L., Rosaceae), б) дивља ружа (<i>Rosa canina</i> L., Rosaceae), в) зова (<i>Sambucus nigra</i> L., Adoxaceae), г) јаребика (<i>Sorbus aucuparia</i> L., Rosaceae).....	4
Слика 2. Структурне формуле засићених и незасићених масних киселина	20
Слика 3. Хроматограми испитиваних екстраката плодова са пиковима идентификованих полифенолних једињења добијених DAD детекцијом: а) екстракти плодова трњине (360 nm), б) екстракти шипурка (360 nm), в) екстракти плодова зове (325 nm), г) екстракти плодова јаребике (360 nm).....	89
Слика 4. Хроматограми испитиваних екстраката а) плодова трњине, б) шипурка, в) плодова зове и г) плодова јаребике са пиковима идентификованих органских киселина, добијених DAD детекцијом на 220 nm	95
Слика 5. Хроматограми екстраката плодова са пиковима идентификованих витамина: A – тиамин у екстрактима а) PSPE; б) SNWE; в) SAPE ($\lambda_{ex} = 370$ nm и $\lambda_{em} = 435$ nm); B – рибофлавин у екстрактима а) RCWE; б) SNWE; в) SAPE ($\lambda_{ex} = 440$ nm и $\lambda_{em} = 520$ nm); B – α -токоферол у екстрактима а) RCEE; б) SNME; в) SAME; г) PSME ($\lambda_{ex} = 295$ nm и $\lambda_{em} = 330$ nm), добијени FLD детекцијом	100
Слика 6. Семе из плодова испитиваних биљних врста коришћено за добијање масног уља методом наткритичне екстракције: 1 – семе трњине; 2 – семе шипурка; 3 – семе зове; 4 – семе јаребике.....	118
Слика 7. Активне компоненте коришћене у изради узорака липофилних крема: а) водени екстракт шипурка, б) масна уља из семена (редом с лева на десно) трњине, шипурка и зове..	128
Слика 8. Изглед плацебо узорка (1 – PL), активних узорака липофилних крема са инкорпорираним екстрактом и масним уљима природног порекла (2 – ACSN; 3 – ACRC; 4 – ACPS) и узорка са линолном киселином синтетског порекла (5 – ACLA)	129

Листа графикона

Графикон 1. Анализа главних компоненти садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката испитиваних плодова: а) дистрибуција варијабли – садржај полифенолних једињења и антиоксидативне активности, б) дистрибуција испитиваних екстраката. Укупан садржај фенола (TPC), флавоноида (TFC), танина (TTC), проантоцијанидина (TPAC), антоцијана (TAC), способност неутрализације DPPH радикала (DPPH), азот-оксид радикала (NO), хидроксилних радикала – неспецифична за место везивања (*OH_NS) и специфична за место везивања (*OH_SS), способност хелатације јона гвожђа (FIC), способност обезбојавања β-каротена (BCB) и способност редукције јона гвожђа (FRAP).....	108
Графикон 2. Антитирозиназна активност (TIA) екстраката плодова.....	111
Графикон 3. <i>In vitro</i> одређен утицај испитиваних екстраката а) плодова трњине, б) шипурка, в) плодова зове и г) плодова јаребике, у различитим концентрацијама, на вијабилност фибробласта L-929 ћелијске линије (изражен у %).....	115
Графикон 4. Садржај уља у плодовима испитиваних биљних врста добијених методом Soxhlet екстракције и наткритичне екстракције (изражен у % (m/m) у односу на масу сувих плодова)	118
Графикон 5. Садржај уља у семену испитиваних биљних врста добијених методом наткритичне екстракције.....	119
Графикон 6. Вредности рН (а) и електричне проводљивости (б) узорака кремова 7 дана, 1, 3, 6 и 12 месеци након израде.....	132
Графикон 7. Вредности рН (а) и електричне проводљивости (б) узорака кремова пре и након теста центрифугирања.....	133
Графикон 8. Сензорна мапа испитиваних узорака липофилних кремова са атрибутима за које је коришћена структурирана скала.....	136
Графикон 10. <i>In vivo</i> ефикасност примене узорака липофилних кремова. Резултати су приказани као проценат промене вредности параметара а) SCH, б) TEWL, в) MI, г) EI, д) SSL и њ) рН, у односу на одговарајуће базалне вредности, након апликације узорака током периода од 28 дана, као и 4 дана након престанка третмана.....	147

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Концепт дизајна квалитета и његова примена у развоју фармацеутског производа.....	1
1.2. Дивљи плодови као потенцијални извор сировина за фармацеутску индустрију.....	3
1.3. Биоактивна једињења присутна у биљним екстрактима.....	6
1.4. Методе добијања екстраката из биљног материјала.....	8
1.5. Главни састојци масних уља.....	10
1.6. Методе екстракције масног уља из биљног материјала.....	11
1.7. Слободни радикали и оксидативни стрес.....	13
1.8. Штетни ефекти оксидативног стреса на кожу.....	14
1.9. Антиоксиданси и њихова улога у заштити од оксидативног стреса.....	15
1.10. Улога оксидативног стреса у поремећајима пигментације коже.....	18
1.11. Сува кожа – карактеристике суве коже и промене на кожи у склопу атопијског дерматитиса.....	19
1.12. Липофилни крем као фармацеутски облик за локалну терапију биљним екстрактима и масним уљима.....	24
2. ЦИЉ И СТРАЖИВАЊА.....	27
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ.....	31
3.1. Материјали.....	31
3.1.1. Биљни материјал.....	31
3.1.2. Хемикалије и реагенси.....	31
3.2. Методе.....	34
3.2.1. Идентификација циљаног профила квалитета фармацеутског производа и селекција критичних атрибута квалитета.....	34
3.2.2. Одређивање садржаја влаге у испитиваним плодовима.....	35
3.2.3. Припрема екстраката плодова одабраних биљних врста.....	36
3.2.3.1. Одређивање приноса екстракције.....	36
3.2.4. Физичко-хемијска <i>in vitro</i> карактеризација екстраката плодова.....	37
3.2.5. Анализа садржаја полифенолних једињења у екстрактима испитиваних дивљих плодова <i>in vitro</i> методама.....	37
3.2.5.1. Одређивање садржаја укупних фенола.....	37
3.2.5.2. Одређивање садржаја укупних флавоноида.....	38
3.2.5.3. Одређивање садржаја укупних танина.....	38

3.2.5.4. Одређивање садржаја укупних проантоцијанидина	39
3.2.5.5. Одређивање садржаја укупних антоцијана.....	39
3.2.6. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима испитиваних плодова.....	40
3.2.6.1. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и органских киселина у екстрактима испитиваних плодова.....	40
3.2.6.2. HPLC анализа садржаја витамина у екстрактима испитиваних плодова	42
3.2.6.2.1. Анализа садржаја тиамина и рибофлавина.....	42
3.2.6.2.2. Анализа садржаја α -токоферола	43
3.2.7. <i>In vitro</i> испитивање антиоксидативне активности екстракта плодова	44
3.2.7.1. Одређивање способности неутрализације DPPH радикала	44
3.2.7.2. Одређивање способности неутрализације азот-оксид радикала	45
3.2.7.3. Одређивање степена деградације 2-дезоксид-Д-рибозе посредством неутрализације хидроксилних радикала (неспецифична и специфична за место везивања)	46
3.2.7.4. Одређивање способности хелатације екстракта према јонима гвожђа.....	47
3.2.7.5. Одређивање способности инхибиције обезбојавања β -каротена	48
3.2.7.6. Одређивање редукционе способности екстракта.....	49
3.2.8. <i>In vitro</i> испитивање антитирозиназне активности екстракта плодова	49
3.2.9. <i>In vitro</i> испитивање примене екстракта плодова на ћелијским културама.....	50
3.2.9.1. Култивисање ћелија	50
3.2.9.2. Пасажа ћелија	51
3.2.9.3. Одређивање густине ћелија.....	51
3.2.9.4. Тест вијабилности/цитотоксичности.....	52
3.2.9.5. МТТ тест	52
3.2.9. Статистичка анализа	53
3.2.10. Екстракција масних уља из плодова	54
3.2.10.1. Екстракција масних уља из плодова применом Soxhlet технике екстракције	54
3.2.10.1.1. Припрема узорак за екстракцију.....	54
3.2.10.1.2. Поступак извођења Soxhlet екстракције	55
3.2.10.1.3. Одређивање приноса екстракције	55
3.2.10.2. Екстракција масних уља из плодова и семена – наткритична екстракција са угљеник(IV)-оксидом	56
3.2.10.2.1. Одређивање приноса екстракције	57
3.2.11. Дериватизација узорак масних уља.....	57
3.2.12. Анализа садржаја добијених масних уља применом техника гасне хроматографије (GC-FID и GC-MS).....	58
3.2.12.1. Гасна хроматографија (GC-FID).....	58

3.2.12.2. Гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS)	58
3.2.13. Статистичка анализа	59
3.2.14. Формулација, израда и испитивање липофилних кремава	59
3.2.14.1. Формулација и израда испитиваних липофилних кремава.....	59
3.2.14.2. Процена физичко-хемијске стабилности израђених липофилних кремава у дужем временском интервалу (испитивање „ <i>in use</i> “ стабилности).....	61
3.2.14.2.1. Органолептичка процена испитиваних кремава.....	61
3.2.14.2.2. Одређивање рН вредности испитиваних кремава	61
3.2.14.2.3. Одређивање електричне проводљивости испитиваних кремава.....	62
3.2.14.2.4. Испитивање физичке стабилности тестом центрифугирања.....	62
3.2.14.3. Статистичка анализа	62
3.2.15. Сензорна процена испитиваних узорака липофилних кремава	63
3.2.15.1. Статистичка анализа	64
3.2.16. Методе за <i>in vivo</i> карактеризацију липофилних кремава – биофизичке методе.....	65
3.2.16.1. <i>In vivo</i> процена безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних кремава на кожи здравих хуманих добровољаца	66
3.2.16.2. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности липофилних кремава на кожи здравих хуманих добровољаца.....	67
3.2.16.3. Статистичка анализа.....	68

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА..... 69

4.1. Идентификација циљаног профила квалитета фармацеутског производа и селекција критичних атрибута квалитета	69
4.2. Карактеризација испитиваних плодова – одређивање садржаја влаге	72
4.3. Припрема екстраката плодова одабраних биљних врста.....	73
4.4. Физичко-хемијска <i>in vitro</i> карактеризација екстраката плодова	75
4.5. Анализа садржаја полифенолних једињења у испитиваним екстрактима плодова <i>in vitro</i> методама	77
4.6. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима испитиваних плодова.....	82
4.6.1. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења у екстрактима испитиваних плодова ..	82
4.6.2. HPLC анализа садржаја органских киселина у екстрактима испитиваних плодова	90
4.6.3. HPLC анализа садржаја витамина у екстрактима испитиваних плодова	95
4.7. <i>In vitro</i> испитивање антиоксидативне активности екстраката плодова.....	100
4.7. Анализа главних компоненти и корелациона анализа садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката испитиваних плодова	107

4.8. <i>In vitro</i> испитивање антитирозиназне активности екстраката плодова	110
4.9. <i>In vitro</i> испитивање примене екстраката плодова на ћелијским културама	112
4.10. Масно уље – значај и садржај у испитиваним биљним врстама	116
4.10.1. Екстракција масних уља из плодова и семена испитиваних биљних врста различитим техникама екстракције – Soxhlet екстракција и наткритична екстракција.....	116
4.10.2. Анализа садржаја масних уља применом техника гасне хроматографије (GC-FID и GC-MS)	121
4.11. Формулација и израда узорака липофилних кремава	127
4.12. Органолептичка процена израђених липофилних кремава	128
4.13. Процена физичко-хемијске стабилности израђених липофилних кремава у дужем временском интервалу (испитивање „ <i>in use</i> “ стабилности).....	129
4.14. Сензорна процена испитиваних узорака липофилних кремава	134
4.15. Методе за <i>in vivo</i> карактеризацију липофилних кремава – биофизичке методе.....	139
4.15.1. <i>In vivo</i> процена безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних кремава на кожи здравих хуманих добровољаца	139
4.15.2. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности липофилних кремава на кожи здравих хуманих добровољаца.....	144
5. ЗАКЉУЧАК.....	154
6. ЛИТЕРАТУРА.....	160
7. Биографија аутора.....	181

1. УВОД

1.1. Концепт дизајна квалитета и његова примена у развоју фармацеутског производа

Концепт дизајна квалитета (енг. *Quality by Design – QbD*) је нови, систематичан, холистички, проактиван научни приступ у развоју фармацеутских производа који почиње дефинисањем циљаног профила квалитета производа, као и критичних атрибута квалитета производа (формулације), активне (лековите) супстанце и ексципијенаса. У развоју нових фармацеутских формулација примена овог концепта омогућава побољшану оптимизацију процеса развоја дефинисањем параметара који потенцијално могу утицати на квалитет производа. Концепт дизајна квалитета омогућава постизање жељеног квалитета формулисаног производа (Ваконуи и сар., 2018; Kovács и сар., 2017). QbD концепт је дефинисан у смерницама Интернационалне конференције за хармонизацију (енг. *International Conference on Harmonisation – ICH*), ICH Q8 – Фармацеутски развој, ICH Q9 – Управљање ризицима квалитета и ICH Q10 – Фармацеутски систем квалитета, као систематичан приступ фармацеутском развоју који почиње унапред дефинисаним циљевима и омогућава боље разумевање производног процеса и квалитета који се уграђује у финални производ (ICH, 2005; ICH, 2008; ICH, 2009). Процес развоја треба да буде заснован на научним принципима и обезбеди основу за управљање ризиком за квалитет и за побољшање квалитета фармацеутског производа. Уопштено, QbD концепт се односи на дизајнирање и развој формулације и процеса производње у циљу постизања унапред дефинисаног квалитета финалног фармацеутског производа (Amasya и сар., 2019).

На основу постављених ICH смерница у оквиру принципа QbD концепта, фармацеутски развој би требало да укључује следеће елементе:

1. Утврђивање циљаног профила квалитета фармацеутског производа (енг. *Quality Target Product Profile – QTTP*), који се односи на квалитет, безбедност и ефикасност производа;

2. Идентификовање потенцијалних критичних атрибута квалитета (енг. *Critical Quality Attributes* – CQAs) производа, са циљем да се ове карактеристике производа које утичу на његов квалитет могу разматрати и контролисати;
3. Одређивање критичних атрибута квалитета активне (лековите) супстанце и ексципијенаса и одабир врсте и количине помоћних супстанци потребних за формулацију фармацеутског производа жељеног квалитета;
4. Одабир одговарајућег производног процеса;
5. Утврђивање контролне стратегије.

Проширен и унапређен QbD концепт у развоју производа може додатно да укључује систематичну процену, разумевање и побољшање формулације и производног процеса, укључујући идентификовање критичних атрибута материјала (енг. *Critical Material Attributes* – CMAs) и критичних процесних параметара (енг. *Critical Process Parameters* – CPPs) који могу да имају ефекте на квалитет производа и утврђивање функционалних веза које повезују атрибуте материјала и процесне параметре са критичним атрибутима квалитета (CQAs) производа. Коришћење побољшаног разумевања карактеристика производа и производног процеса омогућава дефинисање и утврђивање одговарајуће контролне стратегије која доводи до развоја фармацеутског производа жељеног квалитета.

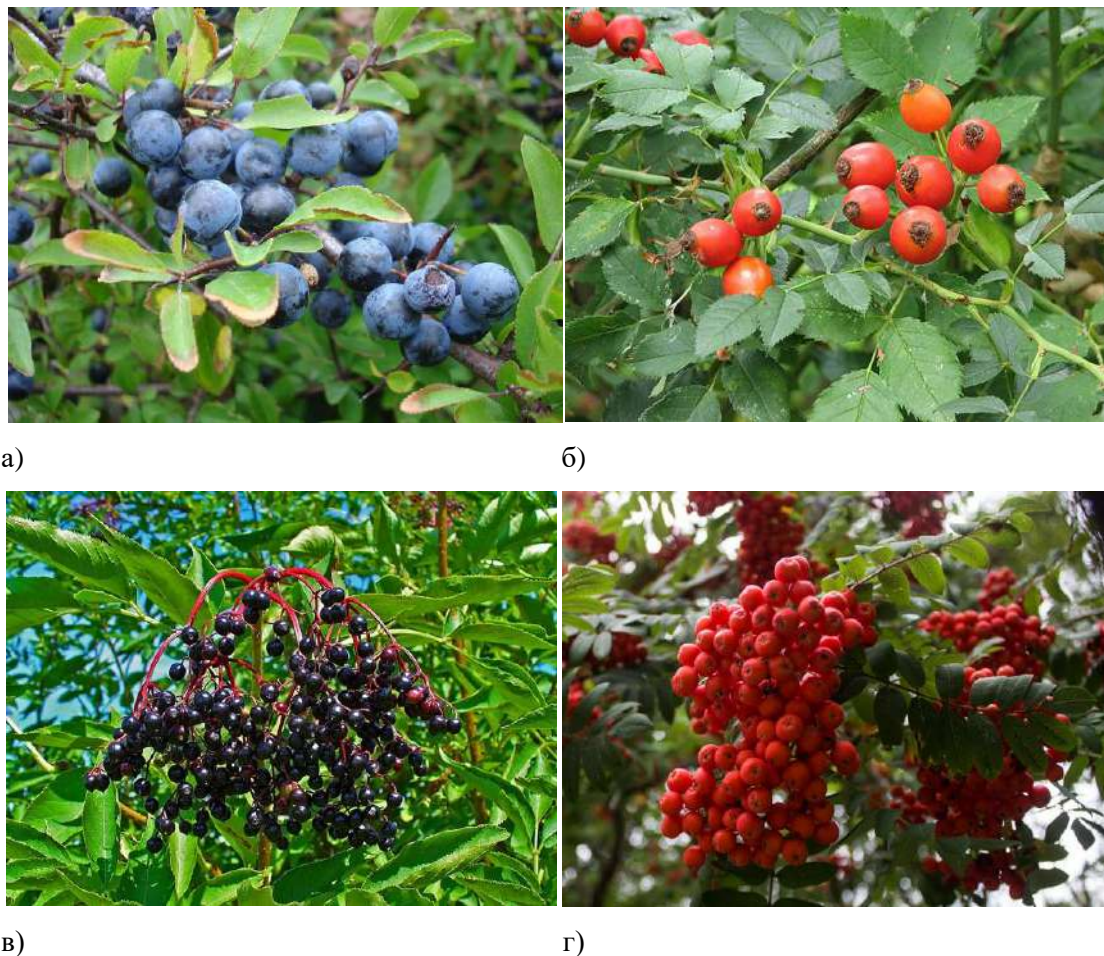
Циљани профил квалитета производа (QTTP) се односи на квалитет, безбедност и ефикасност фармацеутског производа. Чини основу концепта за развој производа жељеног квалитета и укључује следеће карактеристике: фармацеутски облик, јачину, начин примене, стабилност, терапијско ослобађање, систем затварања контејнера и др.

Према ИСН смерницама, критични атрибути квалитета (CQAs) подразумевају физичка, хемијска, биолошка или микробиолошка својства, односно карактеристике производа, које треба да буду у одређеним границама да би се добио производ унапред дефинисаног квалитета. Повезани су са активним супстанцама, помоћним супстанцама (ексципијенсима), међупроизводима и финалним производом. Потенцијални критични атрибути квалитета фармацеутског производа добијају се на основу циљаног профила квалитета производа (QTTP) и/или претходног знања и примењују се у управљању развојем фармацеутског производа и процеса. Списак потенцијалних CQAs је могуће модификовати након одабира формулације и производног процеса, упоредо са увећањем знања о карактеристикама производа и разумевању процеса.

1.2. Дивљи плодови као потенцијални извор сировина за фармацеутску индустрију

Биљке имају дугу историју примене у традиционалној медицини многих народа због своје доступности и велике разноликости фитохемикалија. Плодови различитих биљних врста се користе у исхрани људи, у свежем или смрзнутом стању, осушени или у облику разних прерађевина (сокови, алкохолна пића, џемови), испољавајући повољне ефекте на људско здравље захваљујући многобројним биоактивним једињењима која улазе у њихов састав (полифеноли, витамини, минерали, биљна влакна, полинезасићене масне киселине и др.). Због тога се последњих година, поред осталих препарата на бази лековитих биљака, и екстракти различитих плодова користе као састојци функционалне хране и у дијететским суплементима. Сматра се да унос уља из семена плодова у раној фази живота може смањити ризик од настанка атопијских болести (Nile и Park, 2014; Yang и Kortessniemi, 2015). Биоактивна једињења, као што су фенолна једињења, испољавају антиоксидативну активност и штите ћелије од оксидативних оштећења изазваних слободним радикалима. Витамин Це присутан у многим плодовима је значајан јер учествује у развоју везивног ткива и штити имуни систем од напада разних патогених микроорганизама. Такође, претпоставља се да биоактивна једињења из плодова спречавају улазак микроорганизама у ћелије јетре, бубрега или уринарног тракта, тако што спречавају њихову адхеренцију на ћелијске зидове (Nile и Park, 2014).

Дивљи плодови различитих биљних врста, као што су трњина (*Prunus spinosa* L., Rosaceae), дивља ружа (*Rosa canina* L., Rosaceae), зова (*Sambucus nigra* L., Adoxaceae) и јаребика (*Sorbus aucuparia* L., Rosaceae), били су предмет проучавања ове докторске дисертације. Испитиване биљне врсте се у нашој земљи већ дуги низ година користе у исхрани и традиционалној медицини за лечење различитих поремећаја и болести. Географске варијације и услови животне средине значајно утичу на садржај биоактивних компоненти у биљкама, па самим тим и на њихову фармаколошку активност. Наиме, наша земља има јединствену биолошку разноликост дивљих плодова који имају одличан квалитет и високу нутритивну вредност (Bošnjaković и сар., 2012).



Слика 1. Дивљи плодови испитиваних биљних врста: а) трњина (*Prunus spinosa* L., Rosaceae), б) дивља ружа (*Rosa canina* L., Rosaceae), в) зова (*Sambucus nigra* L., Adoxaceae), г) јаребика (*Sorbus aucuparia* L., Rosaceae)

Трњина (*Prunus spinosa* L., Rosaceae) је биљна врста која је распрострањена у различитим регионима наше земље. Плодови (Слика 1а) имају опор укус и богат су извор шећера, органских киселина, токоферола, масних киселина, антиоксиданаса из групе полифенолних једињења (нарочито антоцијанима). Плод се користи у народној медицини због адстрингентног деловања, затим као лаксанс и диуретик (Barros и сар., 2010; Fraternalе и сар., 2009; Kumarasamy и сар., 2004; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016а; Morales и сар., 2013; Stanković и сар., 2019а). Производи од плодова трњине показују антибактеријски и антиинфламаторни ефекат, због чега се користе у лечењу гастроинтестиналних поремећаја. Од плодова трњине се праве сокови, сирупи, џемови, чајеви и разне врсте вина (Pinacho и сар., 2015; Sikora и сар., 2013). Водени екстракти плодова испољавају антибактеријско деловање (Gegiu и сар., 2015). *In vivo* студије са

екстрактом трњине инкорпорираним у различите полуврсте формулације за примену на кожи показале су хидратациони ефекат након апликације (Arsić и сар., 2005).

Rosa canina L., Rosaceae (у народу позната као дивља ружа), пре свега њен плод (тачније псеудо-плод или лажни плод, Слика 1б), познат под називом шипурак, се користи у традиционалној медицини широм Европе, као лаксатив, диуретик, у лечењу артритиса, реуме, грознице и прехладе. Плодови се користе у лечењу симптома болести уринарног тракта, бубрежних обољења и гастроинтестиналних поремећаја (Barros и сар., 2010). Биоактивни састојци екстраката ових плодова су фенолне киселине, флавоноиди, минерали. Познато је да шипурак садржи танине, проантоцијанидине, масне киселине, фосфолипиде, галактолипиде и витамине, нарочито висок ниво витамина Це, па се користи у лечењу дефицијенције овог витамина (Lattanzio и сар., 2011; Stanković и сар., 2019б). У исхрани људи у нашој земљи се од шипурка прави чај, џем, мармелада, разне врсте ликера. *In vitro* и *in vivo* студије са екстрактима шипурка дале су могућност његове употребе на кожи, у препаратима против старења коже и за избељивање коже (Mármol и сар., 2017; Stanković и сар., 2019б).

Зова или базга (*Sambucus nigra* L., Adoxaceae) расте широм наше земље и веома је популарна у народу. Биљка се користи због позитивног деловања на симптоме респираторних, кардиоваскуларних, неуродегенеративних и инфламаторних болести, дијабетеса и гојазности. Плод ове биљне врсте (Слика 1в) је богат извор протеина, липида, фенолних киселина, органских киселина и витамина (нарочито витамина Б-комплекса, витамина А и Це). Плод се користи као средство за бојење у индустрији хране. У традиционалној медицини се користи као диуретик, дијафоретик и лаксатив, у лечењу грипа и прехладе. Од плодова зове се праве сокови и сирупи. Научне студије су показале да зова поседује антивирусни, антиалергијски и антибактеријски потенцијал, као и заштитно деловање од штетног ултраљубичастог (енг. *ultraviolet* – UV) зрачења. Екстракти плодова зове испољавају антиоксидативно дејство (Mikulic-Petkovsek и сар., 2016б; Fazio и сар., 2013; Sidor и Gramza-Michałowska, 2015; Veberic и сар., 2009).

Sorbus aucuparia L., Rosaceae (јаребика) је нешто мање позната у нашем народу у поређењу са претходно описаним биљним врстама. Расте у многим земљама широм Европе. Плод јаребике (Слика 1г) представља важан извор фенолних једињења (нарочито флавоноида и фенолних киселина). Поседује антиоксидативно, антиинфламаторно, диуретичко, вазорелаксантно и вазопротективно деловање, па се користи у лечењу симптома дијабетеса, интестиналних поремећаја, хроничне дијареје,

срчаних обољења, као и болести јетре и жучне кесе. Плодови имају благо опор укус, могу се користити у индустрији хране, за прављење џемова, мармелада, сокова и алкохолних пића (Aladedunye и Matthäus, 2014; Hukkanen и сар., 2006; Mikulic-Petkovsek и сар., 2017; Olszewska и Michel, 2009; Stanković и сар., 20196).

1.3. Биоактивна једињења присутна у биљним екстрактима

Широк спектар биоактивних једињења нађених у плодовима и производима насталим из плодова одражава се на њихова биолошка и медицинска својства (Szajdek и Bogowska, 2008). Полифеноли су велика група секундарних метаболита биљака, широко распрострањена, од простијих молекула, као што су фенолне киселине, па све до оних комплексних са бројним фенолним групама (нпр. ациловани гликозиди флавоноида, проантоцијанидини или олигомерни хидролизујући танини). Полифенолна једињења се првенствено јављају у коњугованом облику везани за шећерне групе, али могу бити у комплексу и са другим једињењима, као што су карбоксилне и органске киселине, амини, липиди или чак други полифеноли (Guimarães и сар., 2013). Полифенолна једињења се могу користити у лечењу различитих кожных стања и болести, где се терапеутски ефекти приписују деловању појединачних или комбинацији фенолних једињења присутних у биљном екстракту. Као супстанце природног порекла које испољавају значајне фармаколошке активности, фенолна једињења поседују обећавајуће особине за развој нових фармацеутских формулација за примену на кожи које би могле да замене одређене лекове са ограниченом применом (Działo и сар., 2016). Полифеноли учествују у одбрани од UV зрачења и напада патогена, дају боју биљкама, а делимично су одговорни за органолептичка својства биљних врста. Нпр. биљни феноли дају горчину и адстрингенцију плодовима и соковима због интеракције између фенола (углавном процијанидина) и гликопротеина пљувачке. Антоцијани, који спадају у групу полифенолних састојака познатих као флавоноиди, одговорни су за наранџасту, црвену, плаву и љубичасту боју многих плодова (Dai и Mumper, 2010; Einbond и сар., 2004).

Флавоноиди представљају највећу и најраспрострањенију групу полифенолних једињења и укључују велики број класа једињења (флаване, флавоноле, флаваноне, флаваноле, антоцијане, изофлаване). Најчешћи представници флавоноида присутни у

биљкама су кверцетин (флавонол), катехин (флаванол), нарингенин (флаванон), цијанидин-глукозид (антоцијанин), генистеин (изофлаван) и др. (Dai и Mumper, 2010).

Фенолне киселине се могу поделити на две групе: деривате бензојеве киселине (гална, ванилинска, сиригинска и протокатехинска киселина) и деривате циметне киселине (кумаринска, кафена, ферулна и синапинска киселина). Обично су присутне у облику естара, глукозида или амида, а ретко у слободној форми. Кафена киселина је најраспрострањенија фенолна киселина у многим плодовима (у већини случајева у естерификованом облику). Још једна фенолна киселина која се доста среће у биљкама је ферулна киселина (Dai и Mumper, 2010; Khoddami и сар., 2013).

Антоцијани су обојени пигменти и широко су распрострањени у плодовима разних биљака, дајући му карактеристичну боју. Антоцијани се у биљкама налазе у форми глукозида где је молекул антоцијанидина везан за неки шећер. Делови пигмента који постоје у слободној форми, без шећера (као агликони), познати су под именом антоцијанидини. Цијанидин је најчешћи антоцијанидин присутан у биљкама, док антоцијан цијанидин-3-глукозид испољава највећу антиоксидативну активност. Они су нетоксични, растворљиви у води и имају велики значај у медицини. Делују као снажни антиоксиданси, смањују ризик од појаве хроничних болести и прераног старења ћелија узрокованог слободним радикалима (Einbond и сар., 2004; Garcia-Alonso и сар., 2005; Guimarães и сар., 2013; Nile и Park, 2014; Tsuda, 2012).

Танини су још једна велика група полифенолних једињења. Важни су састојци плодова и имају утицаја на сензорне карактеристике плодова. Одговорни су за њихов опор укус и промене у боји плодова и њихових деривата (сокова, екстраката). Опор укус је резултат интеракције између танина, протеина слузокоже и густаторних рецептора. Постоје две врсте танина: кондензовани танини (они који не хидролизују или проантоцијанидини, олигомери или полимери флаван-3-ола) и хидролизујући танини (естри галне – галотанини и елагинске киселине – елагитанини). У плодовима су заступљенији проантоцијанидини, док се хидролизујући танини налазе у мањој количини (Nile и Park, 2014; Dai и Mumper, 2010).

Плодови садрже велике количине и других биолошки активних супстанци, као што су органске киселине и витамини, што их такође чини незаменљивим сировинама за фармацеутску индустрију. Ове групе једињења имају важну улогу у очувању квалитета плодова и њихове медицинске вредности. Витамини (токоферол, аскорбинска киселина) и органске киселине су познати природни антиоксиданси.

Органске киселине учествују у бројним процесима метаболизма биљака. Главни представници органских киселина су млечна, јабучна, винска, лимунска, бадемова, пирогрождана и др. Неке од њих учествују у Кребсовом циклусу или су прекурсори у синтези липида. Јабучна киселина учествује у респирацији и фотосинтези. Оксална и лимунска киселина, тј. њихове соли, имају хелатна својства и везују метале и на тај начин могу да учествују у детоксификацији. Органске киселине су такође одговорне за укус, микробиолошку стабилност и конзистенцију природних производа. Многе органске киселине су присутне у плодовима разних биљака, па се зато називају и воћним киселинама (Green и сар., 2009; Özcan, 2008; Yu i Van Scott, 2004).

Плодови су богати витаминима, нарочито витаминима Бе комплекса, витаминима Це, Е и провитамином А (Nile и Park, 2014). Витамин Це (аскорбинска киселина) је један од хидросолубилних витамина, доста присутан у плодовима. Већина биљака синтетише аскорбинску киселину из D-глукозе или D-галактозе. Главне форме витамина Це су L-аскорбинска киселина и дехидроаскорбинска киселина. Познато је да L-аскорбинска киселина инхибира процес оксидације и ефикасан је антиоксиданс, неутралише слободне радикале и учествује у процесу детоксификације, штитећи биљку од разних загађивача из ваздуха (Szajdek и Borowska, 2008). Недостатак витамина Це може довести до скорбута повезаног са кожним симптомима – хиперкератозе фоликула длаке и крварењем коже и десни. Витамин А је повезан са епидермалном функцијом и превенцијом настанка хиперкератоза. Поремећаји на кожи су такође повезани са недостатком витамина Бе комплекса. Уобичајени примери укључују настанак улцерација коже код дефицита витамина Бе2, пелагре (дефицит витамина Бе3), витилига и алопеције (дефицит витамина Бе12), алопеције и екцема (дефицит биотина или витамина Ха) (Tobin, 2006).

1.4. Методе добијања екстраката из биљног материјала

Екстракција биоактивних једињења из биљног материјала је први важан корак у потенцијалној примени екстраката у фармацеутској индустрији. Садржај биоактивних једињења у биљним екстрактима умногоме зависи од избора одговарајуће методе екстракције. Екстракција органским растварачима је најчешће примењивана процедура за добијање екстраката, услед лаког извођења, високе ефикасности и велике применљивости. Најважнији фактори који утичу на ефикасност процеса екстракције

су: растварач (различита поларност растварача), температура, однос биљног материјала и растварача и време екстракције. Избор растварача за екстракцију зависи од физичко-хемијских особина компоненти које је потребно изоловати из комплексног биљног узорка. Растворљивост фенолних једињења је одређена хемијском природом узорака и поларношћу примењеног растварача за екстракцију. Стога не постоји универзална метода екстракције погодна за екстракцију свих класа полифенолних једињења, већ се у зависности од избора растварача екстрахује смеша полифенолних једињења растворљива у њему. Најчешће се као растварачи за екстракцију полифенола из биљног материјала користе метанол, етанол и други органски растварачи, као и њихове смеше са водом у различитим односима (Azmir и сар., 2013; Dai и Mumper, 2010). Пропиленгликол, сам или у комбинацији са водом, се ређе среће у литератури као растварач за екстракцију.

Конвенционалне методе екстракције (као што су мацерација, хидродестилација, перколација, дигестија и др.) се и даље широко користе, мада услед бројних недостатака у новије време бивају замењене новим методама, а једна од њих је ултразвучна екстракција. Нове методе скраћују време екстракције и дају веће екстракционе приносе уз мању потрошњу енергије (Azmir и сар., 2013; Belwal и сар., 2018; Dai и Mumper, 2010).

Ултразвучна екстракција је корисна технологија која не захтева сложену апаратуру и може се користити и на малим и на великим узорцима у фармацеутској индустрији. Предности ултразвучне екстракције су смањење времена екстракције, енергије и употребе растварача. Енергија ултразвука за екстракцију омогућава ефикасније мешање, бржи пренос енергије, смањује термичке градијенте и температуру екстракције и омогућава селективну екстракцију и лакшу контролу самог процеса екстракције. Ефекти ове екстракције доводе до раскидања биолошких мембрана, лакшег ослобађања екстрактивних материја и побољшано продирање растварача у ћелију, што резултира већим приносом екстракције. Ултразвучна екстракција се доста користи у екстракцији полифенолних једињења из различитих делова биљака (из листова, стабљика, плодова, итд.) (Azmir и сар., 2013; Dai и Mumper, 2010).

1.5. Главни састојци масних уља

Из плодова се могу изоловати биљна уља која су важан извор триглицерида, липосолубилних витамина, сквалена, воскова, фитостерола, фосфолипида и есенцијалних масних киселина. Липиди се у плодовима могу наћи у цитоплазми или везани за ћелијску мембрану. Значајне количине липида се налазе у семену биљака. Састојци уља испољавају разне билошке активности. Обезбеђују енергију ћелијама, штите ткива, учествују у регулацији синтезе протеина, метаболичким процесима у ћелијама и спречавању појаве многих болести. Липиди штите плодове од штетних утицаја спољашње средине и разних патогена (Klavins и сар., 2016; Lin и сар., 2018; Mahoney и Molyneux, 2010; Yang и сар., 2018). Природна биљна уља (рицинусово, маслиново, уље јојобе и др.) су важни састојци препарата за терапију многих стања коже, као што су сува кожа, атопијски дерматитис, псоријаза, контактни дерматитис, екцеми, опекотине, итд. Липидни састав ових уља је сличан саставу хуманог себума. Масне киселине и триглицериди доводе до хидратације коже и смањују трансепидермални губитак воде (Aburjai и Natsheh, 2003).

Масне киселине су једне од главних биолошких градивних компоненти, поред протеина и угљених хидрата. У односу на њихову хемијску структуру могу се поделити у неколико група, са различитим функцијама, укључујући засићене масне киселине (енг. *Saturated Fatty Acids* – SFAs), мононезасићене масне киселине (енг. *Monounsaturated Fatty Acids* – MUFAs) и полинезасићене масне киселине (енг. *Polyunsaturated Fatty Acids* – PUFAs). PUFAs садрже две или више двоструких веза у молекулу. Масна уља одређених биљака садрже есенцијалне масне киселине (енг. *Essential Fatty Acids* – EFAs) које не могу да се синтетишу у људском телу. Масне киселине код којих је прва двострука веза на шестом атому угљеника рачунајући од метиленског краја угљоводоничног ланца зову се омега-6 (n-6), док су оне код којих је прва двострука веза на трећем атому угљеника омега-3 (n-3) масне киселине, односно на деветом атому угљеника омега-9 (n-9) масне киселине. Омега-6 и омега-3 масне киселине се добијају из линолне и α -линолеинске киселине, које су главне есенцијалне масне киселине. Доказано је да ове масне киселине испољавају антиатерогена и анти тромботичка деловања, да утичу на концентрацију липопротеина, флуидност ћелијске мембране, функцију ензима мембране и модулацију других једињења (Lodén, 2005; Yang и сар., 2018). Неодговарајући унос масних киселина (висок однос омега-

6/омега-3 масних киселина у исхрани) и поремећај метаболизма PUFAs доводе до дисбаланса у нивоима еикозаноида у ткивима, што је повезано са развојем атопијских болести (Yang и Kortensniemi, 2015).

Фитостероли су биљни стероли са сличном структуром и физиолошким функцијама као холестерол. До данас је у литератури описано више од 100 различитих фитостерола. Међу њима, најзначајнији су β -ситостерол, кампестерол и стигмастерол. Последњих година, фитостероли су привукли пажњу због њиховог утицаја на смањење холестерола у крви и доприноса у превенцији кардиоваскуларних болести. Претходне студије су показале да фитостероли могу смањити кардиоваскуларни морбидитет смањењем апсорпције холестерола кроз различите механизме. Такође, имају важну улогу у патогенези деменције, испољавају антиинфламаторни, имуномодулаторни и антикарциногени ефекат (Yang и сар., 2018).

Тритерпени су обично присутни у многим биљним врстама, у мањим фракцијама, као саставни делови масних уља. Учествују у многим биолошким реакцијама, тако што индукују ћелијску миграцију, пролиферацију и одлагање колагена. Тритерпени побољшавају репарацију ткива скраћујући време потребно за зарастање рана и утичу на продукцију слободних радикала у микроокружењу ране (Lin и сар., 2018).

1.6. Методе екстракције масног уља из биљног материјала

Масна уља се могу изоловати из биљног материјала конвенционалним методама екстракције, као што је Soxhlet екстракција са органским растварачима. Користи се за екстракцију биоактивних једињења из различитих природних извора, али и као модел за поређење нових екстракцијских техника (Azmir и сар., 2013). Употребљава се за изоловање масног уља из чврстог биљног материјала, применом неполарних органских растварача. Изводи се на повишеној температури, коришћењем специјалне апаратуре и може да траје од неколико сати до неколико дана. Поред многих позитивних страна, ова метода екстракције има и недостатке, као што су: 1) употреба великих запремина штетних органских растварача, који су загађивачи животне средине и штетни по здравље људи, затим 2) дуго време екстракције и 3) интерференција и деградација циљаних компоненти под дејством унутрашњих и спољашњих фактора, као што су светлост, ваздух, високе температуре и ензимске реакције (Khoddami и сар., 2013).

Да би се превазишла поменута ограничења, конвенционалне методе екстракције у новије време бивају замењене новим, тзв. неконвенционалним методама, као што је наткритична екстракција (НКЕ) са угљеник(IV)-оксидом (Azmiг и сар., 2013; Marzouki и сар., 2008). НКЕ је еколошки прихватљива техника екстракције, која може бити одлична алтернатива конвенционалним методама екстракције органским растварачима. То је технолошки напреднији екстракциони систем и налази широку примену у многим гранама индустрије, па и у фармацеутској индустрији. Овом екстракцијом смањује се употреба токсичних органских растварача, повећава се безбедност и селективност, скраћује се време екстракције и олакшава одвајање добијеног екстракта од наткритичних флуида. Деградација екстрахованих једињења је сведена на минимум због одсуства ваздуха и светлости, а могућност контаминације екстракта са нечистоћама из растварача је знатно мања него применом других метода. Међутим, улагање у скупу и сложenu опрему је главни недостатак НКЕ (Belwal и сар., 2018; da Silva и сар., 2016; Khoddami и сар., 2013).

Наткритични флуид је врста растварача који настаје када се температура и притисак флуида повећају изнад критичне тачке. Критична тачка се дефинише као карактеристична температура и притисак изнад којих не постоји граница између гасовите и течне фазе. Наткритични флуид поседује особине сличне гасовима, као што су дифузија, вискозност и површински напон, али поседује и густину и моћ растварања налик течностима. Ове особине га чине погодним за екстракцију једињења у кратком временском интервалу са великим приносима екстракције. Уобичајени наткритични флуиди који се примењују у НКЕ су метан, угљеник(IV)-оксид (CO_2), етан, пропан, амонијак, етанол, бензен и вода. CO_2 је најчешће коришћени наткритични флуид и сматра се идеалним растварачем за НКЕ. Хемијски је стабилан, има релативно ниску токсичност, није запаљив, јефтин је и површински напон наткритичног флуида CO_2 тежи нули. Има релативно ниску критичну температуру ($31,2\text{ }^\circ\text{C}$), блиску собној температури и низак критични притисак ($73,87\text{ bar}$), па је погодан за екстракцију термолабилних једињења. Пошто CO_2 поседује ниску поларност, погодан је за екстракцију неполарних компонената биљака, као што су масна уља. Након екстракције се лако одваја од екстракта, па се добијају чисти екстракти без трагова растварача, тј. добијају се масна уља високог квалитета (Azmiг и сар., 2013; Khoddami и сар., 2013). Важна предност НКЕ у добијању уља је очување његовог јединственог састава, док се поједини испарљиви састојци често губе применом конвенционалних екстракционих метода. Добијена уља садрже висок ниво биоактивних компоненти, као

што су полинезасићене масне киселине, токофероли, токотриеноли, фитостероли, каротеноиди и сквален. НКЕ се показала као најбоља метода за изоловање биоактивних липидних компоненти (Akanda и сар., 2012). Испитивани дивљи плодови могу бити потенцијални, обновљиви извор масних уља и природних састојака уља за примену у фармацеутској индустрији за терапију одређених стања коже.

1.7. Слободни радикали и оксидативни стрес

Реактивне кисеоничне врсте (енг. *Reactive Oxygen Species* – ROS) и реактивне азотне врсте (енг. *Reactive Nitrogen Species* – RNS) су продукти нормалног ћелијског метаболизма, које настају као резултат нормалних биохемијских реакција у људском организму, или пак настају као последица утицаја штетних егзогених фактора. Познато је да делују као секундарни гласници који контролишу различите физиолошке функције у организму, учествују у очувању „редокс хомеостазе“ и стога је њихово настајање регулисано хормонима, цитокинима и другим механизмима. Претерана продукција слободних радикала (ROS и RNS) са једне стране и мањак ензимских и не-ензимских антиоксиданаса са друге стране, као и акумулација слободних радикала, повећавају ризик од оштећења макромолекула у ћелијама механизмом оксидативног стреса (Temple, 2000; Valko и сар., 2007).

Слободни радикали су веома реактивни молекули или делови молекула који садрже један или више неспарених електрона у атомским или молекулским орбиталама и доводе до оксидативног стреса. Ови неспарени електрони су одговорни за високу реактивност слободних радикала. Радикали добијени из кисеоника представљају најзначајнију класу радикалских врста насталу у живом организму. Хидроксилни радикал ($\bullet\text{OH}$) је неутрална форма хидроксилног јона, поседује такву реактивност која га чини веома штетним радикалом, са доста кратким полуживотом *in vivo* (око 10^{-9} s), тако да обично реагује близу места где настаје. Азот-оксид радикал (NO) је мали молекул који садржи један неспарени електрон. Ствара се у биолошким ткивима под утицајем специфичног ензима азот-оксид синтетазе (енг. *Nitric Oxide Synthase* – NOS), реактиван је, заступљен у високој концентрацији и важан је оксидативни биолошки сигнални молекул који учествује у регулацији бројних физиолошких процеса, укључујући неуротрансмисију, регулацију крвног притиска, одбрамбене механизме,

релаксацију глатких мишића и регулацију функције имуног система (Valko и сар., 2007).

Оксидативни стрес настаје као резултат метаболичких реакција које користе кисеоник и дефинише се као дисбаланс између оксиданаса и антиоксиданаса, у корист оксиданаса и потенцијално води оштећењу липида, протеина, ензима, угљених хидрата и дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) у ћелијама и ткивима. Ови процеси даље доводе до оштећења ћелијске мембране, фрагментације или насумичног повезивања молекула, као што су ДНК, ензими и структурни протеини, а може довести и до ћелијске смрти индуковане фрагментацијом ДНК и липидном пероксидацијом (Ratnam и сар., 2006; Valko и сар., 2007). Оксидативни стрес је укључен у патогенезу многих болести, као и у процесу старења организма. Равнотежа између корисних и штетних ефеката слободних радикала је веома важан аспект живих организама и остварује се сложеним механизмима који се називају „редокс регулација“ (Valko и сар., 2007).

1.8. Штетни ефекти оксидативног стреса на кожу

Кожа је највећи орган у људском телу и функционише као неопходна баријера између унутрашњег и спољашњег окружења. Она континуирано штити тело од штетних фактора, нпр. микроорганизама, UV зрачења, алергена и разних иританаса. Њена јединствена улога и функција је директна последица њене структуре и састава, посебно њеног површинског дела, епидермиса. Главне ћелијске компоненте епидермиса укључују кератиноците, меланоците, Меркелове ћелије, Т-лимфоците, Лангерхансове ћелије и др. Кератиноцити у базалном слоју епидермиса чувају способност пролиферације навише да би формирали спинални слој (*stratum spinosum*) и грануларни слој (*stratum granulosum*). Изнад грануларног слоја, ка површини, кератиноцити се коначно диференцирају у корнеоците и граде рожнати слој. У површинском делу епидермиса, корнеоцити (компактни кератиноцити без језгра), заједно са интерцелуларним липидним матриксом, доприносе структури и функцији *stratum corneum*-а (SC). Баријерна функција коже углавном зависи од интегритета SC-а (Lin и сар., 2018).

UV зрачење је моћан иницијатор стварања ROS у кожи. Тип створених радикала у кожи зависи од таласне дужине зрачења. UVB зрачење доводи до појаве иритације на кожи, тј. слободни радикали индукују еритем коже синтезом простангладина E2.

Оксидовани липиди и протеини доводе до промена стања коже. Нпр. примена оксидованог сквалена на кожу нарушава баријерну функцију коже након акутне примене, док након хроничне примене долази до појаве храпавости коже. Алкил алдехиди даље оксидују липидне хидропероксиде и протеине и стварају се карбониловани протеини у SC-у. Ниво ових протеина се повећава након излагања UV зрачењу и током зимске сезоне. Нађено је да кожа пацијената који имају атопијски дерматитис поседује веће концентрације карбонилованих протеина у поређењу са нормалном кожом. Може се претпоставити да нивои ових протеина одражавају степен оксидативног стреса у кожи индукован условима спољашње средине. Промене у дермалном матриксу под утицајем слободних радикала подразумева настанак бора услед смањења синтезе колагена и/или његове брзе разградње (Masaki, 2010). Фотостарење коже је резултат фото-оксидативног оштећења коже, услед високих нивоа ROS индукованих UV зрачењем. ROS доводе до деградације колагена и његове акумулације у дермису. Клинички знаци фотостарења су диспигментације (најчешће лентиго и пеге на кожи), соларне еластозе, актиничне кератозе, а код дуже изложености коже оксидативном стресу може доћи до настанка меланома (Lin и сар., 2018).

1.9. Антиоксиданси и њихова улога у заштити од оксидативног стреса

Изложеност слободним радикалима из различитих извора доводи до развоја низа одбрамбених механизма у организму (Valko и сар., 2007). Пошто је превенција оксидативног стреса веома важна, антиоксиданси изоловани из природних извора добијају све више на значају у очувању ћелијске хомеостазе, са циљем да замене синтетске антиоксидансе који су повезани са бројним нежељеним ефектима. Антиоксиданси су супстанце које интерагују са слободним радикалима и спречавају настанак оштећења узрокованих њима. Заправо, антиоксиданси смањују оштећења узрокована оксидансима тако што их неутралишу пре него што они реагују са биолошким молекулима, спречавајући активацију кисеоника у ROS (Ratnam и сар., 2006). Антиоксиданси се могу поделити у две велике групе: ензимске и не-ензимске антиоксидансе. Неки од ових антиоксиданаса се стварају ендогено у нашем организму (ензими, молекули са ниском молекулском масом и кофактори ензима). Већина не-ензимских антиоксиданаса се уноси у организам путем хране. Ту спадају полифенолна

једињења, витамини, каротеноиди, органосумпорна једињења и минерали. У нормалним условима постоји равнотежа између активности и интрацелуларних нивоа ових антиоксиданаса. Ова равнотежа је неопходна за опстанак организама и очување здравља (Ratnam и сар., 2006; Valko и сар., 2007).

Примена плодова богатих антиоксидансима и другим супстанцама је важна у превенцији и контроли многих болести и стања због позитивног утицаја на здравље људи (Nile и Park, 2014; Szajdek и Borowska, 2008). Последњих година, многе биљне врсте представљају алтернативне изворе за екстракцију природних антиоксиданаса на бази полифенолних једињења (појединачних једињења или смеша присутних у биљним екстрактима), који имају већу прихватљивост у односу на синтетске (Maisuthisakul и Gordon, 2009).

Испитивани плодови и њихови екстракти представљају потенцијални извор антиоксидантних једињења, као што су фенолне киселине, флавоноиди, танини, проантоцијанидини, антоцијани, органске киселине, витамини и др. Антиоксиданси спречавају процес липидне оксидације, стварање слободних радикала и штите ћелије од оксидативног стреса (Nile и Park, 2014; Mármol и сар., 2017). Антиоксидативна активност једињења присутних у плодовима заснива се на различитим механизмима, у зависности од њихове структуре. Сматра се да фенолна једињења штите једињења која су лако подложна оксидацији, па тако спречавају оксидацију витамина Це, каротеноида и незасићених масних киселина. Флавоноиди спречавају липидну оксидацију, везују јоне метала и неутралишу активне форме кисеоника. Антоцијани (као подгрупа флавоноида) инхибирају оксидацију липопротеина мале густине LDL (енг. *Low-Density Lipoprotein*) и липозома, а исто тако неутралишу слободне радикале. Поред тога, показано је да штите аскорбинску киселину од процеса оксидације. У групи фенолних киселина, деривати циметне киселине, као што су кафена, хлорогенска, ферулна, синапинска и *p*-кумарна киселина, су ефикаснији антиоксиданси у односу на деривате бензојеве киселине (*p*-хидроксибензоева и ванилинска киселина). Поред поменутих група једињења, танини се карактеришу као једињења са високом антиоксидативном активношћу. Деривати елагинске киселине и кондензовани танини поседују већу способност у „хватању“ (неутрализацији) слободних радикала у односу на аскорбинску киселину, токофероле и полифеноле мале молекулске масе. Резултати бројних студија указују на постојање корелације између укупног садржаја фенолних једињења и њихове антиоксидативне активности (Szajdek и Borowska, 2008).

Антиоксиданси у препаратима за примену на кожи имају заштитну улогу од штетног UV зрачења (фотостарења и фотокарциногенезе коже) и штетног деловања оксидативног стреса (Afaq и Mukhtar, 2006). Биолошки активна форма витамина Це, L-аскорбинска киселина, има улогу у људском телу као антиоксиданс и кофактор је у синтези колагена и еластина. Употребљава се и као агенс за избељивање коже због инхибиторног ефекта на ензим тирозиназу. Доприноси очувању кожне баријере тако што побољшава епидермалну диференцијацију. Фотопротективна својства и неутрализација слободних радикала индукованих UVB зрачењем повезана су са антиоксидативним својствима овог витамина (Chiu и Kimball, 2003; Masaki, 2010).

Органске киселине поседују бројна терапијска својства када се примењују на кожу. Већина њих су ефикасни антиоксиданси и могу се користити у профилакси оксидативних оштећења узрокованих слободним радикалима под дејством UV зрачења. Ефикасне су у третману бора и фотостарења коже, јер стимулишу биосинтезу хијалуронске киселине и колагених влакана. Органске киселине утичу на кератинизацију коже и повећавају синтезу дермалних компоненти. Због ових ефеката корисне су у локалном лечењу суве и грубе коже, акни, брадавица, екцема, псоријазе (Fluhr и сар., 2008; Yu и Van Scott, 2004).

Токоферол (витамин Е) учествује у превенцији многих стања узрокованих оксидативним стресом. α -Токоферол је липосолубилни антиоксиданс који има важну улогу у заштити ћелијских мембрана од липидне пероксидације индуковане слободним радикалима. Овај витамин је главни антиоксиданс у епидермису коже и спречава настанак едема, еритема и фотостарење коже као последица UVB и UVA зрачења. Посебно је значајна његова прерасподела у SC-у здраве коже, где је највећа концентрација овог витамина присутна у најдубљим слојевима, док се у површинским слојевима налази мања количина (Chiu и Kimball, 2003; Masaki, 2010).

Капацитет антиоксидативних одбрамбених механизма коже нагло опада током старења. Интрацелуларни липиди су веома осетљиви на пероксидацију узроковану стварањем ROS. У циљу обнове антиоксидативних механизма и заштите коже од оксидативног стреса, постоји стална потреба за применом природних антиоксиданаса из егзогенних извора (полифеноли, витамини, коензим Q10, мелатонин и др.), јер су ова једињења безбедна и биолошки активнија од синтетских антиоксиданаса. Студије су показале да полифеноли (углавном антоцијани) из плодова различитих биљака редукују ниво оштећења ДНК услед UV зрачења (Działo и сар., 2016).

1.10. Улога оксидативног стреса у поремећајима пигментације коже

Меланин се односи на широк спектар природних пигмената који се производе у меланозомима, органелама смештеним у специјализованим ћелијама коже званим меланоцити. Основна функција меланина је у пигментацији коже. Након синтезе у меланоцитима, меланин се преноси у затворене кератиноците. Иначе, пигмент меланин потиче од аминокиселине тирозин и формира се кроз неколико оксидативних реакција уз учешће ензима тирозиназе. Меланин има значајну улогу у заштити од UV зрачења и фотопротекцији коже, јер је способан да апсорбује 50% до 75% UV зрачења. Међутим, прекомерна производња меланина изазвана претежно UV зрачењем (ROS и другим слободним радикалима), као и неким лековима, хемикалијама и одређеним болестима, може довести до хиперпигментације коже и кожних поремећаја. Поред тога, NO радикал из кератиноцита делује тако да индукује меланогенезу повећањем количине тирозиназе. Хиперпигментација је такође и естетски проблем, који се неизбежно јавља са годинама. Дакле, постоји стална потрага за новим средствима за депигментацију или посветљивање коже (Działo и сар., 2016; Masaki, 2010).

Постоје подаци у литератури да је антиоксидативна активност једињења повезана са ефектима избељивања. Наиме, тирозиназа је мултифункционални ензим, који у свом саставу садржи бакар, као активно место овог ензима. Сходно томе, једињења која поседују способност хелирања бакра, могу довести до инхибиције ензима тирозиназе, катализатора у биосинтези меланина у кожи. Инхибитори тирозиназе се могу апликовати као фармацеутски препарати у третману дерматолошких поремећаја повезаних са епидермалном хиперпигментацијом, као што су мелазма, пеге и флече на лицу, али и у козметичке сврхе за избељивање коже (Fu и сар., 2014; Maisuthisakul и Gordon, 2009). Поједина фенолна једињења, као што су елагинска киселина, танинска киселина и кверцетин, понашају се као инхибитори тирозиназе, а самим тим и синтезе меланина, што је показано тестовима на културама ћелија коже. Претпоставља се да инхибитори меланина делују углавном тако што инхибирају ензим тирозиназу. Феноли и флавоноиди, захваљујући ароматичним пуринским хетероциклусима у њиховом саставу, имају сличне структуре као тирозин, који се оксидује помоћу тирозиназе и стога могу да делују као супстратни аналогни инхибитори у циљу инхибиције меланогенезе (Działo и сар., 2016; Maisuthisakul и Gordon, 2009). Пошто су екстракти плодова богати полифенолним једињењима, могу се потенцијално користити као извор

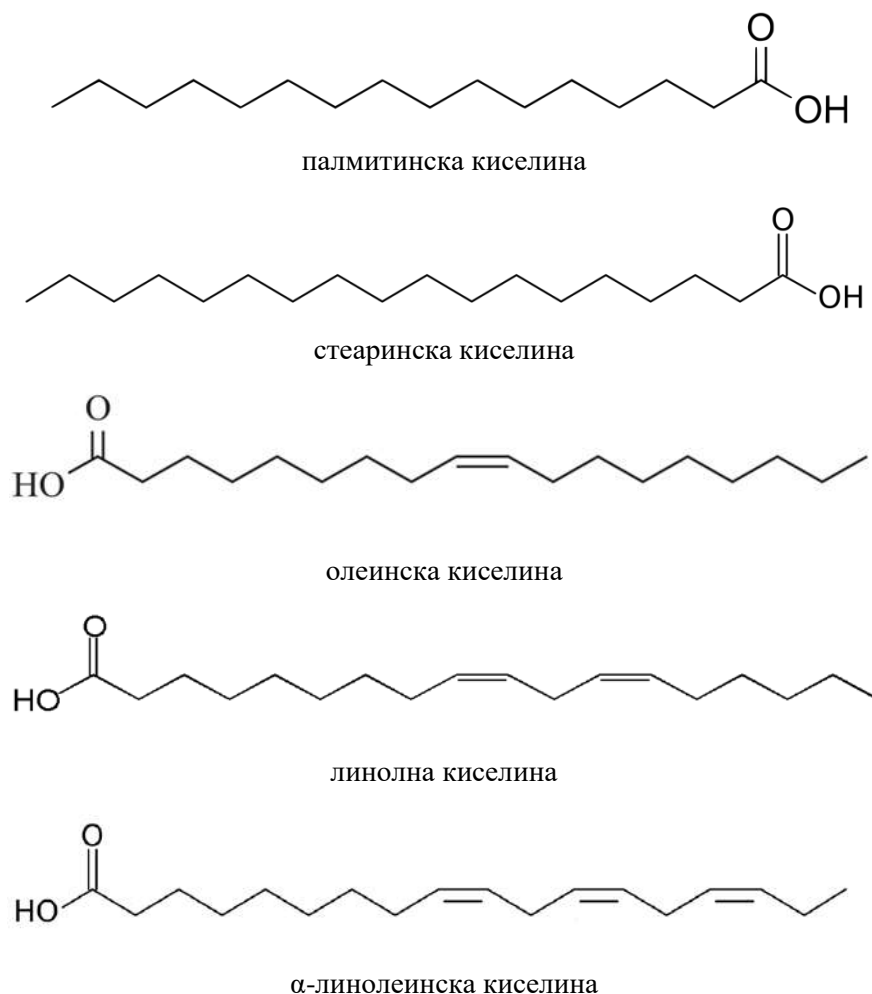
природних инхибитора тирозиназе. Последњих година, потрага за безбедним и ефикасним инхибиторима тирозиназе има све већи значај, јер су поједини агенси за избелјивање (хидрохинон, коцик киселина) повезани са многобројним нежељеним ефектима (Ebanks и сар., 2009).

1.11. Сува кожа – карактеристике суве коже и промене на кожи у склопу атопијског дерматитиса

Сува кожа (ксероза) је уобичајена врста дерматозе која се може јавити код свих типова коже и код људи свих узраста, на различитим деловима тела. Може да варира од физиолошки суве коже (пр. код старијих особа долази до промена у кожи услед старења) или до патолошки суве коже (пр. атопијски дерматитис). Сува кожа може бити узрокована егзогеним и ендогеним факторима. У егзогене факторе спадају климатски услови (изложеност хладноћи, ветру, UV зрачењу), остали услови животне средине, као и начин живота и личне навике (често прање коже, примена неких препарата итд.). У ендogene факторе се убрајају примена неких лекова, флукуације у нивоима хормона и разне хроничне болести. Да би била здрава, еластична и функционисала нормално, кожи је потребно од 10% до 15% воде. Промене у интегритету кожне баријере SC-а, као што су промене у кератинизацији SC-а, промене у количини интерцелуларних липида и хидролипидног слоја, поремећај трансепидермалног метаболизма воде и промене у рН вредностима коже, доводе до појаве суве коже. Сува кожа је грубог изгледа и смањене еластичности, због чега се јавља субјективни осећај затезања, а могу се јавити пруритис и екцем као последица свраба и пецкања коже. Појава црвенила, недостатак површинског сјаја, љуспање коже, па чак и пукотине на кожи могу се јавити као резултат суве коже. Пропустљивост SC-а и очување његовог интегритета као кожне баријере зависи од концентрације интерцелуларних липида и хидролипидног омотача на површини коже. Интерцелуларни липидни матрикс има главну улогу у процесу кератинизације и влажењу коже. То је смеша церамида (45–50%), холестерола (20–25%) и есенцијалних масних киселина (10–15%), са малом количином холестерол-сулфата и неполарних липида. Хидролипидни слој је сачињен од секрета знојних жлезда и себума, покрива епидермис и јача кожную баријеру спречавајући исушивање коже и одавање воде из

коже (Flynn и сар., 2001; Lin и сар., 2018; Lodén, 2003; Pons-Guiraud, 2007; Verdier-Sévrain и Bonté, 2007).

Ламеларне мембране SC-а се углавном састоје од засићених масних киселина са дугим ланцима (број атома угљеника варира од C16 до C26). Главне киселине присутне у ламеларним мембранама су палмитинска (C16:0), стеаринска (C18:0), бехенска (C22:0), лигноцеринска (C24:0) и хексакосаноична киселина (C26:0). Друге масне киселине су заступљене у мањој количини у SC-у, а ту спадају олеинска (C18:1, n-9; што означава да поседује C18 атома угљеника и једну двоструку везу и спада у групу омега-9 незасићених масних киселина), еикосапентеноинска (C20:5, n-3), арахидонска (C20:4, n-6), докосахексеноинска (C22:6, n-3), линолна (C18:2, n-6), α -линолеинска (C18:3, n-3), γ -линолеинска (C18:3, n-6) и дихомо- γ -линолеинска (C20:3, n-6). Структурне формуле појединих масних киселина приказане су на Слици 2.



Слика 2. Структурне формуле засићених и незасићених масних киселина

Међу засићеним масним киселинама у релативно великим количинама су присутне оне са C22 и C24 атома угљеника, док су C18-незасићене киселине најзаступљеније из групе незасићених масних киселина (међу полинезасићеним масним киселинама најзаступљенија је лиолна киселина) (Lin и сар., 2018).

Атопијски дерматитис је хронично, инфламаторно обољење, повезано са сувом кожом и има комплексну патофизиологију. Патогенеза ове болести је мултифакторијална и укључује интеракције генетских предиспозиција, утицаја фактора спољашње средине и имунолошких фактора. Повезана је са дисфункцијом епидермалне баријере, хроничном инфламацијом у кожи и повећаном пропустљивошћу коже за иритансе и алергене. Кожа је подложна разним инфекцијама и колонизацији бактеријама, као што је *Staphylococcus aureus*. Учесталост јављања овог обољења је све већа, нарочито код деце (погађа чак 15% до 20% деце у развијеним земљама) (Foster и сар., 2010; Lin и сар., 2018; Lodén, 2003).

Код атопијске коже хидратација SC-а је смањена, а повећан је трансепидермални губитак воде (енг. *Transepidermal Water Loss* - TEWL). Параметар TEWL је важан индикатор у процени функције кожне баријере. Претпоставља се да је атопијски дерматитис повезан са поремећајима метаболизма EFAs и њиховог инкорпорирања у фосфолипиде мембране. Код ове болести примећена је повећана брзина пролиферације епидермалних ћелија, појачана метаболичка активност и формирање стеролних естара и абнормалних кератиноцита. Оштећење баријерне функције коже је неизбежно присутно код свих пацијената са атопијским дерматитисом, независно од клиничког изгледа коже. Сувоћа кожа (са или без клиничке десквамације) је најчешће повезана са смањеном баријерном функцијом (Foster и сар., 2010; Lin и сар., 2018).

Благи облици атопијског дерматитиса се могу лечити апликацијом емолијенаса и препарата за негу коже, док тежи облици захтевају интензивну терапију антиинфламаторним или имуносупресивним агенсима, најчешће локалним кортикостероидима, антимикуробним лековима, антихистаминицима и др. Пошто конвенционалну фармаколошку терапију ове болести прате многобројни нежељени ефекти, циљ је да се формулишу нови фармацеутски препарати са активним компонентама биљног порекла, који би били терапијски ефикасни, нетоксични и безбедни за употребу и побољшали комплијансу пацијента (Hussain и сар., 2017).

У третману суве коже и атопијског дерматитиса, у циљу обнављања кожне баријере, доста се користе средства за влажење коже (енг. *moisturizers*) и емолијенси који су корисни у контроли атопијског дерматитиса, као и у његовој превенцији или

даљој прогресији. Ефикасна средства за влажење коже треба релативно брзо да редукују симптоме суве коже, без изазивања иритације. Хумектанси спадају у групу средстава за влажење коже и привлаче воду из дермиса у SC. У случају када релативна влажност околине прелази 70% до 80%, могу да привлаче воду из спољашњег окружења. Као хумектанси највише се користе глицерол, пропиленгликол, уреа, сорбитол и др. Показано је да препарати за примену на кожи базирани на глицеролу повећавају хидратацију SC-а. Глицерол може бити присутан у концентрацијама и до 20% у препарату, а да при том не доводи до нежељених ефеката на кожи. Додаје се препаратима намењеним лечењу суве коже и атопијског дерматитиса у циљу повећања епидермалне хидратације. Не препоручује се самостална употреба хумектанаса у препаратима за примену на кожи, јер они неће спречити хидратисани SC да одаје вишак воде, која је преузета из дубљих слојева коже. Парадоксално, њиховом самосталном применом се може повећати TEWL, што код коже са оштећеном баријерном функцијом није пожељно. Због тога се обично комбинују са оклузивним агенсима (Flynn и сар., 2001; Lin и сар., 2018; Lodén, 2003, 2005; Silverberg, 2017).

Емолијенси су средства за омекшавање коже, чине кожу глатком и имају слично деловање као средства за влажење, па се понекада поистовећују са њима. Обично средства за влажење у свом саставу садрже хумектансе да би се повећала хидратација коже, тј. капацитет везивања воде у SC-у. Емолијенси су врло ефикасни у третману свих поремећаја повезаних са сувом кожом. Они смањују TEWL, повећавају хидратацију коже, обнављају липидну структуру између корнеоцита, јачају кожну баријеру и побољшавају излед коже (Lodén, 2003, 2005; Pons-Guiraud, 2007). Научна истраживања су показала да рана, превентивна примена емолијенаса још током неонаталног периода може бити добра стратегија у превенцији настанка атопијског дерматитиса код деце. Емолијенси обезбеђују кожи егзогене липиде који побољшавају и штите оштећену кожну баријеру (Boulos и Yan, 2018).

Органске карбоксилне киселине (алфа- или бета-хидрокси киселине) додају се препаратима за влажење коже, зато што побољшавају десквамацију корнеоцита, стимулишу биосинтезу липида и доприносе хидратацији SC-а. Показано је да млечна киселина има потенцијал да везује воду, саставни је део природног влажећег фактора (енг. *Natural Moisturizing Factor* – NMF) и повећава биосинтезу церамида коже. Органске киселине су нарочито корисне у третману фото-остареле коже и симптома који прате ово стање. У синтези церамида у кожи учествују и неки други агенси, као

што су витамин Це и урсолна киселина (Flynn и сар., 2001; Lin и сар., 2018; Lodén, 2003, 2005; Rawlings, 2003).

Масна уља имају дугу историју употребе у препаратима за лечење кожных болести и стања. Најчешће липидне компоненте препарата за лечење суве коже и атопијског дерматитиса су моно-, ди- и триглицериди, воскови, масне киселине, минерална уља. Биљна уља (кокосово уље, маслиново уље, уље коштица грожђа, сунцокретово уље) се више користе у односу на животињска и својим оклузивним ефектом понашају се као заштитна баријера на кожи, омогућавајући кожи да задржи влажност и да се смањи трансепидермални губитак воде (Hussain и сар., 2017; Lin и сар., 2018; Silverberg, 2017). Стероли и тритерпеноиди присутни у уљу из семена плодова испољавају антиинфламаторна, антивирусна и антикарциногена својства, а потпомажу и зарастање рана (Klavins и сар., 2016).

Из велике групе масних киселина доста се користе стеаринска киселина (засићена масна киселина), мононезасићена олеинска киселина и полинезасићена линолна киселина. Олеинска киселина делује тако што побољшава пролазак других активних компоненти присутних у препарату кроз кожную баријеру. Линолна киселина има директан утицај на очување интегритета кожно баријере и њене пропустљивости за воду. Профил масних киселина је карактеристичан за свако уље и одређује његову стабилност, осећај након наношења на кожу и његову ефикасност. Најважније особине масних киселина су број и дистрибуција двоструких веза у угљоводоничном ланцу (Lin и сар., 2018; Lodén, 2005).

Есенцијалне масне киселине (EFAs), нарочито омега-6 киселине, утичу на физиологију коже тако што испољавају ефекте на функцију кожно баријере и активност протеина мембране (рецептора и ензима), утичу на флексибилност и флуидност ћелијске мембране и на процесе ћелијске сигнализације. Налазе се у највећој количини у склопу епидермалних фосфолипида, али су такође саставни део церамида где испољавају главне ефекте на баријерну функцију коже. EFAs се метаболишу у активне продукте – еикозаноиде, као што су простагландини и леукотриени, који учествују у инфламаторним, имунолошким и пролиферативним процесима у ћелијама коже. Најзаступљенија из ове групе масних киселина је линолна киселина (Foster и сар., 2010; Lodén, 2005).

Фосфолипиди присутни у биљним уљима углавном се спајају са спољашњим липидним омотачем SC-а потенцијално повећавајући пропустљивост кожно баријере за активне супстанце. Када се примене на кожу, различити конституенци масних уља

(триглицериди, фосфолипиди, слободне масне киселине, антиоксиданси) делују синергистички преко неколико механизма, а то су: очување хомеостазе кожно баријере, антиоксидативна, антиинфламаторна и антимикуробна својства, побољшано зарастање рана и антикарциногена својства (Lin и сар., 2018).

1.12. Липофилни крем као фармацеутски облик за локалну терапију биљним екстрактима и масним уљима

Примена препарата у облику емулзија (комбинација уља и воде) код поремећаја суве коже је пожељна у циљу нормализације функције кожно баријере и заштите коже од штетних спољашњих фактора (Pons-Guiraud, 2007). Кремови су најчешћи фармацеутски облик који се користи за формулацију препарата за лечење суве коже, који ће садржати активне компоненте као што су средства за влажење и емолијенси. То су двофазни системи (емулзије) који садрже две течности које се не мешају – уље и воду, где је једна од њих диспергована у другој у облику капи. Битан је однос између уљане и водене фазе, као и врста уља и количина осталих компонената крема (Lodén, 2003, 2005). Липофилни кремови су са фармацеутско-технолошког аспекта емулзије типа „вода у уљу“ (В/У), тј. дисперзије капи водене фазе унутар спољашње уљане фазе и по структури подсећају на хидролипидни слој коже. Након апликације, понашају се као влажећи агенси (повећавају хидратацију коже) са благо оклузивним ефектом и спречавају губитак воде из коже формирањем филма на површини коже. Сличне ефекте испољавају вазелин, течни парафин, сквален, биљна уља, воскови, стероли, фосфолипиди и др. Због потенцијала да обнављају липидни састав коже препоручују се за лечење суве коже (Flynn и сар., 2001; Trapp, 2007). Ефикасност препарата за лечење кожних обољења у великој мери зависи од комплијансе пацијената. Ако препарат има јак и непријатан мирис или је мастан и лепљив након апликације, пацијенту ће бити непријатно примењивати га (Lodén, 2003, 2005).

У формулацији липофилног крема треба водити рачуна о одабиру оптималних састојака, који не треба да изазивају иритацију или сензитизацију коже (као што су ланолин, цетил-алкохол, пропиленгликол, боје, парфеми). Као што је већ познато, квалитет финалног производа у великој мери зависи од квалитета полазних сировина и контроле производног процеса, па се препоручује употреба ексципијенаса фармацеутског степена чистоће увек када је то могуће. Употреба пажљиво одабраних

састојака са контролираним високим стандардима квалитета, испитане безбедности и ефикасности у складу са утврђеним критеријумима за фармацеутске производе могу значајно побољшати терапију пацијената са кожним болестима. На овај начин се добија фармацеутски препарат високог квалитета са минималним нечистоћама (Трарр, 2007).

Емулгатори обезбеђују стабилност крему, налазе се на међуповршини две фазе и раздвајају капи унутрашње фазе. У својој структури имају и хидрофилне и липофилне делове, тако да су неполарни угљоводонични ланци оријентисани ка уљаној фази, а поларне главе ка воденој фази. Препоручује се употреба нејонских емулгатора, јер не доводе до иритације коже, за разлику од јонских. Са увођењем нових врста емулгатора у фармацеутски развој полуврстих препарата за примену на кожи, омогућена је формулација стабилних емулзија типа вода у уљу (В/У), односно липофилних кремова, са већим садржајем воде и мањим процентом уља, што побољшава сензорне карактеристике крема и већу прихватљивост од стране пацијената (корисника препарата). Осим тога, препарати који су превише масни могу довести до појаве акни или фоликулитиса. Уље које се налази у спољашњој фази чини формулацију отпорнијом на испирање, за разлику од хидрофилних кремова који се лако спирају водом. Током фазе развоја липофилног крема, морају се размотрити концентрација и врста уља, концентрација и врста емулгатора, хумектанаса, конзерванаса и утицај других еципијенаса, као што су хелирајући агенси, антиоксиданси, парфеми и др. (Flynn и сар., 2001; Lodén, 2003, 2005).

Конзерванси су присутни у формулацији у циљу спречавања развоја микроорганизама током израде и употребе препарата. Идеалан конзерванс треба да поседује широк спектар активности, да буде безбедан за примену, стабилан у препарату и не треба да утиче на физичке карактеристике препарата. Остали састојци у формулацији и рН вредност препарата утичу на ефикасност употребљеног конзерванса. Лимунска и винска киселина, етилендиаминтетрасирћетна киселина (ЕДТА) и њене соли, поседују одређени ниво антиоксидативне активности, али и појачавају антиоксидативну активност других антиоксиданаса тиме што комплексирају јоне тешких метала, па су ови хелирајући агенси често присутни у формулацијама полуврстих препарата (Lodén, 2003).

Степен незасићености масних киселина утиче на њихову стабилност у формулацији. PUFAs са високим степеном незасићености које се налазе у саставу масног уља, веома су осетљиве на оксидацију, па се то мора узети у обзир приликом

формулације, израде и чувања В/У емулзија. Липидна оксидација доводи до настанка неугодних мириса (ужегао мирис) и продуката штетних по здравље. Познато је да неколико фактора подстичу липидну оксидацију, а то су кисеоник, светлост, топлота, јони прелазних метала. Због тога се у формулацију липофилног крема додају антиоксиданси. Присуство соли (електролита) у формулацији је потребно да би се спречила могућа дестабилизација емулзије (Dridi и сар., 2016; Lodén, 2005).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ предложене докторске дисертације је фармацеутски развој липофилног крема са активним компонентама биљног порекла, који ће садржати оптималну комбинацију стандардизованог екстракта и масног уља плодова испитиваних биљних врста (*Prunus spinosa* L., *Rosa canina* L., *Sambucus nigra* L. и *Sorbus aucuparia* L.), као природних извора биоактивних супстанци (полифенолних једињења, органских киселина, витамина и полинезасићених масних киселина), кроз концепт дизајна квалитета, који показује физичко-хемијску стабилност, безбедност (не доводи до појаве иритације), ефикасност и задовољавајућа апликативна својства и који би се користио у третману суве коже, промена на кожи које се јављају у склопу атопијског дерматитиса (пруритис, ксероза, екцем), оксидативног оштећења коже и хиперпигментација коже.

У складу са наведеним, да би се дошло до реализације истраживања, експериментални рад пролази кроз неколико фаза (циљева):

- 1. Израда екстраката из испитиваних плодова одабраних биљних врста:** подразумева одређивање садржаја влаге у свежим плодовима, екстракцију активних принципа из плодова применом ултразвучне екстракције коришћењем различитих растварача за екстракцију (метанол, 70% етанол, 45% пропиленгликол, пречишћена вода), као и одређивање приноса екстракције;
- 2. *In vitro* карактеризација израђених екстраката:** одређивање физичко-хемијских особина екстраката (рН вредност, индекс рефракције и релативна густина), одређивање садржаја укупних фенола, флавоноида, танина, проантоцијанидина и антоцијана; идентификацију и квантитативну HPLC анализу биоактивних једињења у екстрактима (полифенолна једињења, органске киселине, витамини Бе1, Бе2, α -токоферол) у циљу одабира екстрагенса и биљне врсте који дају екстракте са највећим садржајем испитиваних једињења;
- 3. *In vitro* процена антиоксидативне и антитирозиназне активности екстраката:** подразумева процену антиоксидативне активности на основу резултата следећих анализа – способност неутрализације DPPH, NO и \bullet OH радикала, FRAP тест, тест обезбојавања β -каротена и хелатациона активност за јоне гвожђа, у циљу одабира екстракта са највећим антиоксидативним потенцијалом, који ће се инкорпорирати у липофилни крем; антитирозиозна активност екстраката је испитана у циљу

могуће примене екстраката код хиперпигментација коже и поремећајима везаним за садржај меланина у кожи;

4. ***In vitro* испитивање примене екстраката плодова на ћелијским културама:** циљ је био да се испита утицај екстраката плодова на вијабилност фибробласта L-929 ћелијске линије;
5. **Изоловање масног уља из плодова применом две различите методе екстракције** (конвенционалном методом Soxhlet екстракције уз примену петролетра као растварача и наткритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом). На основу приноса екстракције, тј. садржаја масног уља у плодовима, одабраће се метода екстракције која ће се користити у даљем раду за изоловање уља из плодова и семена;
6. ***In vitro* карактеризација масних уља:** на основу резултата анализе састава добијених масних уља из плодова и семена, применом гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC-MS), вршиће се одабир масних уља (са највећим садржајем незасићених, есенцијалних масних киселина) која ће бити инкорпорирана у липофилни крем;
7. **Формулација и израда липофилног крема** (емулзија типа вода/уље – В/У) са одговарајућим емулгатором за стабилизацију емулзија овог типа и инкорпорирањем одабране комбинације екстракта са оптималним карактеристикама и масних уља плодова/семена, у физички стабилне емулзије;
8. **Карактеризација израђених липофилних крема:** одређивање физичко-хемијских карактеристика (рН вредност и електрична проводљивост), процена физичко-хемијске стабилности крема у функцији времена (испитивање стабилности након центрифугирања и након периода чувања препарата на собној температури у периоду од 12 месеци);
9. **Процена сензорних карактеристика израђених липофилних крема:** сензорна испитивања израђених крема заснивају се на процени унапред дефинисаних сензорних атрибута помоћу одабраног панела испитаника у складу са постојећим стандардима за испитивање сензорних карактеристика;
10. ***In vivo* процена безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних крема са одабраним екстрактима и масним уљима плодова,** мерењем биофизичких параметара коже након апликације испитиваних узорака на здраву

кожу испитаника и оклузије коже од 24 h мерењем параметара који директно одражавају структурне и функционалне карактеристике коже, а то су: трансепидермални губитак воде, електрична капацитивност – као мера хидратисаности SC-а, еритема индекс – параметар за процену појаве иритације/еритема коже, меланин индекс – параметар за процену промене боје коже, садржај површинских липида коже и рН вредност коже. Вредности параметара ће се процењивати поређењем са вредностима истих измерених на нетретираној кожи са и без оклузије (негативне контроле) и измерених на кожи на којој се апликује плацебо узорак;

11. *In vivo* испитивање ефикасности липофилних крема са одабраним екстрактима и масним уљима плодова у студији на здравим добровољцима, мерењем биофизичких параметара коже испитаника пре и након апликације емулзија у одређеним временским интервалима у току примене од 28 дана, као и 4 дана након престанка апликације узорака. Мериће се следећи параметри: трансепидермални губитак воде, електрична капацитивност – као мера хидратисаности SC-а, еритема индекс – параметар за процену појаве иритације/еритема коже, меланин индекс – параметар за процену промене боје коже, садржај површинских липида коже и рН вредност коже. Ефекти крема ће се процењивати поређењем вредности истих параметара измерених на нетретираној кожи (негативна контрола), измерених на кожи на којој се апликује плацебо узорак и на кожи на којој се апликује регистровани (референтни) препарат са тржишта (позитивна контрола).

Сва *in vivo* испитивања у оквиру експерименталног дела ове докторске дисертације изведена су у складу са принципима Хелсиншке декларације и одобрена од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу (број одлуке 12-6329/6 од 22.06.2017. године). Сви испитаници су потписали одговарајући информисани пристанак.

Ова докторска дисертација својим предметом и проблематиком истраживања подиже свест о примени биоактивних принципа (екстраката и масних уља) из дивљих плодова и примену концепта дизајна квалитета у фармацеутском развоју липофилног крема са природним активним принципима, који ће бити примењиван код проблема са сувом кожом, стања коже повезаних са атопијским дерматитисом, старењем коже

услед оксидативних оштећења изазваних слободним радикалима, као и хиперпигментација коже, који су последњих година све актуелнији.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

3.1. Материјали

3.1.1. Биљни материјал

Испитивани су дивљи плодови следећих биљних врста: *Prunus spinosa* L. (трњина), *Rosa canina* L. (дивља ружа), *Sambucus nigra* L. (зова) и *Sorbus aucuparia* L. (јаребика). Преглед биљних врста коришћених у испитивању дат је у Табели 1. Биљни материјал је идентификован на Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, у Београду, где се налазе и примерци ваучера ових биљних врста. Зрели плодови су сакупљани насумично, са различитих делова биљке, крајем месеца септембра и почетком месеца октобра 2015. године, на подручју Националног парка Власина, у југоисточној Србији. У експерименталном раду нису коришћени оштећени и незрели плодови, као ни плодови који су били превише зрели. Након брања, свежи плодови су паковани у полиетиленске кесе и чувани у замрзивачу на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до почетка анализе.

Табела 1. Преглед биљних врста коришћених у експерименталном раду

Биљна врста (латински назив)	Породица	Народни називи	Број ваучера	Део биљке коришћен у истраживању
<i>Prunus spinosa</i> L.	Rosaceae	трњина	2221PS	плод
<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	дивља ружа, шипурак (плод)	2008RC	плод
<i>Sambucus nigra</i> L.	Adoxaceae	зова, базга	1121SN	плод
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Rosaceae	јаребика	1407SA	плод

3.1.2. Хемикалије и реагенси

У циљу одређивања садржаја полифенолних једињења у екстрактима *in vitro* методама коришћени су *Folin–Ciocalteu* (FC) реагенс и кожни прах, произвођача

Sigma-Aldrich (САД), ванилин (Carl Roth GmbH, Немачка), метанол и диметил-сулфоксид (DMSO) набављени од произвођача Sigma-Aldrich (САД) и хлороформ произвођача VWR International (САД).

За испитивање антиоксидативне и антитирозиназне активности екстраката коришћени су DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) реагенс, трихлорсирћетна киселина (ТСА), TPTZ (2,4,6-трис-(2-пиридил)-s-триазин), β -каротен, линолна киселина, Tween[®] 20 (полисорбат 20; полиоксиетилен (20) сорбитан монолаурат), натријум-нитропрусид, етилендиаминтетрасирћетна киселина (ЕДТА), L-3,4-дихидроксифенил-аланин (L-DOPA), мононатријумова со 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-*p,p'*-дисулфонске киселине, хидрат (ферозин), произвођача Sigma-Aldrich (САД). Griess-ов реагенс је набављен од произвођача Fluka Analytical (Швајцарска), 2-дезоксид-*D*-рибоза произвођача Carl Roth (Немачка), тиобарбитурна киселина (ТВА) произвођача abcr (Немачка). Ензим тирозиназа, изолован из гљива, са специфичном активношћу од 5771 јединица/mg набављен је од произвођача Sigma-Aldrich (Немачка). Као стандардна једињења у овим тестовима коришћени су гална киселина, рутин трихидрат и династријумова со етилендиаминтетрасирћетне киселине, дихидрат (Na₂EDTAx2H₂O) произвођача Fluka Analytical (Швајцарска); тролокс 97% (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) произвођача Acros Organics (Данска); 3,5-ди-терц-4-бутилованихидрокситолуен (ВНТ) произвођача Supelco Analytical (САД); катехин, пирогалол, L-аскорбинска киселина, манитол, коцик киселина (произвођача Sigma-Aldrich, САД).

Стандардна једињења за HPLC анализу полифенолних једињења (гална киселина, урсолна киселина, олеанолна киселина, пирогалол, неохлорогенска киселина, протокатехинска киселина, катехин, хлорогенска киселина, процијанидин Б2, ванилинска киселина, кафена киселина, сиригинска киселина, епикатехин, *p*-кумарна киселина, скополетин, синапинска киселина, ферулна киселина, витексин, рутин, хиперозид, изокверцетин, етил етар протокатехинске киселине, нарингин, скопарон, нарингенин-7-*O*-глукозид, кемферол-3-*O*-глукозид, лутеолин-7-*O*-глукозид, апигенин-7-*O*-глукозид, флоридзин-дихидрат, елагинска киселина, *trans*-циметна киселина, кверцетин, тилирозид, лутеолин, флоретин, кемферол, делфинидин-3-*O*-рутинозид, делфинидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-3-*O*-рутинозид, цијанидин-3-*O*-глукозид), као и органских киселина (лимунска, јабучна, оксална, L-аскорбинска, ћилибарна, винска, пирогражђана, бадемова, млечна и хининска киселина), набављени су од произвођача Sigma-Aldrich (САД) или од произвођача Extrasynthese (Француска). Стандарди

испитиваних витамина (тиамин, рибофлавин и α -токоферол) били су од произвођача Sigma-Aldrich (САД). Сви стандарди су били HPLC квалитета, чистоће веће од 99%. За потребе HPLC анализе примењени растварачи (метанол и ацетонитрил) били су HPLC чистоће (Sigma-Aldrich, САД), док је високо-пречишћена вода за ове анализе припремљена уз помоћ Milli-Q система за пречишћавање (Millipore, Француска).

In vitro испитивање безбедности и ефикасности примене екстраката плодова рађено је на ћелијама фибробластима, L-929 ћелијске линије (ATCC, САД), које су адхерентне ћелије изоловане из поткожног везивног ткива миша. За разблаживање екстраката коришћен је медијум за ћелијске културе DMEM (енг. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Biological Industries, САД), који садржи 1 g/l глукозе, без L-глутамин. Медијуму је додат раствор антибиотик–антимикотик (Biological Industries, САД), који садржи пеницилин, стрептомицин и амфотерицин Б, затим стабилан глутамин (L-аланил-L-глутамин) (Biological Industries, САД) и фетални говеђи серум – FBS (енг. *Fetal Bovine Serum*) (Biological Industries, САД) за концентрацију раствора 10%. У овим експериментима коришћени су још трипсин-ЕДТА раствор (Biological Industries, САД), трипан плаво (Gibco, САД), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ) (Carl Roth, Немачка), 2-пропанол и PBS (енг. *Phosphate-Buffered Saline*) (Fisher Scientific, САД).

За изоловање масних уља из плодова и дериватизацију узорака уља коришћен је петролетар (температуре кључања 40–60 °C, густине 0,647–0,654 g/ml на 15 °C, чистоће веће од 99,5%) произвођача Carlo Erba Reagents, Италија. У наткритичним екстракцијама као наткритични флуид коришћен је комерцијални CO₂ чистоће 99% (Messer-Техногас, Србија). За припрему узорака за потребе GC анализе коришћени су растварачи метанол, хлороформ и метилен-хлорид произвођача Sigma-Aldrich (САД).

Све остале хемикалије коришћене у експерименталном раду биле су аналитичког степена чистоће, набављене од добављача Centrohem (Србија). У свим експериментима коришћена је пречишћена вода са Медицинског факултета у Нишу.

За израду узорака В/У емулзија (липофилних крема), као потенцијалних носача активних супстанци (екстраката и масних уља), коришћене су сировине приказане у Табели 2.

Табела 2. Преглед сировина коришћених за израду испитиваних липофилних крема (В/У емулзија)

Назив сировине (српски/енглески)	Функција	Трговачки назив, произвођач	Квалитет
Полиглицерил-4 изостеарат; цетил ПЕГ/ППГ-10-1 диметикон; хексил лаурат/ Polyglyceryl-4 isostearate; cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone; hexyl laurate	Примарни емулгатор	Abil® WE 09, Evonik Industries AG, Немачка	Спецификација произвођача
Октилдодеканол; октилдодецил ксилозид/ Octyldodecanol; octyldodecyl xyloside	Коемулгатор	Fluidanov™ 20X, Seppic, Француска	Спецификација произвођача
Бели пчелињи восак/ Beeswax, white	Емолијенс, регулатор конзистенције	Dehymuls SBL, Cognis Care Chemicals, Немачка	Ph. Eur. 9.0
Изопропил миристат/ Isopropyl myristate	Емолијенс	Tegosoft M, Evonik Goldschmidt, Немачка	Ph. Eur. 9.0
Триглицериди каприлно-капринске киселине/ Caprylic-capric triglyceride	Емолијенс	Saboderm TCC, Sabo, Италија	Ph. Eur. 9.0
Глицерол/ Glycerol	Хумектанс	Glycerol, BASF, Немачка	Ph. Eur. 9.0
Феноксиетанол; етилхексилглицерол/ Phenoxyethanol; ethylhexylglycerin	Конзерванс	Euxyl® PE 9010, Schülke & Mayr, Немачка	Спецификација произвођача
Натријумова со етилендиаминтетрасирћетне киселине, дихидрат/ Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	Комплексирајући агенс	Ethylenediaminetetra acetic acid disodium salt dihydrate, VWR Chemicals, Белгија	Ph. Eur. 9.0
Натријум хлорид/ Sodium chloride	Стабилизатор	Натријум хлорид, Centrohem, Србија	Ph. Eur. 9.0
Пречишћена вода/ Purified water	Водена фаза	Пречишћена вода	Ph. Eur. 9.0

3.2. Методе

3.2.1. Идентификација циљаног профила квалитета фармацеутског производа и селекција критичних атрибута квалитета

Концепт дизајна квалитета (QbD) је заснован на разумевању и контролисању односа између критичних атрибута квалитета (CQAs), критичних атрибута материјала (CMAs) и критичних параметара процеса (CPPs), који су најважнији за циљани профил

квалитета производа (QTTP). Према ИСН смерницама, практична примена QbD концепта у фармацеутској индустрији полази од дефинисања QTTP-а, који се односи на квалитет, безбедност и ефикасност производа. QTTP се дефинише на основу претходног знања о активним супстанцама и ексципијенсима у производу, комплијансе пацијента са коначном формулацијом и других атрибута који би дефинисали квалитет финалног производа. Свака стратегија која ће се континуирано пратити како би се у потпуности осигурала доследна производња финалног производа је контролна стратегија. Следећи корак је идентификација CQAs, CMAs и CPPs. По дефиницији, у критичне атрибуте квалитета (CQAs) спадају физичке, хемијске, биолошке или микробиолошке карактеристике производа које би требало да буду у одговарајућим, претходно постављеним границама, да би се добио производ унапред дефинисаног квалитета. Одређивање CMAs и CPPs се заснива на претходно стеченом знању, подацима из научне литературе и одрађених лабораторијских експеримената. CMAs имају утицаја на одабир CQAs и обично укључују карактеристике подлоге (ексципијенаса), као што су састојци масне фазе, карактеристике и концентрација емулгатора, коемулгатора и других помоћних материја, особине активних компонената у формулацији. CPPs су параметри процеса чије варијације имају утицаја на CQAs (нпр. процеси екстракције под контролисаним условима, време и брзина мешања и хомогенизације крема, температура масне фазе крема, итд.) и стога се требају пратити и контролисати да би се одабраним процесом производње добио производ жељеног квалитета (Amasya и сар., 2019; Vakonyi и сар., 2018; Bhise и сар., 2017; Kovács и сар., 2017).

ПРВА ФАЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

3.2.2. Одређивање садржаја влаге у испитиваним плодовима

Садржај влаге у испитиваним дивљим плодовима одређиван је према методи АОАС 930.15 (АОАС, 2005), израчунавањем количине воде која је испарила из свежег биљног материјала након процеса сушења. Губитак масе након сушења узорака изражаван је као садржај влаге, а резултати су представљени као % (m/m) у односу на масу свежих плодова, на основу следеће једначине:

$$\text{Садржај влаге (\%)} = \frac{m_f - m_d}{m_f} \times 100$$

где m_f представља почетну масу свежих плодова (у грамима), а m_d представља масу сувог биљног материјала (у грамима).

3.2.3. Припрема екстраката плодова одабраних биљних врста

Свежи плодови су механички здробљени и хомогенизовани, а затим подвргнути ултразвучној екстракцији. Тачно одмерена маса плодова (50 g) је екстрахована са различитим растварачима за екстракцију (Д:Е = 1:5, m/m) у ултразвучном купатилу (радни услови: снага 160 W, фреквенција 40 kHz), у трајању од 30 минута на собној температури од 22 ± 1 °C (Khan и сар., 2010). За екстракцију су коришћени следећи растварачи: метанол, 70% (v/v) етанол, 45% (m/m) пропиленгликол и пречишћена вода. Након филтрације кроз Whatman No. 1 филтер папир, екстракти су упарени до сува *in vacuo* применом ротационог вакуум упаривача (тип RV 05 basic, са посудом за загревање HB4 basic, ИКА-Werke, Немачка), под сниженим притиском, на температури од 40 °C да би се избегла деградација и губитак активних састојака плодова. Добијени остаци након упаравања су сушени у сушници (FD 23, Binder, Немачка) до константне масе. Екстракти су чувани у фрижидеру током даљих испитивања.

3.2.3.1. Одређивање приноса екстракције

Принос екстракције, изражен у процентима (% m/m), одређиван је као количина сувог екстракта (g) добијена из 100 g свежих плодова (енг. *fresh weight*), према следећој једначини:

$$\text{Принос екстракције (\%)} = \frac{m_e}{m_f} \times 100$$

где m_f представља почетну масу свежих плодова, а m_e представља масу сувог екстракта.

3.2.4. Физичко-хемијска *in vitro* карактеризација екстраката плодова

Одређивање физичко-хемијских карактеристика добијених течних екстраката плодова *in vitro* методама обухватало је мерење рН вредности екстраката, индекса рефракције и релативне густине. Одређивање ових параметара базирано је на методама описаним у Европској фармакопеји (Ph. Eur. 9.0, 2017). Потенциометријско одређивање рН вредности је рађено применом рН метра (рН 211 Microprocessor, HANNA instruments, САД), на температури од $21,5 \pm 0,01$ °С. Сونда рН метра је претходно калибрисана на прописан начин, пуферованим растворима рН = 4 и рН = 7. Индекс рефракције је одређен применом Abbe-овог рефрактометра (Carl Zeiss Jena, Немачка), на температури од $25 \pm 0,02$ °С. Пре почетка мерења рефрактометар је калибрисан применом сертификованих референтних супстанци. Мерења густине вршена су применом стакленог пикнометра од 25 ml, на константној температури од $25 \pm 0,02$ °С.

3.2.5. Анализа садржаја полифенолних једињења у екстрактима испитиваних дивљих плодова *in vitro* методама

За анализу садржаја полифенолних једињења, суви екстракти добијени након упаравања су растворени у одговарајућим растварачима за екстракцију, применом ултразвучног купатила, у тачно одређеним концентрацијама у зависности од методе анализе. Анализа полифенолних једињења обухватала је одређивање садржаја укупних фенола, флавоноида, танина, проантоцијанидина и антоцијана.

Опрема: спектрофотометар Evolution 60 UV/VIS, Thermo Scientific, САД.

3.2.5.1. Одређивање садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола (енг. *Total Phenolic Content* – TPC) екстраката плодова одређен је према *Folin–Ciocalteu* (FC) методи (Singleton и сар., 1999), са мањим модификацијама. У епрувети је помешано 50 μ l раствора екстракта и 250 μ l FC реагенса. Смеша је пажљиво вортексирана (ZX Classic Vortex Mixer, Velp Scientifica,

Италија) у трајању од једног минута, а затим је додато 750 μ l 20% (w/v) раствора натријум-карбоната и запремина је подешена до 5 ml додатком дестиловане воде. Након инкубације од 2 h на собној температури, на тамном месту, апсорбанца реакционе смеше је читавана на спектрофотометру, на таласној дужини од 765 nm. Као стандард за конструисање калибрационе криве коришћена је гална киселина (опсег концентрација 0,015–0,150 mg/ml). Резултати су приказани као милиграм еквивалента галне киселине (енг. *Gallic Acid Equivalents* – GAE) по граму сувог екстракта (енг. *dry weight* – dw).

3.2.5.2. Одређивање садржаја укупних флавоноида

За одређивање садржаја укупних флавоноида (енг. *Total Flavonoid Content* – TFC) у екстрактима плодова примењена је колориметријска метода са алуминијум-хлоридом (Woisky и Salatino, 1998), са мањим изменама. Узорци екстракта (односно раствора стандардног једињења) у количини од 0,5 ml, помешани су са метанолом (1,5 ml), 10% раствором алуминијум-хлорида (100 μ l), 1M раствором калијум-ацетата (100 μ l) и пречишћеном водом (2,8 ml). Смеша је након тога инкубирана на тамном месту, на собној температури, током 30 минута. Апсорбанца реакционе смеше је мерена на спектрофотометру, на таласној дужини од 425 nm. Рутин је коришћен као стандард за конструисање калибрационе криве, у опсегу концентрација од 0,05 mg/ml до 0,50 mg/ml. Резултати су представљени као милиграм рутин еквивалента (енг. *Rutin Equivalents* – RE) по граму сувог екстракта (dw).

3.2.5.3. Одређивање садржаја укупних танина

Садржај укупних танина (енг. *Total Tannin Content* – TTC) одређиван је у екстрактима испитиваних плодова према поступку из Европске фармакопеје (Ph. Eur. 9.0, 2017). Метода је базирана на реакцији испитиваних екстракта са фосфомолибдволфрамовим реагенсом (FC реагенс) у базној средини. Посматрана је разлика у апсорбанцама укупних полифенола и полифенола који се нису адсорбовали на кожни прах. Смеша са кожним прахом је енергично мешана на брзини од 400 обртаја у минути (о/мин), помоћу шејкера Vibromix 30 (Tehtnica, Словенија).

Апсорбанца реакционе смеше је мерена на спектрофотометру, на таласној дужини од 760 nm. Садржај укупних танина у екстрактима изражен је у процентима, као проценат пирогалолола (% m/m), на основу следеће једначине:

$$\text{TTC (\%)} = \frac{62,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 \times m_1}$$

где m_1 представља масу узорка екстракта која је испитивана, у грамима; m_2 представља масу пирогалолола, такође у грамима, а A_1 , A_2 и A_3 су апсорбанце одговарајућих раствора.

3.2.5.4. Одређивање садржаја укупних проантоцијанидина

Садржај укупних проантоцијанидина (енг. *Total Proanthocyanidin Content* – ТРАС) одређиван је тестом са ванилином (Price и сар., 1978). Коришћен је свеже припремљен ванилин реагенс, који је добијен мешањем истих запремина 1% раствора ванилина у метанолу и 8% хлороводоничне киселине у метанолу. Сваки узорак екстракта је стављен у две епрувете (по 1,0 ml), тако да је за сваки екстракт постојала слепа проба. У први сет епрувета додато је по 0,5 ml ванилин реагенса, док је у други сет епрувета додато по 5,0 ml 4% хлороводоничне киселине у метанолу. Реагенси су додавани у епрувете у интервалима од једног минута. Након инкубације на 30 ± 1 °C у воденом купатилу, у трајању од 20 минута, читавана је апсорбанца узорака на спектрофотометру, на таласној дужини од 500 nm. Одређивана је разлика у апсорбанцама узорака са ванилином и слепе пробе за сваки екстракт. Стандардна крива је конструисана коришћењем стандардног раствора катехина у концентрацијама 0,03–0,30 mg/ml. Резултати теста су представљени као милиграм катехин еквивалента (енг. *Catechin Equivalent*s – CE) по граму сувог екстракта (dw).

3.2.5.5. Одређивање садржаја укупних антоцијана

Садржај укупних антоцијана (енг. *Total Anthocyanin Content* – ТАС) у екстрактима плодова испитиван је методом из Европске фармакопеје (Ph. Eur. 9.0, 2017). Тачно

одмерена маса екстракта је помешана са метанолом и енергично мешана на магнетној мешалици (ARE Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Италија) у трајању од 30 минута. Након тога, смеша је филтрирана, а филтрат је разблажен метанолом до запремине од 100 ml. Затим је овај раствор додатно разблажен 50 пута применом 0,1% (v/v) раствора хлороводоничне киселине у метанолу. Мерена је апсорбанца овако добијеног раствора на спектрофотометру, на таласној дужини од 528 nm. Крајњи резултат представљен је као проценат укупних антоцијана, изражен као цијанидин-3-О-глукозид хлорид (CG), на основу следеће формуле:

$$\text{TAC (\%)} = \frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

где је 718 вредност која се односи на специфичну апсорбанцу цијанидин-3-О-глукозид хлорида очитану на таласној дужини од 528 nm; A је апсорбанца узорака очитавана на 528 nm; m представља масу испитиваног екстракта у грамама.

3.2.6. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима испитиваних плодова

Анализа садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима испитиваних плодова, техником течне хроматографије високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC), рађена је помоћу Agilent Technologies 1200 HPLC уређаја (Agilent Technologies, САД), са DAD (енг. *Diode Array Detector*) и FLD (енг. *Fluorescence Detector*) детекторима.

3.2.6.1. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и органских киселина у екстрактима испитиваних плодова

Испитивање садржаја полифенолних једињења је вршено применом колоне Synergi™ 4µm Hydro-RP 80 Å (50 × 1 mm), градијентним режимом елуирања са две мобилне фазе, тј. „А/Б“ („А“ – 0,2 М раствор фосфорне киселине и „Б“ – ацетонитрил) и протоком мобилне фазе од 1 ml/min. Најбоље су се показале комбинације: 89–75% А (0–35 мин); 75–60% А (35–55 мин); 60–35% А (55–60 мин) и 35–0% А (60–70 мин). Температура колоне је износила 30 °С, док је запремина инјектованих узорака, као и

стандардних раствора била 4 μ l. Детекција сигнала вршена је на DAD детектору, у UV области, на таласним дужинама од 260 nm, 325 nm и 360 nm.

HPLC анализа антоцијана је постигнута применом колоне LiChrospher 100 RP 18e (5 μ m), 250 \times 4 mm, са протоком мобилне фазе од 0,8 ml/min. Мобилна фаза се састојала из дела „А“ [смеша 500 ml воде HPLC чистоће и 9,8 ml 85% фосфорне киселине (m/m)] и „Б“ (ацетонитрил), са градијентним режимом елуирања: 89–75% А, 0–35 мин; 75–60% А, 35–55 мин; 60–35% А, 55–60 мин; 35–0% А, 60–70 мин. Детекција је вршена у UV области помоћу DAD детектора, на таласној дужини од 520 nm. Температура колоне је износила 30 $^{\circ}$ C. Запремина инјектованих узорака, као и стандардних раствора била је 4 μ l.

За анализу квалитативног и квантитативног садржаја полифенолних једињења коришћени су следећи стандардни раствори, добијени растварањем стандардних једињења у метанолу или апсолутном етанолу: гална киселина (концентрације 1,14 mg/ml), урсолна киселина (0,38 mg/ml), олеанолна киселина (0,74 mg/ml), пирогалол (0,50 mg/ml), неохлорогенска киселина (0,30 mg/ml), протокатехинска киселина (0,34 mg/ml), катехин (0,45 mg/ml), хлорогенска киселина (0,96 mg/ml), процијанидин Б2 (0,40 mg/ml), ванилинска киселина (0,30 mg/ml), кафеина (0,52 mg/ml), сиригинска киселина (0,46 mg/ml), епикатехин (0,40 mg/ml), *p*-кумарна киселина (0,74 mg/ml), скополетин (0,38 mg/ml), синапинска киселина (0,38 mg/ml), ферулна киселина (0,36 mg/ml), витексин (0,15 mg/ml), рутин (0,18 mg/ml), хиперозид (0,25 mg/ml), изокверцетин (0,34 mg/ml), етил етар протокатехинске киселине (0,52 mg/ml), нарингин (0,56 mg/ml), скопарон (0,56 mg/ml), нарингенин-7-*O*-глукозид (0,38 mg/ml), кемферол-3-*O*-глукозид (0,28 mg/ml), лутеолин-7-*O*-глукозид (0,38 mg/ml), апигенин-7-*O*-глукозид (0,40 mg/ml), флоридзин-дихидрат (0,46 mg/ml), елагинска киселина (0,52 mg/ml), *trans*-циметна киселина (0,40 mg/ml), кверцетин (0,36 mg/ml), тилирозид (0,42 mg/ml), лутеолин (0,12 mg/ml), флоретин (0,46 mg/ml), кемферол (0,30 mg/ml), делфинидин-3-*O*-рутинозид (0,34 mg/ml), делфинидин-3-*O*-глукозид (0,30 mg/ml), цијанидин-3-*O*-рутинозид (0,32 mg/ml) и цијанидин-3-*O*-глукозид (0,30 mg/ml).

За анализу органских киселина примењено је изократско елуирање, на колони SynergiTM 4 μ m Hydro-RP 80 Å (50 \times 1 mm), са протоком мобилне фазе од 0,7 ml/min. Мобилна фаза је била 20 mM фосфатни пуфер (pH = 2,9), који се састојао из анхидрованог дикалијум-хидрогенфосфата, 85% фосфорне киселине (m/m) и воде HPLC чистоће. Детекција је вршена DAD детектором, у UV области, на таласној

дужини од 220 nm. Температура колоне је износила 30 °C. Запремина инјектованог узорка, као и стандардних раствора била је 4 µl. За анализу квалитативног и квантитативног садржаја органских киселина коришћени су следећи стандардни раствори, добијени растварањем стандардних једињења у метанолу: лимунска киселина (концентрације 1,06 mg/ml), јабучна (2,38 mg/ml), оксална (1,02 mg/ml), L-аскорбинска (1,08 mg/ml), ћилибарна (1,10 mg/ml), винска (1,04 mg/ml), пирогрожђана (1,00 mg/ml), бадемова (2,24 mg/ml), млечна (2,16 mg/ml) и хининска киселина (0,13 mg/ml).

Узорци екстракта су пре убризгавања филтрирани кроз 0,2 µm PTFE филтер (Fisher Scientific, САД). Квалитативна HPLC анализа полифенолних једињења и органских киселина у екстрактима извршена је поређењем ретенционих времена са ретенционим временима екстерних стандарда и поклапања добијених спектра снимањем у UV области, применом Agilent ChemStation софтвера. Квантификација једињења је рађена екстерном калибрацијом са одговарајућим стандардима, применом методе калибрационе праве са екстерним стандардом или методом једне тачке са екстерним стандардом.

3.2.6.2. HPLC анализа садржаја витамина у екстрактима испитиваних плодова

Анализа садржаја витамина у екстрактима испитиваних плодова вршена је применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (енг. *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC). У екстрактима су одређиване количине хидросолубилних витамина (витамина Бе1 – тиамина и витамина Бе2 – рибофлавина) и α-токоферола из групе липосолубилних витамина.

3.2.6.2.1. Анализа садржаја тиамина и рибофлавина

Квалитативна и квантитативна анализа хидросолубилних витамина, витамина Бе1 – тиамина и витамина Бе2 – рибофлавина, рађена је према процедури из литературе (Lalić и сар., 2014; Sunarić и сар., 2012), са одређеним изменама. Одређивање је вршено применом колоне Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 3 mm; 3,5 µm). Температура колоне је износила 30 °C, као мобилна фаза коришћена је смеша метанола и 0,005 M воденог раствора амонијум-ацетата (pH = 5,0) у запреминском односу 30:70 (v/v). Проток мобилне фазе је износио 0,425 ml/min. Коришћен је FLD детектор, а детекција је рађена

на таласним дужинама $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$ за тиамин, док је за рибофлавин вршена детекција на таласним дужинама $\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ (појачање детектора РМТ:12). Инјектована је запремина узорака и стандарда од 20 μl .

За одређивање садржаја тиамина неопходан је био поступак дериватизације пре пуштања узорака кроз колону. Одмерено је 650 μl екстракта којем је додато 130 μl реагенса за дериватизацију са калијум-хексацијанофератом (1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ у 15% раствору натријум-хидроксида). Након центрифугирања (14000 о/мин, током 5 минута) одмерено је 650 μl супернатанта који је коришћен за хроматографску анализу.

За анализу садржаја тиамина и рибофлавина, узорци екстракта са 45% пропиленгликолом су пре снимања, услед њихове велике густине, разблаживани водом у односу 1:1 и центрифугирани. Сви екстракти су пре HPLC анализе филтрирани кроз мембрански филтер пречника пора 0,22 μm . Стандардни раствори су добијени растварањем тачно одмерене масе стандарда витамина у 5% HCl. Концентрација основног стандардног раствора тиамина износила је 0,1 mg/ml, док је у случају рибофлавина концентрација основног стандардног раствора била 1,0 mg/ml. Њиховим разблаживањем направљене су серије раствора у различитом опсегу концентрација. Идентификација витамина је била заснована на поређењу ретенционих времена витамина из узорака са онима за стандардне супстанце, као и поређењем њихових UV спектра, применом Agilent ChemStation софтвера.

3.2.6.2.2. Анализа садржаја α -токоферола

Квалитативна и квантитативна анализа α -токоферола рађена је према поступку из литературе (Sunarić и сар., 2017), са мањим изменама. За припрему узорака за одређивање садржаја α -токоферола коришћена је екстракција на чврстој фази (енг. *Solid Phase Extraction* – SPE), као сепарациона метода погодна за изоловање анализата, његово концентровање и пречишћавање. Екстракција је рађена на моделу Visiprep™ DL Vacuum Manifold, 12-port (Supelco, Немачка). За екстракцију је изабран кертриц Chromabond C18 ec (произвођача Macherey-Nagel, Немачка), запремине 1 ml и масом сорбента (модификована октадецил силика фаза са величином честица од 45 μm) од 100 mg у полипропиленским колоницама.

Експериментални услови током екстракције су строго контролисани, па је процедура вршена по следећем протоколу: 1) кондиционирање кертрица које је рађено

квашењем сорбента са 2 ml воде, а затим са 2 ml метанола, 2) наношење узорака екстраката (у опсегу запремина од 500 μ l до 2000 μ l) и његово пропуштање кроз кертриц брзином од 1 ml/min, 3) елуирање анализата са 1 ml метанола. Добијени елуат је пребачен у стаклену вијалицу и директно сниман на HPLC апарату.

HPLC анализа садржаја α -токоферола вршена је применом колоне Restek Ultra IBD (150 \times 3 mm, 3 μ m), при радној температури колоне од 30 $^{\circ}$ C. Као мобилна фаза коришћени су метанол и ацетонитрил у запреминском односу 30:70 (v/v), а проток мобилне фазе је подешен на 0,8 ml/min. Инјектована је запремина узорака и стандарда од 20 μ l. Основни стандардни раствор је припремљен у концентрацији од 1,44 mg/ml (као растварач је коришћен апсолутни етанол). Његовим разблаживањем направљена је серија раствора у одређеном опсегу концентрација. Детекција α -токоферола је вршена у UV области на таласној дужини од 295 nm, као и применом FLD детектора на таласним дужинама λ_{ex} = 295 nm и λ_{em} = 330 nm. Идентификација витамина је била заснована на поређењу ретенционих времена витамина из узорака са онима за стандардне супстанце, као и поређењем њихових UV спектра, применом Agilent ChemStation софтвера.

3.2.7. *In vitro* испитивање антиоксидативне активности екстраката плодова

Одређивање антиоксидативне активности вршено је применом неколико *in vitro* метода са различитим механизмом деловања. Ту спадају одређивање способности неутрализације DPPH радикала, азот-оксид радикала и хидроксилних радикала, одређивање редукционе способности екстраката, одређивање способности инхибиције обезбојавања β -каротена и хелатациона активност према јонима гвожђа.

3.2.7.1. Одређивање способности неутрализације DPPH радикала

Способност екстраката да неутралишу слободне радикале (енг. *Radical Scavenging Capacity* – RSC) одређена је *in vitro* методом са DPPH реагенсом (Brand-Williams и сар., 1995). Аликвот испитиваних екстраката (100 μ l) у различитим концентрацијама помешан је са 2,90 ml метанола и са 1,0 ml свеже припремљеног радног раствора DPPH (концентрације 90 μ mol/l). Реакциона смеша је енергично мешана, а затим остављена

да стоји на собној температури од 22 ± 1 °C, на тамном месту, током 30 минута. Апсорбанца је мерена спектрофотометријски на таласној дужини од 517 nm. Исти поступак је примењен за позитивне контроле, тролокс и ВНТ. Као слепа проба коришћен је метанол. Антиоксидативна активност, тј. способност неутралисања слободних DPPH радикала изражена је као проценат инхибиције, заменом измерених апсорбанци, према следећој једначини:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где је A_{control} апсорбанца контроле (која је уместо раствора екстракта садржала метанол), док је A_{sample} апсорбанца раствора испитиваних екстраката. Антиоксидативна активност је представљена као IC_{50} вредност (концентрација екстракта у $\mu\text{g/ml}$ која неутралише 50% слободних радикала), која је одређена на основу једначине линеарне регресије.

3.2.7.2. Одређивање способности неутрализације азот-оксид радикала

Способност неутрализације азот-оксид радикала одређена је према модификованом поступку из литературе (Sreejaуан и Рао, 1997). Укратко, 1 ml раствора натријум-нитроприсида (10 mM) у фосфатном пуферу (0,1 M, pH = 7,4) је помешан са различитим концентрацијама екстракта или стандардног раствора у фосфатном пуферу. Реакциона смеша (3 ml) је затим инкубирана на 25 °C у трајању од 120 минута. Након инкубације, 0,5 ml смеше је помешано са 0,5 ml *Griess*-овог реагенса. Апсорбанца хромофоре је мерена спектрофотометријски на 546 nm. Контролни узорци су садржали раствор пуфера уместо екстракта/стандарда. Као референтни антиоксиданс коришћена је L-аскорбинска киселина. Процент неутрализације азот-оксид радикала (NO) је рачунат применом следеће једначине:

$$\text{NO (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где је A_{control} апсорбанца контроле (која је уместо раствора екстракта садржала метанол), док је A_{sample} апсорбанца раствора испитиваних екстраката. Израчуната је концентрација екстракта/стандарда ($\mu\text{g/ml}$) потребна за неутрализацију 50% азот-оксид радикала (IC_{50}).

3.2.7.3. Одређивање степена деградације 2-дезокси-D-рибозе посредством неутрализације хидроксилних радикала (неспецифична и специфична за место везивања)

Способност екстраката да неутралишу слободне хидроксилне радикале, неспецифична за место везивања (енг. *Hydroxyl Radical Scavenging, Nonsite Specific* – $\bullet\text{OH}_{\text{NS}}$), процењена је методом из литературе (Halliwell и сар., 1987), са мањим модификацијама. Реакциона смеша укупне запремине од 1 ml садржала је 100 μl екстракта или стандарда у различитим концентрацијама, 500 μl раствора 2-дезокси-D-рибозе (5,6 mM) у фосфатном пуферу (50 mM, pH = 7,4), 200 μl смеше која је садржала 100 μM FeCl_3 и 104 μM ЕДТА у односу 1:1 (v/v), 100 μl H_2O_2 (1,0 mM) и 100 μl L-аскорбинске киселине (1,0 mM). Смеша је вортексирана и инкубирана на 50 °C у трајању од 30 минута. Након инкубације, у смешу је додато 1 ml 2,8% раствора ТСА и 1 ml 1,0% раствора ТВА. Поновљен је поступак вортексирања и инкубације (на 50 °C током 30 минута) да би дошло до појаве боје. Након хлађења мерена је апсорбанца смеше на 532 nm. Као референтни стандард употребљен је манитол, а контрола је садржала све реагенсе изузев екстракта, односно стандарда манитола.

Способност екстракта да инхибише пероксидацију посредовану хидроксилним радикалима, али специфичну за место везивања (енг. *Hydroxyl Radical Scavenging, Site Specific* – $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$), односно њихов потенцијал да везују јоне гвожђа и утичу на стварање хидроксилних радикала, процењена је истим поступком као за $\bullet\text{OH}_{\text{NS}}$, осим што је ЕДТА замењена фосфатним пуфером (Aruoma и сар., 1987).

Процент неутрализације хидроксилних радикала ($\bullet\text{OH}$) у оба теста рачунат је применом следеће једначине:

$$\bullet\text{OH} (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где је где је A_{control} апсорбанца контроле, док је A_{sample} апсорбанца раствора испитиваних екстраката. IC_{50} вредност је приказана као концентрација екстракта, односно стандарда ($\mu\text{g/ml}$) потребна за неутрализацију 50% хидроксилних радикала.

3.2.7.4. Одређивање способности хелатације екстракта према јонима гвожђа

Хелатациона активност екстраката према јонима гвожђа (енг. *Ferrous Ion Chelating Activity* – FIC) је процењена применом поступка описаног у литератури, са мањим модификацијама (Dinis и сар. 1994). Метод се базира на праћењу опадања апсорбанце Fe^{2+} -ферозин комплекса. Аликвот од 150 μl различитих концентрација екстракта је помешан са 50 μl раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0 mM) у микротитарској плочи са 96 места и инкубирано 5 минута на собној температури. Реакција је иницирана додатком 50 μl раствора ферозина концентрације 5,0 mM. Затим је реакциона смеша енергично промешана и остављена да стоји на собној температури 10 минута да би се постигао еквилибријум. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 562 nm. Ради поређења, хелатор металних јона $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ је коришћен као референтни стандард. Контрола је припремљена на исти начин, осим што је уместо екстракта, односно стандарда, употребљен метанол. Хелатациона способност екстраката за јоне гвожђа, тј. проценат инхибиције стварања Fe^{2+} -ферозин комплекса, рачунат је преко следеће једначине:

$$\text{FIC} (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где је где је A_{control} апсорбанца контроле, док је A_{sample} апсорбанца раствора испитиваних екстраката. На основу регресионе једначине зависности хелатационе активности и концентрације екстракта/стандарда одређена је концентрација екстракта/стандарда ($\mu\text{g/ml}$), потребна за хелатацију 50% јона гвожђа (IC_{50}).

3.2.7.5. Одређивање способности инхибиције обезбојавања β -каротена

Антиоксидативна активност екстраката плодова је одређена тестом инхибиције обезбојавања β -каротена (енг. *β -Carotene Bleaching – BCB*), на основу способности заустављања липидне пероксидације и деградације β -каротена (Koleva и сар., 2002). Прво је направљена реакциона емулзија β -каротена и линолне киселине, која се припрема непосредно пре почетка експеримента. У балон са округлим дном одмерено је 1 ml раствора β -каротена у хлороформу (концентрације 0,2 mg/ml), 25 μ l линолне киселине и 200 mg полисорбата 20. Затим је хлороформ из ове смеше одстрањен у струји азота. У балон је додато 50 ml оксигенисане воде (добијене увођењем кисеоника у високопречишћену воду у трајању од 30 минута) и реакциона емулзија је енергично промешана. Направљени су основни раствори екстраката плодова, у концентрацији од 1,0 mg/ml, који су затим разблаживани у даљем току експеримента. Као референтни стандардни раствор коришћен је раствор ВНТ у концентрацији од 0,1 mg/ml.

У поље микротитарске плоче са 96 места отпипетирано је по 25 μ l екстракта у различитим концентрацијама и 200 μ l емулзије β -каротен–линолна киселина. За припрему негативне контроле уместо узорака екстракта коришћен је метанол. Плоче су пажљиво мешане на шејкеру (Microplate shaker Vibromix 30, Tehtnica, Словенија), на 300 о/мин, током 5 минута. Након 120 минута инкубације на 55 °C у лабораторијском инкубатору (Binder, Немачка), мерена је апсорбанца на таласној дужини од 450 nm помоћу Elisa читача (Multiskan Ascent 354 Microplate Reader, Thermo Labsystems, Финска). Апсорбанца је мерена пре инкубације, 30, 60, 90 и 120 минута након инкубације, тј. све док контрола није променила боју.

Антиоксидативна активност је изражена као проценат инхибиције обезбојавања β -каротена, а резултати су добијени применом следећих једначина (Al-Saikhan и сар., 1995):

$$\text{BCB (\%)} = \frac{R_{\text{control}} - R_{\text{sample}}}{R_{\text{control}}} \times 100$$

$$R = \frac{\ln[At_0 / At_{120}]}{120}$$

где R представља брзину обезбојавања β -каротена; \ln је природни логаритам; At_0 представља иницијалну апсорбанцу измерену пре инкубације ($t = 0 \text{ min}$), а At_{120} апсорбанцу измерену након инкубације од 120 минута. Концентрација екстракта која показује 50% инхибиције обезбојавања β -каротена (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$), израчуната је применом једначине регресионе праве.

3.2.7.6. Одређивање редукционе способности екстракта

Антиоксидативна активност у овом тесту процењена је на основу способности екстракта да редукују јоне гвожђа (енг. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – FRAP), поступком из литературе који је у мањој мери модификован (Benzie и Strain, 1996). Радни раствор FRAP реагенса је припремљен непосредно пред почетак експеримента, мешањем 300 mM ацетатног пуфера $\text{pH} = 3,6$ (добијен мешањем 6,4 ml 2 M раствора натријум-ацетата и 93,6 ml 2 M раствора сирћетне киселине разблажених водом до црте у нормалном суду од 1000 ml), 10 mM раствора TPTZ у 40 mM HCl и 20 mM раствора $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, у односу 10:1:1, v/v/v. У 100 μl испитиваног екстракта, односно раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (у концентрацији од 100–1000 μM) додато је 3,0 ml раствора FRAP реагенса. Добијена смеша је вортексирана (ZX Classic Vortex Mixer, Velp Scientifica, Италија) и остављена да одстоји на собној температури 10 минута, заштићено од светлости. Апсорбанца обојеног производа (гвожђе (II)–трипиридилтриазин комплекса) је измерена на спектрофотометру, на таласној дужини од 593 nm. Као слепа проба коришћена је смеша метанола (уместо узорака екстракта) и раствора FRAP реагенса. Антиоксидативна активност је изражена као $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ еквивалената по граму сувог екстракта (dw). ВНТ и L-аскорбинска киселина су коришћени као референтни стандарди.

3.2.8. *In vitro* испитивање антитирозилазне активности екстракта плодова

Испитивање антитирозилазне активности, односно инхибиције ензима тироминазе (енг. *Tyrosinase Inhibition Assay* – TIA) је извршено према процедури из литературе (Fu и сар., 2005), са одређеним променама. За овај експеримент је коришћена тироминаза из гљива, док је L-DOPA била супстрат. Дифенолазна активност тироминазе је праћена

спектрофотометријски, на основу формирања допахрома на 475 nm. У микротитарску плочу са 96 места је отпипетирано 40 μ l 10 mM раствора L-DOPA и 100 μ l 50 mM натријум фосфатног пуфера (pH = 6,8), а затим је плоча инкубирана на 30 °C током 5 минута, у лабораторијском инкубатору. Након тога је додато 100 μ l раствора екстракта у DMSO у различитим концентрацијама и 30 μ l воденог раствора тирозиназе (активност ензима је била 217 јединица/ml), а смеша је затим инкубирана на 30 °C још 25 минута. Након инкубације, ензимска активност је одређена мерењем апсорбанце на 475 nm. Контрола је уместо инхибитора ензима садржала 3,3% DMSO. Као референтни стандарди коришћене су коџик киселина и L-аскорбинска киселина. Процент инхибиције ензима тирозиназе је рачунат применом следеће једначине:

$$\text{TIA (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где је где је A_{control} апсорбанца контроле, док је A_{sample} апсорбанца испитиваних узорака. Ефекат инхибиције екстракта је представљен као концентрација екстракта (μ g/ml) неопходна за 50% инхибиције ензима (IC_{50}).

3.2.9. *In vitro* испитивање примене екстракта плодова на ћелијским културама

У овом експерименту испитивани су ефекти примене израђених екстракта плодова на ћелијама – фибробластима L-929 ћелијске линије (адхерентне ћелије изоловане из поткожног везивног ткива миша). Екстракти су пре почетка испитивања разблажени у медијуму за ћелијске културе (DMEM). Након разблаживања добијене су следеће концентрације екстракта: 0,1 mg/ml, 0,4 mg/ml, 1,0 mg/ml и 4,0 mg/ml, које су даље испитиване на ћелијама.

3.2.9.1. Култивисање ћелија

Фибробласти L-929 ћелијске линије су гајени у DMEM хранљивом медијуму који служи за култивацију ћелија. Наком додатка стабилног глутамин (концентрације 2 mM), 10% раствора феталног говеђег серума (FBS) и раствора антибиотик–

антимикотик добијен је комплетан медијум. Његова замена је вршена у асептичним условима (у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха), на свака 2–3 дана. Приликом замене медијума стављано је 5 ml свежег медијума по фласку површине 25 cm² (Greiner Bio-One, Немачка) у којем су се налазиле ћелије. Коришћене ћелије су гајене у инкубатору, на температури од 37 °С, у атмосфери са 5% CO₂, засићеној влажношћу.

3.2.9.2. Пасажа ћелија

Пасажа (пресађивање) ћелија је вршена при конфлуентности ћелија од 80%, тако што је ћелијама прво уклоњен медијум, а затим је додато 2–3 ml 0,25% раствора трипсин-ЕДТА. Након инкубације ћелија током 5 минута на температури од 37 °С и одлепљивања ћелија, процес трипсинизације је прекинут додатком 5 ml свежег комплетног медијума. Затим су ћелије ресуспендоване, а добијена ћелијска суспензија је подвргнута центрифугирању на 1200 о/мин, у трајању од 10 минута, на температури од 4 °С.

3.2.9.3. Одређивање густине ћелија

Одговарајућа густина ћелија добијена је коришћењем *Trypan Blue Dye Exclusion* теста, која подразумева бојење ћелија трипан плавим (0,4% *Trypan Blue Exclusion Dye*). Боја трипан плаво боји мртве ћелије у плаво, услед веће пропустљивости њихове мембране, док су живе ћелије необојене. Процес бројања живих ћелија је рађен на светлосном микроскопу, на хемоцитометријској комори по *Malasez*-у (боја и ћелијска суспензија су биле у односу 1:1). Густина ћелија је рачуната по следећој формули: број ћелија у 10 поља $\times 10 \times 2 =$ број ћелија у 1 μ l (односно $\times 10^3$ ћелија у 1 ml). Множено је са 10, зато што је укупан број поља у комори 100, а са 2, јер је то разблажење ћелијске суспензије (однос боје и ћелијске суспензије у експерименту је био 1:1).

Након тога су ћелије у одређеној густини посађене у нове флашкове и култивисане са 5 ml свежег медијума. На описан начин добијена је одговарајућа густина ћелија приликом њиховог сађења у стерилне плоче и третирања испитиваним екстрактима плодова у одређеним концентрацијама.

3.2.9.4. Тест вијабилности/цитотоксичности

Да би се испитао ефекат екстраката на вијабилност ћелија, ћелије из коришћене ћелијске линије су након постизања 80% конфлуентности одлепљене 0,25% раствором трипсин-ЕДТА, испране у свежем комплетном медијуму, а затим центрифугиране на 1200 о/мин, током 10 минута, на температури од 4 °С. После бројања ћелија на хемцитометријској коморици по *Malasez*-у у раствору трипан плавог и подешавања њихове густине у комплетном медијуму (процедуре су претходно објашњене), ћелије су посађене у стерилне плоче са 96 бунарчића у густини од 2×10^4 ћелија у 100 μ l комплетног медијума по бунарчићу.

По завршетку 24 h култивисања ћелија у инкубатору у стандардним условима (атмосфера са 5% CO₂, zasiћена влажношћу, на 37 °С), из бунарчића са ћелијама је извађен медијум, а додато је по 100 μ l испитиваних екстраката у одговарајућим концентрацијама. Контролу су чиниле ћелије инкубиране само у комплетном медијуму, без додавања испитиваних екстраката. Ефекат испитиваних екстраката на ћелије је одређиван применом МТТ теста након инкубације од 24 h.

3.2.9.5. МТТ тест

Тест се заснива на редукцији жуте тетразолијумске соли МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) у љубичасте кристале формаза (нерастворних у води) помоћу митохондријалних дехидрогеназа вијабилних и метаболички активних ћелија. Медијум у којем су се инкубирале ћелије (са различитим концентрацијама испитиваних екстраката и контролним медијумом) је извучен из бунарчића по завршетку инкубације. Ћелије су испране са 100 μ l раствора пуфера (PBS), а затим је у сваки бунарчић додато по 100 μ l МТТ раствора концентрације 1 mg/ml. Након завршетка инкубације ћелија са МТТ раствором на температури од 37 °С, у трајању од 2 h, формиран кристали формаза су растворени додавањем 100 μ l 2-пропанола. Интензитет љубичасте боје добијених раствора се одређивао спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на 540 nm помоћу Elisa читача. Измерена апсорбанца је била у директној корелацији са бројем вијабилних ћелија и њиховом метаболичком активношћу. Резултати су приказани као степен вијабилности ћелија (изражен у процентима) у односу на контролну културу ћелија (негативна

контрола), за коју је узета вредност вијабилности ћелија од 100%. Процент вијабилности ћелија је израчунаван применом следеће једначине:

$$\text{Вијабилност ћелија (\%)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

где A_{sample} представља средњу вредност апсорбанце у узорцима са испитиваним концентрацијама екстракта, а A_{control} представља средњу вредност апсорбанце негативне контроле.

Квантитативне промене вијабилности ћелија описивале су се као следећи ефекти: нецитотоксични (више од 90% вијабилних ћелија у односу на негативну контролу), благо цитотоксични (60–90% вијабилних ћелија), умерено цитотоксични (30–60% вијабилних ћелија) и озбиљно цитотоксични (мање од 30% вијабилних ћелија).

3.2.9. Статистичка анализа

Резултати карактеризације плодова и екстракта, анализе садржаја полифенолних једињења, антиоксидативне и антитирозиназне активности екстракта приказани су као средња вредност \pm стандардна девијација (енг. *standard deviation* – SD), за три независна понављања. Резултати који се односе на карактеризацију плодова и израђених екстракта и на вредности садржаја полифенолних једињења у испитиваним екстрактима плодова анализирани су применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, као *post hoc* тест, са статистичком значајношћу од $p < 0,05$. Коефицијенти регресионе праве и коефицијенти корелације добијени су применом регресионе и корелационе анализе добијених података.

Вредности садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у испитиваним екстрактима плодова поређени су у односу на примењени растварач и биљну врсту применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, као *post hoc* тест, са статистичком значајношћу од $p < 0,05$.

Резултати антиоксидативне и антитирозиназне активности екстракта, поређени су међусобно применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, као *post hoc* тест, са статистичком значајношћу од $p < 0,05$. Анализа главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis* – PCA) примењена је у циљу

анализирања корелације између садржаја активних принципа и антиоксидативне активности екстраката испитиваних плодова и сумирања добијених резултата.

У тесту испитивања вијабилности на култури ћелија, свака концентрација испитиваних екстраката и комплетног медијума у контроли је испитивана у тетрапликату из којег је рачуната аритметичка средина. Резултати МТТ теста су представљени као проценат вијабилности ћелија у односу на контролну ћелијску културу (за коју је узето да је вијабилност 100%). Постојање статистички значајне разлике у ефектима испитиваних екстраката плодова са различитим растварачима анализирано је применом једнофакторске ANOVA анализе, након чега је рађен Tukey's тест ($p < 0,05$). Статистичка обрада података рађена је употребом програмског пакета SPSS Statistics 25.0.

ДРУГА ФАЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

3.2.10. Екстракција масних уља из плодова

3.2.10.1. Екстракција масних уља из плодова применом Soxhlet технике екстракције

3.2.10.1.1. Припрема узорака за екстракцију

Свежи плодови су механички уситњени, а затим сушени у сушници (FD 23, Binder, Немачка) на контролисаној температури од 40 °C, до постизања константне масе. Да би се постигао већи принос изолованог масног уља из плодова, осушени плодови су пре екстракције изложени повишеном притиску, у статичким условима. Плодови су прво стављени у екстрактор, који представља централни део лабораторијског постројења Autoclave Engineers (САД), у коме се врши наткритична екстракција. Затим се у систем уводи гас угљеник(IV)-оксид (CO₂) док се не достигне притисак од 10 МПа. Систем се загрева на температури од 40 °C. У овим условима CO₂ се налази у наткритичном стању, пошто за CO₂ критични притисак и температура имају вредности од 7,386 МПа и 31,08 °C. Када су постигнуте дефинисане вредности притиска и температуре, систем је у овим контролисаним условима био током 2 h, а после тога је извршена декомпресија.

3.2.10.1.2. Поступак извођења Soxhlet екстракције

Чврсто-течна екстракција испитиваних плодова органским растварачем изведена је на апаратури по Soxhlet-у са петролетром. Апаратура за Soxhlet екстракцију се састоји из балона, екстрактора (у којем се током екстракције налази чахура са узорком за екстракцију) и кондензатора. Екстракција је вршена тако што је тачно одмерена количина биљног материјала, који је припремљен на претходно описан начин, стављена у чахуру од филтер папира, која је затворена ватом и постављена у екстрактор. Екстрактор је потом спојен са остатком апаратуре. Балон је пре екстракције сушен у сушници (1 h на 105 °C) до константне масе, а затим је хлађен у ексикатору 45 минута и измерен. У екстрактор је затим сипан петролетар (запремина растварача не треба да буде већа од 2/3 запремине балона) и апаратура је остављена да стоји 24 h. Током екстракције, док се балон загрева на воденом купатилу, долази до дестилације петролетра из лабораторијског балона. Растварач се затим кондензује и капље на биљни материјал у екстрактору. У тренутку када петролетар испуни преливну цев у екстрактору, он се поново врати у балон, заједно са изолованим екстрактивним материјама (масним уљем). Цео процес је поновљен неколико пута, тј. екстракција је вршена до обезбојавања (неколико дана). Након завршетка екстракције, петролетар је упарен применом ротационог вакуум упаривача (тип RV 05 basic, са посудом за загревање HB4 basic, ИКА-Werke, Немачка), под сниженим притиском. Преостали садржај је затим сушен у сушници током 2 h на 30 °C, до константне масе, хлађен у ексикатору и измерен. Узорци уља су чувани у фрижидеру на 4 ± 2 °C, заштићено од светлости.

3.2.10.1.3. Одређивање приноса екстракције

Принос масног уља је изражен у процентима, као количина масног уља добијена од почетне масе биљног материјала, према следећој једначини:

$$\text{Принос екстракције (\%)} = \frac{m_a - m_b}{m_p} \times 100$$

где m_a представља масу балона са масним уљем, m_b представља масу празног балона, док m_p представља одмерену масу узорка (плодова).

3.2.10.2. Екстракција масних уља из плодова и семена – наткритична екстракција са угљеник(IV)-оксидам

Наткритична екстракција (НКЕ) је извршена у систему Autoclave Engineers SCE Screening System (САД). Рађена је НКЕ целих плодова и семена, које је претходно механички издвојено из плодова, уз примену CO_2 као наткритичног медијума. Пре екстракције биљни материјал (свежи плодови и семе) је механички уситњен и сушен у сушници (FD 23, Binder, Немачка) на контролисаној температури од 40 °С, до постизања константне масе. Коришћена апаратура је предвиђена за рад на притисцима до 45 МПа и температурама до 238 °С. Екстракциони систем функционише тако што течни CO_2 излази из боце са сифоном и прво пролази кроз криостат и хлади се у циљу спречавања његовог испаравања. Затим улази у пумпу за течности високог притиска (Milton Roy, Француска), где се може постићи максимални излазни притисак од 45 МПа. Проток CO_2 се може подешавати у опсегу од 50 ml/h до 500 ml/h. Да би се обезбедио константан проток течне фазе, глава пумпе се додатно хлади. Екстрактор се карактерише радном запремином од 150 ml. Израђен је од нерђајућег челика и поседује грејаче којима се одржава потребна температура у систему. Екстрактор се пре почетка екстракције напуни одговарајућом количином биљног материјала. Након тога се CO_2 уводи у систем и врши се његова компресија до одређене вредности притиска, на одређеној температури.

НКЕ из плодова и семена рађена је на 30 МПа и 40 °С. Средњи масени проток CO_2 у свим експериментима је износио 0,40 kg/h. Континуирано протицање CO_2 кроз екстракциони систем започето је тек након што су достигнуте дефинисане вредности притиска и температуре. Након изласка из екстрактора, наткритични CO_2 са раствореним екстрактом улази у сепаратор (стаклена епрувета) у којем смањењем притиска долази до одвајања растварача од екстракта (масног уља). Затим је CO_2 испуштен из екстракционог система у атмосферу, а његова потрошена маса је мерена помоћу ваге на којој се налазила боца.

3.2.10.2.1. Одређивање приноса екстракције

Принос екстракције, изражен у процентима (% m/m), израчунаван је према следећој једначини:

$$\text{Принос екстракције (\%)} = \frac{m_e}{m_f} \times 100$$

при чему је m_e маса издвојеног екстракта (масног уља), а m_f почетна маса биљног материјала (плодова/семена).

3.2.11. Дериватизација узорка масних уља

У случају анализе садржаја масних киселина, рађено је метиловање естара масних киселина како би се извршила њихова квалитативна и квантитативна анализа у масним уљима добијеним наткритичном екстракцијом.

За припрему узорка масних уља, тј. превођење масних киселина у метил естре, енг. *Fatty Acid Methyl Esters* (FAME), коришћена је процедура АОАС 965.49 (АОАС, 1998), са одређеним изменама. У сув балон од 500 ml измерено је 45–55 mg узорка масног уља и додато је 60 ml смеше метанол–сумпорна киселина (2 ml сумпорне киселине је растворено у 125 ml метанола). На балон је постављен усправни Либигов хладњак и смеша је пажљиво загревана током 2 h (тако да смеша умерено кључа). Синтеза метил естара масних киселина је рађена у дигестору.

Након завршетка реакције, балон се хладио у смеси воде и леда. Раствор из балона је пребачен у левак за одвајање, где је додато 100 ml петролетра и 50 ml воде и све је добро промућкано. Смеси је додато неколико капи индикатора метил црвено у циљу добијања јасне границе између доњег, воденог слоја и горњег, органског слоја. Водени слој је одбачен, а преосталом горњем слоју је додато 50 ml воде, неколико капи индикатора метил-црвено и смеша је добро промућкана. Доњи, водени слој је одбачен, а горњи слој је пребачен у сув ерленмајер и сушен анхидрованим Na_2SO_4 током 20 минута.

Осушени раствор је пажљиво филтриран да би се одстранило средство за сушење, пребачен у сув и чист ерленмајер, добро затворен шлифованим затварачем, умотан у алуминијумску фолију и стављен у фрижидер. Затим је у чист балон сипан охлађени

раствор из фрижидера и растварач је упараван на вакуум упаривачу. Добијени екстракт који није упарен до сува је одмераван и растваран у метилен-хлориду и тако припремљени узорци су даље анализирани применом гасне хроматографије.

3.2.12. Анализа садржаја добијених масних уља применом техника гасне хроматографије (GC-FID и GC-MS)

3.2.12.1. Гасна хроматографија (GC-FID)

Анализа узорака гасном хроматографијом (енг. *Gas Chromatography* – GC) рађена је на гасном хроматографу HP 5890 Series II (Hewlett-Packard, Waldbronn, Немачка) са пламено-јонизујућим детектором (енг. *Flame Ionization Detector* – FID), опремљеном тзв. *split-splitless* инјектором и аутоматским семплером повезаним са HP-5 колоном (25 m x 0,32 mm, дебљине филма 0,52 μm). Коришћен је водоник као носећи гас, а његов проток је износио 1 ml/min, у *split* режиму 1:30. Температура инјектора је била 250 °C, температура детектора 300 °C, док је температура колоне била линеарно програмирана у температурном режиму од 40 °C до 260 °C (брзина раста је била 4 °C/min), а затим изотермно одржавана константном на 260 °C у току 10 минута. Након достизања задатих услова, раствори узорака у метилен-хлориду су сукцесивно инјектовани у запремини од 1 μl . Квантитативна анализа је рађена на основу процената површине пикова за сваку компоненту добијених са одоварајућих хроматограма поступком интеграљења.

3.2.12.2. Гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS)

Слични аналитички услови су коришћени и у GC-MS (енг. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) анализи. Анализа је рађена на HP G 1800C Series II GCD аналитичком систему (Hewlett-Packard, Palo Alto, САД), применом колоне HP-5MS (30 m x 0,25 mm, дебљине филма 0,25 μm). Као носећи гас у овој анализи коришћен је хелијум, а температура трансфер линије је била 260 °C. Масени спектри су снимани у EI облику (70 eV), у m/z опсегу 40–450. Раствори узорака у метилен-хлориду инјектовани су у запремини од 0,2 μl . Појединачне компоненте узорака идентификоване су поређењем њихових масених спектра и ретенционих индекса са

подацима из база масених спектра (Wiley 275 и NIST/NBS) и употребом Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS 2.1) софтвера, као и на основу података из литературе (Adams, 2007).

3.2.13. Статистичка анализа

Резултати анализе садржаја масних уља у плодовима и семену, након СЕ и НКЕ приказани су као средња вредност \pm SD. Експерименти су рађени у три понављања. Добијене вредности садржаја масних уља у плодовима и семену поређени су у односу на биљну врсту и методу екстракције (следећи позитиван тест нормалности) применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, *post hoc* тест, са статистичком значајношћу од $p < 0,05$. Код узорака који нису показали нормалну расподелу, рађени су непараметарски тестови, Kruskal-Wallis-ов и Mann-Whitney-ов тест. Вредности укупних садржаја незасићених и засићених масних киселина у испитиваним масним уљима плодова и семена добијених GC-FID и GC-MS методама, поређени су применом ANOVA анализе, након чега је рађен Tukey's тест, као *post hoc* тест, са статистичком значајношћу од $p < 0,05$. Статистичка обрада података рађена је употребом програмског пакета SPSS Statistics 25.0.

ТРЕЋА ФАЗА ЕКПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

3.2.14. Формулација, израда и испитивање липофилних кремава

3.2.14.1. Формулација и израда испитиваних липофилних кремава

Опрема: пропелерска лабораторијска мешалица (RW16 basic, IKA-Werke, Немачка); магнетна мешалица са грејачем (ARE Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Италија); лабораторијски хомогенизатор (T18 basic Ultra-Turrax[®], IKA-Werke, Немачка).

Након разматрања литературе и на основу доступних података произвођача сировина формулисани су липофилни кремове са различитим комбинацијама активних супстанци. Емулзије су стабилисане применом нејонског емулгатора Abil[®] WE 09

(смеша полиглицерил-4 изостеарата, цетил ПЕГ/ППГ-10-1 диметикона и хексил лаурата), уз додатак липофилног коемулгатора Fluidanov™ 20X (смеша октилдодеканол и октилдодецил ксилозида). Израђен је плацебо крем (PL) и активни кремови са комбинацијама воденог екстракта шипурка и различитих масних уља – са масним уљем семена зове (ACSN), шипурка (ACRC), трњине (ACPS), као и крем са комбинацијом воденог екстракта шипурка и синтетске линолне киселине (ACLA). Састави формулација израђених липофилних кремова приказани су у Табели 3.

Табела 3. Састав испитиваних липофилних кремова (% m/m)

Компонента	Формулација				
	PL	ACSN	ACRC	ACPS	ACLA
Масна фаза					
Полиглицерил-4 изостеарат, цетил ПЕГ/ППГ-10-1 диметикон и хексил лаурат	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Октилдодеканол и октилдодецил ксилозид	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Пчелињи восак	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Каприлно/капрински триглицериди	5,75	5,75	5,75	5,75	5,75
Изопропил миристат	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Активне супстанце природног/синтетског порекла					
Водени екстракт шипурка (RCWE)	-	3,50	3,50	3,50	3,50
Масно уље из семена зове	-	1,86	-	-	-
Масно уље из семена шипурка	-	-	1,35	-	-
Масно уље из семена трњине	-	-	-	2,24	-
Линолна киселина	-	-	-	-	0,815
Водена фаза					
Глицерол	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Натријумова со етилендиаминтетрасирћетне киселине, дихидрат (Na ₂ EDTAx2H ₂ O)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Натријум хлорид	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Конзерванс	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Пречишћена вода до	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Формулисана су четири узорка липофилних кремова са активним супстанцама (екстракт плодова и масна уља из семена или синтетска линолна киселина) и плацебо формулација, а сви узорци кремова су припремљени на исти начин, топло – хладним поступком. Након растварања соли Na₂EDTAx2H₂O и натријум-хлорида у пречишћеној води и додатка глицерола и конзерванса, овако припремљена водена фаза (собне температуре) је додавана у загрејану масну фазу (загрејану на 75 °C на грејној плочи магнетне мешалице). Водена фаза је додавана постепено, уз мешање пропелерском ротационом мешалицом на 500 о/мин. По додатку целокупне количине водене фазе

наставило се са мешањем на 500 о/мин током 5 минута, а затим на 1000 о/мин до хлађења крема и постизања собне температуре. По завршеном емулговању, крем се хомогенизовао 5 минута на 1500 о/мин на лабораторијском хомогенизатору. Активне компоненте (код активних липофилних крема) су инкорпориране у подлогу на температури од 35–40 °С. Након израде узорци су паковани у стаклену амбалажу, одлагани на собној температури (22 ± 1 °С), током недељу дана, а затим су подвргнути физичко-хемијским испитивањима.

3.2.14.2. Процена физичко-хемијске стабилности израђених липофилних крема у дужем временском интервалу (испитивање „*in use*“ стабилности)

Испитивање „*in use*“ стабилности се односи на дефинисање периода током којег се фармацеутски производ може користити након што се отвори, а да при томе задржи дефинисани квалитет унутар прописаних граница. Процена физичко-хемијске стабилности израђених узорака липофилних крема спроведена је применом метода које су обухватале органолептичко испитивање, мерења рН вредности и електричне проводљивости узорака, као и испитивње физичке стабилности (тест центрифугирања). Мерења ових параметара вршена су у функцији времена, 7 дана, 1, 3, 6 и 12 месеци након израде и чувања узорака на собној температури (22 ± 1 °С).

3.2.14.2.1. Органолептичка процена испитиваних крема

Органолептичке карактеристике испитиваних липофилних крема, као што су изглед, боја, мирис, сјај, конзистенција крема, хомогеност крема и појава раздвајања фаза, процењиване су визуелним посматрањем припремљених узорака (макроскопском анализом).

3.2.14.2.2. Одређивање рН вредности испитиваних крема

Мерење је изведено индиректном потенциометријском методом (Ph. Eur. 9.0, 2017; Vuleta и сар., 2012) у воденом екстракту препарата (липофилног крема). Екстракт

је припремљен тако што се узорак крема (5 g) загревао са 25 ml пречишћене воде на температури од 60 °C у току 10 минута. Након хлађења водени слој је декантован или филтриран и у њему је измерена рН вредност урањањем електроде рН метра (рН 211 Microprocessor рН Meter, Hanna Instruments, САД). Мерења су изведена на собној температури од 22 ± 1 °C. Пре почетка рада апарат је калибрисан на прописан начин употребом стандардних пуфера рН = 4,0, односно рН = 7,0.

3.2.14.2.3. Одређивање електричне проводљивости испитиваних кремава

Мерење електричне проводљивости кремава у циљу одређивања типа емулзије и праћења евентуалних промена које указују на промене параметара физичке стабилности кремава изведено је кондуктометријски, тј. директним урањањем електроде кондуктометра (CDM230 Meter Lab, Radiometer, Данска) у узорке. Мерна електрода је пре почетка рада калибрисана 0,01M раствором калијум-хлорида на собној температури (22 ± 1 °C).

3.2.14.2.4. Испитивање физичке стабилности тестом центрифугирања

Ради још детаљније процене физичке стабилности, узорци кремава су били изложени тесту центрифугирања како би се одредила њихова стабилност на ефекат гравитације. Тест центрифугирања припремљених узорака кремава изведен је помоћу лабораторијске центрифуге LC 320 (Tehtnica, Словенија), на собној температури (22 ± 1 °C). Сваки узорак је одмерен (4 g) у стаклену тест кивету од 10 ml и центрифугиран у два циклуса по 15 минута на брзини од 3000 о/мин. Након центрифугирања визуелно је посматрана евентуална појава фазне сепарације, измерена рН вредност и електрична проводљивост узорака.

3.2.14.3. Статистичка анализа

Сви добијени подаци су приказани као средње вредности три независна мерења \pm SD. На добијеним резултатима примењена је једнофакторска анализа варијансе

(ANOVA) sa *post hoc* Tukey's тестом. Промене праћених параметара у различитим временским тачкама анализиране су применом Student's t-теста. Све статистичке анализе урађене су применом SPSS Statistics 25.0 софтверског пакета, а ниво значајности био је $p < 0,05$.

3.2.15. Сензорна процена испитиваних узорака липофилних крема

Сензорна студија је рађена са циљем процене одређених сензорних атрибута испитиваних липофилних крема. У студији је учествовало двадесет женских испитаника (панелиста), старости између 20 и 36 година, а њихов одабир је извршен на основу претходног искуства у процени фармацеутских препарата за примену на кожи (редовни потрошачи истих) и њихове способности да примењују структурирану скалу и понуђене дескриптивне термине. Протокол извођења сензорне студије и процена одговарајућих атрибута били су складу са предложеним стандардима у области сензорних студија које је одредила интернационална организација ASTM (енг. *American Society for Testing and Materials*) за стандарде у овој области (ASTM Committee E 1490-03. Стандард, 2003).

Пре почетка студије, панелистима је представљен општи концепт сензорне анализе, протокол извођења студије и начин процене сензорних атрибута. Испитивани сензорни атрибути су изабрани детаљном анализом литературе, а за сваки од њих панелистима је показан начин његове процене. Коришћене дефиниције и скале, односно дескриптивни термини, за сваки од процењиваних атрибута, су представљене и објашњене панелистима. Процена атрибута је рађена у лабораторији, са одличним осветљењем и са одговарајућом константном температуром и влажношћу ваздуха. Панелисти су процењивали сензорне атрибуте узорака липофилних крема применом структуриране скале (0–5) или применом претходно дефинисаних дескриптивних термина. Опис процењиваних сензорних атрибута у различитим фазама сензорне студије дат је у Табели 4.

У студији је рађена процена 6 узорака липофилних крема од стране панелиста. Узорци крема су одмерени (по 10 g) и упаковани у идентичне пластичне кутијице које су биле означене на одговарајући начин. Процес процене сензорних атрибута се састојао из три фазе: пре апликације и током узимања узорка, током апликације узорка и након апликације узорка.

Табела 4. Опис атрибута коришћених у различитим фазама сензорне студије

Фазе субјективне процене	Атрибут	Опис
Пре апликације и током узимања узорка	Конзистенција (вискозитет)	Лакоћа истицања производа из амбалаже
	Сјај	Степен сјаја узорка у паковању (примарној амбалажи)
	Адхезија	Количина узорка која остаје на кажипрсту после кратког контакта (2 секунде) са узорком у амбалажи
	Еластичност	Степен у коме се узорак развлачи између палца и кажипрста
	Текстура	Утисак пуноће узорка када се протрља између палца и кажипрста
Током апликације узорка	Размазивост	Степен размазивости / клизавости узорка током утрљавања 2 пута кружним покретима на надланици
	Распростирање	Површина коју узорак прекрије након утрљавања 8 пута кружним покретима на надланици
	Клизање	Степен клизавости (глаткоће) узорка током утрљавања (покретима трљања узорка 5 пута између палца и кажипрста)
	Густина	Степен густине узорка током утрљавања
	Лепљивост	Степен лепљивости узорка током апликације – сила потребна да се прсти одвоје од коже)
	Осећај масноће	Степен масноће узорка током утрљавања
	Сјај	Степен у коме узорак сија током апликације на кожу
	Упијање (апсорпција)	Степен брзине упијања (апсорбовања) узорка у кожу
Након апликације узорка	Резидуална превлака	Количина резидуалне превлаке коју узорак оставља на кожи 10 минута након апликације
	Осећај масноће	Степен осећаја масноће на кожи 10 минута након апликације узорка
	Сјај	Степен сјајног изгледа коже након апликације узорка
	Осећај хлађења	Степен у коме узорци стварају осећај хлађења на кожи
	Лепљивост	Степен осећаја лепљивости коже 10 минута након апликације узорка

3.2.15.1. Статистичка анализа

Сви добијени подаци су приказани као средње вредности \pm SD. Приликом статистичке анализе резултата добијених проценом сензорних атрибута коришћена је

једнофакторска ANOVA са *post hoc* Тукеу'с тестом. Све статистичке анализе урађене су применом SPSS Statistics 25.0 софтверског пакета, а ниво значајности био је $p < 0,05$.

3.2.16. Методе за *in vivo* карактеризацију липофилних кремова – биофизичке методе

У *in vivo* студијама спроведених у оквиру ове докторске дисертације у циљу испитивања иритационог потенцијала и ефикасности липофилних кремова, мерени су следећи биофизички параметри коже и коришћени су следећи уређаји за њихово одређивање:

- сонда Corneometer[®] CM 825, за мерење влажности коже (хидратације најповршнијег слоја епидермиса *stratum corneum*-а) – SCH (енг. *Stratum Corneum Hydration*), односно електричне капацитивности коже;
- сонда Tewameter[®] TM 300 коришћена је за мерење трансепидермалног губитка воде из коже – TEWL (енг. *Transepidermal Water Loss*) након периода стабилизације уређаја у трајању од око 40 s, а узимана је вредност TEWL са најмањом стандардном девијацијом;
- сонда Sebumeter[®] SM 815, која је коришћена за мерење садржаја површинских липида коже – SSL (енг. *Skin Surface Lipids*);
- сонда Mexameter[®] MX 18, за мерење меланин индекса (MI) у циљу одређивања боје коже и еритема индекса (EI) у циљу квантификације црвенила на кожи као параметра еритема;
- сонда Skin-pH-Meter[®] PH 905, за мерење pH вредности коже.

Све наведене сонде су саставни део апарата Multi Probe Adapter System MPA[®] 9, произвођача Courage + Khazaka electronic GmbH, Немачка. Пре почетка студије све сонде су калибрисане применом одговарајућег софтвера и према процедурама произвођача. Амбијетални услови (температура и влажност ваздуха) су мерени применом сензора Ambient Condition Sensor RHT 100, који је део поменутог апарата.

Студије су изведене након добијања писменог или информативног пристанка добровољаца, у складу са Хелсиншком декларацијом и уз дозволу Етичког комитета. Током трајања студије добровољци нису користили друге производе за негу на површинама коже на којима је спроведено испитивање. Тестирање препарата за

примену на кожи најчешће се врши након његовог апликовања на воларним странама подлактица (Arsić и сар., 2012; Bazin и Fanchon, 2006). Испитаницима је наглашено да у току трајања, као ни једну седмицу пре почетка студије, не користе било каква средства за негу коже у испитиваном пределу. Пре почетка мерења у оквиру сваке *in vivo* студије добровољци су, ради адаптације на амбијеталне услове, проводили 30 минута у климатизованој просторији (температура 22 ± 1 °C, влажност ваздуха $45 \pm 5\%$) у којој су потом вршена мерења параметара у складу са публикованим смерницама и документима (Clarys и сар., 2000; du Plessis и сар., 2013; Fischer и сар., 2001; Parra и Paye, 2003; Sator и сар., 2003; Stefaniak и сар., 2013). На основу промене вредности мерених параметара може се доћи до закључка да ли узорци испољавају иритациони потенцијал и да ли доводе до одређених ефеката на кожи (Arsić и сар., 2012; Lukic и сар., 2012; Wagemaker и сар., 2017).

3.2.16.1. *In vivo* процена безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних крема на кожи здравих хуманих добровољаца

Испитивање безбедносног профила узорака липофилних крема на кожи, тј. одређивање потенцијала испитиваних крема да иритирају кожу, вршено је применом објективних неинвазивних метода, мерењем одговарајућих параметара пре и након апликације узорака на здраву кожу под оклузијом. Мерени су следећи биофизички параметри: SCH, TEWL, EI, MI, SSL и рН коже.

Протокол испитивања

У дупло слепој студији је учествовало 20 здравих добровољаца, оба пола, просечне старости $25,30 \pm 1,84$ година, без историје дерматолошких обољења, са нормалном до умерено сувом кожом. Испитивање је спроведено у месецу новембру. Испитивани су липофилни кремови са одабраним екстрактом и масним уљима (ACSN, ACRC, ACPS и ACLA), као и плацебо крем (PL), под оклузијом. Узорци (активни кремови и плацебо узорак) су наносени у количини од $0,016 \text{ g/cm}^2$ на одговарајућим местима на воларним странама подлактица (помоћу картонског лењира са исеченим отворима облика квадрата одговарајуће површине), покривени оклузивним филмом Parafilm® (American National Can. Co., Chicago, Illinois, САД), а затим памучном

самолепљивом траком Sensifix[®] (Галеника, Србија). Место на десној подлактици површине 9 cm² је остављено као нетретирана контрола под оклузијом (НКО), при чему је вршена оклузија нетретиране коже на описан начин. Једно место на подлактици леве руке истог облика и површине служило је као нетретирана контрола без оклузије (НК). Мерења наведених параметара на описаним местима вршена су базално, као и 60 минута након одстрањивања оклузије која је трајала 24 h.

3.2.16.2. *In vivo* испитивање ефикасности липофилних крема на кожи здравих хуманих добровољаца

Да би се испитала ефикасност израђених узорака липофилних крема спроведена је дуготрајна, душло слепа, *in vivo* студија, у којој су применом неинвазивних техника праћени следећи биофизички параметри: SCH, TEWL, MI, EI, SSL и рН коже.

Протокол испитивања

У студији је учествовало 20 здравих добровољаца, оба пола, просечне старости 26,10 ± 1,65 година, са нормалном до умерено сувом кожом, без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења. Испитивање је рађено у периоду новембар–децембар. Код испитаника су апликовани активни узорци липофилних крема (ACSN, ACRC, ACPS и ACLA) на воларним странама подлактица, на означеним местима облика квадрата (површине 9 cm²), применом картонског лењира. На воларној страни леве подлактице је апликован плацебо крем (PL), док је на воларној страни десне подлактице апликован регистрован (референтни) препарат са тржишта (RP), као позитивна контрола. Једно место облика квадрата остављено је као нетретирана контрола (НК).

Прво су урађена иницијална мерења, када су измерене базалне вредности испитиваних параметара, а затим су добровољцима дате инструкције да узорке крема, који су били означени налепницама различитих боја, апликују код куће два пута дневно, ујутру и увече након туширања. Узорци су требали да се апликују на означеним површинама воларних страна подлактица (узорак са налепницом одређене боје на одговарајуће место на кожи), уз примену картонског лењира, током 4 недеље.

Мерења су вршена након 7, 14 и 28 дана примене узорака крема, ујутру, пре јутарње апликације узорака. Додатно мерење је извршено 4 дана након престанка апликовања узорака крема.

3.2.16.3. Статистичка анализа

Сви добијени подаци приказани су као средња вредност \pm SD. *In vivo* мерени параметри (SCH, TEWL, MI, EI, SSL и pH) приказани су као проценат промене у односу на одговарајућу базалну вредност.

Приликом статистичке обраде података, вршена је процена и поређење безбедносног профила и ефикасности испитиваних крема на кожи испитаника. Обради свих резултата претходили су тестови испитивања нормалности расподеле и хомогености варијансе. Кад год је то било могуће (следећи позитиван тест нормалности), коришћени су одговарајући параметарски тестови. Ефекти узорака крема међусобно као и у односу на одговарајуће негативне контроле анализирани су једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's или Dunnett's тест као *post hoc* тест. Статистичке разлике у вредностима измерених параметара за исти узорак у различитим временским тачкама (базално мерење у односу на мерење након оклузије, односно базално мерење у односу на мерење након 7, 14 или 28 дана, као и 4 дана након престанка третмана) проверене су Student's t-тестом.

У случају да резултати нису показивали нормалну дистрибуцију извођени су непараметарски тестови: код поређења вредности мерених параметара између различитих узорака крема и одговарајућих негативних контрола рађени су Kruskal-Wallis-ов и Mann-Whitney-ев тест. Статистичке разлике у вредностима измерених параметара за исти узорак у различитим временским тачкама (базално мерење у односу на мерење након оклузије, односно базално мерење у односу на мерење након 7, 14 или 28 дана, или 4 дана након престанка третмана) проверене су Wilcoxon-овим тестом за упарене узорке.

Приликом статистичке обраде података *in vivo* студије процене безбедносног профила (иритационог потенцијала) и ефикасности узорака липофилних крема, ниво статистичке значајности био је $p < 0,05$. Обрада података вршена је употребом софтвера SPSS Statistics 25.0.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Идентификација циљаног профила квалитета фармацеутског производа и селекција критичних атрибута квалитета

Фармацеутски концепт QbD односи се на дизајн и развој формулације и производних процеса у циљу добијања производа дефинисаног квалитета. Главна улога овог концепта је идентификација специфичних карактеристика које дефинишу квалитет готовог производа са становишта пацијента и њихово даље превођење у критичне атрибуте које коначни лек мора да поседује да би био безбедан за употребу. У оквиру QbD концепта, нагласак је на сигурности пацијената и ефикасности производа. Квалитет фармацеутског производа је у основи повезан са његовом безбедношћу и ефикасношћу. Критични фактори се детаљно анализирају помоћу статистичких алата и процесних аналитичких технологија (енг. *Process Analytical Technology* – PAT) како би се постигли жељени резултати (Bhise и сар., 2017; Yu и Корча, 2017).

С обзиром да је главни циљ ове докторске дисертације фармацеутски развој нове формулације липофилног крема за примену на кожи, који ће садржати оптималну комбинацију екстракта и масног уља плодова (претходно дефинисаних квалитета) и користити за третман суве коже, коже са симптомима атопијског дерматитиса и оксидативних оштећења коже, есенцијално је извршити карактеризацију финалног производа. Идентификација QTTP, CQAs и CPPs је важан корак у примени концепта дизајна квалитета (QbD). Терапијска ефикасност липофилног крема зависи од терапијске индикације, пута примене, фармацеутског облика, стабилности, концентрације активних компоненти. QTTP елементи укључују многе карактеристике липофилног крема, као што су стабилност, безбедност, ефикасност, лакоћа примене и сензорне особине. Идентификација QTTP липофилног крема је приказана у Табели 5.

Табела 5. Циљани профил квалитета производа (QTPP) и критични атрибути квалитета (CQAs) у фармацеутском развоју липофилног крема са екстрактима и масним уљима плодова

QTPP	Циљ
<i>Пут примене</i>	Дермални (локално дејство на кожи)
<i>Алтернативни путеви примене</i>	Нема
<i>Фармацеутски облик</i>	Липофилни (В/У) крем са екстрактима и масним уљима плодова
<i>Стабилност</i>	Без знакова нестабилности, омогућава рок трајања готовог производа од најмање годину дана на собној температури
<i>Сензорне особине</i>	Оптималне сензорне особине које омогућавају лаку апликацију крема
<i>Комплијанса</i>	Добра прихватљивост од стране пацијената
<i>Иритациони потенцијал</i>	Нема
<i>Терапијски ефекти</i>	Повећање хидратације коже, побољшање липидног статуса коже, смањење трансепидермалног губитка воде, еритема и меланин индекса коже (ефекат избељивања коже)
<i>Терапијска индикација</i>	Сува кожа, промене на кожи у склопу атопијског дерматитиса, оксидативна оштећења коже, хиперпигментације и поремећаји синтезе меланина у кожи
<i>Примарна амбалажа</i>	Одговарајућег квалитета, да пружа заштиту препарата и обезбеди тражену стабилност
<i>Рок трајања</i>	Најмање годину дана након отварања и чувања на собној температури

Табела 5. Наставак

СQA	Циљ
<i>Изглед производа</i>	Хомоген, без грудвица (неадекватан изглед може довести до изостанка комплијансе пацијента)
<i>pH вредност</i>	4–7
<i>Електрична проводљивост</i>	< 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$
<i>Одабир методе екстракције</i>	Добијање екстракта високог квалитета са задовољавајућим приносом екстракције
<i>Одабир активних компоненти</i>	Екстракт и масно уље биљног порекла са најбољим карактеристикама
<i>Карактеристике екстракта</i>	Стандардизован на садржај полифенолних једињења и органских киселина, испољава антиоксидативну и антитирозилазну активност, не делује цитотоксично на фибробластне ћелије
<i>Карактеристике масног уља</i>	Стандардизовано на садржај линолне киселине
<i>Одабир подлоге</i>	Да буде физички и хемијски стабилна, компатибилна са кожом и активним супстанцама које се у њу инкорпорирају

Сува кожа, промене на кожи у склопу атопијског дерматитиса (пруритис, ксероза, екцем), као и оксидативна оштећења коже слободним радикалима, постали су битан здравствени проблем последњих година, услед повећаног излагања коже штетним УВ зрацима. Екстракт плодова са великим садржајем полифенолних једињења, органских киселина и витамина, који показује најбоља антиоксидативна својства у комбинацији са масним уљем (са највећим садржајем незасићених, есенцијалних масних киселина, пре свега линолне киселине), биће инкорпорирани у липофилни крем за третман претходно наведених индикација. Након дефинисања профила финалног производа, потребно је да се идентификују атрибути квалитета и параметри процеса који су критични у циљу постизања жељеног QTTP.

CQAs проистичу из QTTP. Сходно томе, Табела 5 показује CQAs који су одабрани на основу стеченог знања из претходних експеримената (преформулациона истраживања) и на основу разматрања актуелне научне литературе. Одабир биљне врсте, екстракционе методе за изоловање екстракта и масног уља из плодова (семена из плодова) и растварача за екстракцију, затим садржај полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима, антиоксидативна и антитирозилазна

активност екстраката и њихов утицај на вијабилност фибробласта, као и садржај незасићених масних киселина (пре свега линолне киселине) у масним уљима, чине основу за даљи развој липофилног крема. Ове основне карактеристике су одговорне за ефикасност липофилног крема, па су одабране као CQAs у овој студији. Екстракт са оптималним карактеристикама и одабрана масна уља биће инкорпорирани у формулисани липофилни крем који ће бити адекватно апликован на кожу испитаника, да би се испитале његове сензорне особине, безбедност и ефикасност. Параметри формулације липофилног крема (физичко-хемијске карактеристике) биће анализирани као CQAs.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА ПРВЕ ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.2. Карактеризација испитиваних плодова – одређивање садржаја влаге

Плодови различитих биљних врста су важан извор биоактивних компонената, које укључују разне врсте једињења, као што су феноли, флавоноиди, антоцијани, проантоцијанидини, фенолне киселине, танини, шећери, етарска и масна уља, каротеноиди, минерали, дијететска влакна и др. Сва ова једињења могу имати позитивне ефекте на здравље људи (антиоксидативно, антимулагено, антимикубно, антиинфламаторно деловање), па се самим тим могу користити и у превенцији многих болести (Nile и Park, 2014). Плодови се доста користе у људској исхрани, у свежем стању или у прерађеном облику. Међутим, последњих година расте примена екстраката плодова као састојака функционалне хране и дијететских суплемената, али и препарата за примену на кожи.

У оквиру ове докторске дисертације испитивани су дивљи плодови следећих биљних врста: *Prunus spinosa* L. (трњина), *Rosa canina* L. (дивља ружа), *Sambucus nigra* L. (зова) и *Sorbus aucuparia* L. (јаребика). Садржај влаге је веома важно својство које даје информације о саставу испитиваних плодова. Такође, садржај влаге утиче и на сам процес екстракције и принос уља. Наиме, плодови са високим садржајем влаге нису погодни за екстраховање уља у свежем облику, већ се требају прво осушити. Као што је приказано у Табели 6, испитивани плодови имали су висок садржај влаге (од 50,83% до 71,52%). Најмање влаге садржао је шипурак, а највећи плод јаребике. Плодови зове и трњине имали су сличан садржај влаге, без статистички значајне разлике (68,48% и

68,89%). Добијени резултати били су у складу са резултатима других истраживача (Barros и сар., 2010; Kylli и сар., 2010; Morales и сар., 2013).

Табела 6. Садржај влаге у испитиваним дивљим плодовима, изражен у процентима (g/100 g свежих плодова), као средња вредност \pm SD. Применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Tukey's тестом, показано је да се вредности означене различитим словима разликују статистички значајно ($p < 0,05$).

Биљна врста (плод)	Породица	Садржај влаге (%)
<i>P. spinosa</i>	Rosaceae	68,89 \pm 0,97 ^b
<i>R. canina</i>	Rosaceae	50,83 \pm 0,53 ^a
<i>S. nigra</i>	Adoxaceae	68,48 \pm 0,49 ^b
<i>S. aucuparia</i>	Rosaceae	71,52 \pm 0,95 ^u

4.3. Припрема екстраката плодова одабраних биљних врста

Екстракција биоактивних компонената из биљног материјала (дивљих плодова) је први важан корак у примени фитохемикалија у формулацији фармацеутског производа. Израђено је 16 различитих екстраката дивљих плодова, методом ултразвучне екстракције, применом различитих растварача за екстракцију (метанол, 70% етанол, 45% пропиленгликол и пречишћена вода). Ултразвучна екстракција се показала ефикаснијом у изоловању фармаколошки активних једињења из природних извора, у односу на конвенционалне методе екстракције, као што су најчешће коришћена метода мацерације и Soxhlet екстракција. Ултразвучна екстракција поседује и додатне предности, пре свега мањи утрошак растварача и краће време екстракције (Da Porto и сар., 2013; Vinatoru, 2001; Хи и сар., 2017). Преглед испитиваних екстраката и ефикасност ултразвучне екстракције (приноси екстракције) приказани су у Табели 7.

Познато је да принос екстракције зависи од одабране методе за екстракцију, врсте примењеног растварача (његове поларности), времена екстракције и температуре, односа узорка и растварача за екстракцију, као и хемијског састава и физичких карактеристика биљног материјала (пре свега од садржаја влаге у узорку). Најчешће се за екстракцију полифенолних једињења из биљног материјала користе поларнији растварачи, обично смеше воде и метанола или воде и етанола, при чему је метанол ефикаснији у екстракцији полифенола са мањом молекулском масом (Dai и Mumper,

2010; До и сар., 2014). Са друге стране, вода и етанол се најчешће користе за екстракцију фитохемикалија из биљака јер су нетоксични и безбедни за примену.

Табела 7. Преглед израђених ултразвучних екстраката дивљих плодова и одговарајући приноси екстракције. Приноси екстракције су представљени као средња вредност \pm SD. Применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Тукеу's тестом, показано је да се вредности означене различитим словима разликују статистички значајно ($p < 0,05$).

Редни број узорка	Скраћена ознака екстракта	Биљна врста (плод)	Растварач за екстракцију	Принос екстракције (%)
1.	PSME	<i>P. spinosa</i>	метанол	23,32 \pm 0,03 ^ж
2.	PSEE	<i>P. spinosa</i>	70% етанол	27,69 \pm 0,05 ^л
3.	PSPE	<i>P. spinosa</i>	45% пропиленгликол	31,82 \pm 0,06 ^г
4.	PSWE	<i>P. spinosa</i>	пречишћена вода	19,51 \pm 0,03 ^ј
5.	RCME	<i>R. canina</i>	метанол	14,08 \pm 0,02 ^б
6.	RCEE	<i>R. canina</i>	70% етанол	16,14 \pm 0,03 ^л
7.	RCPE	<i>R. canina</i>	45% пропиленгликол	32,48 \pm 0,06 ^б
8.	RCWE	<i>R. canina</i>	пречишћена вода	19,85 \pm 0,04 ^н
9.	SNME	<i>S. nigra</i>	метанол	12,37 \pm 0,01 ^м
10.	SNEE	<i>S. nigra</i>	70% етанол	16,27 \pm 0,03 ^к
11.	SNPE	<i>S. nigra</i>	45% пропиленгликол	32,24 \pm 0,05 ^б
12.	SNWE	<i>S. nigra</i>	пречишћена вода	12,46 \pm 0,01 ^м
13.	SAME	<i>S. aucuparia</i>	метанол	26,73 \pm 0,03 ^б
14.	SAEE	<i>S. aucuparia</i>	70% етанол	25,13 \pm 0,04 ^с
15.	SAPE	<i>S. aucuparia</i>	45% пропиленгликол	33,11 \pm 0,06 ^а
16.	SAWE	<i>S. aucuparia</i>	пречишћена вода	21,19 \pm 0,03 ^з

Највећи приноси екстракције били су код екстраката плодова израђених са 45% пропиленгликолом као растварачем за екстракцију, чије су се вредности статистички значајно разликовале у односу на врсту плода и биле у опсегу од 31,82% до 33,11% . Највећи принос екстракције је био код екстракта плода јаребике са 45%

пропиленгликолом (33,11%), а најмањи приликом екстракције плода зове са метанолом (12,37%). Екстракти са метанолом као растварачем за екстракцију дали су најмањи принос екстракције код шипурка и плодова зове, док су код плодова трњине и јаребике то били водени екстракти. Капацитет воде за екстракцију је био најмањи код плодова зове. Сматра се да нека једињења која не спадају у групу полифенола имају бољу растворљивост у води и метанолу (Do и сар., 2014). Сходно томе, већи приноси екстракције код плодова јаребике са овим растварачима могу се објаснити присуством ових једињења у већој концентрацији у односу на остале врсте плодова.

4.4. Физичко-хемијска *in vitro* карактеризација екстраката плодова

Физичко-хемијска карактеризација је битна за евалуацију квалитета израђених екстраката, са аспекта њихове стандардизоване производње и потенцијалне примене у фармацеутској индустрији. Одређивање физичко-хемијских карактеристика добијених течних екстраката плодова обухватало је мерење рН вредности екстраката, индекса рефракције (енг. *refractive index* – RI) и релативне густине (енг. *relative density* – RD). Резултати мерења ових параметара приказани су у Табели 8.

Као што се може видети на основу добијених резултата, одабир растварача за екстракцију утиче на вредности измерених физичко-хемијских параметара. Метанолни екстракти свих плодова имали су највеће рН вредности (у распону од 6,42 до 8,09), за разлику од екстраката са водом који су били најкиселији (са рН вредностима од 3,69 до 4,29). Биљна врста је такође утицала на измерене рН вредности екстраката. Најмање рН вредности су добијене, тј. најкиселији су били екстракти шипурка, док су код екстраката плодова зове измерене највише вредности за рН (чак до 8,09 код метанолног екстракта плода зове). Измерене рН вредности екстраката плодова трњине, шипурка и јаребике са 70% етанолом се нису статистички значајно разликовале. Сличан тренд је био између рН вредности екстраката шипурка и јаребике израђених са 45% пропиленгликолом.

Табела 8. Вредности физичко-хемијских параметара испитиваних екстраката плодова, представљени као средња вредност \pm SD. У свакој колони различита слова означавају постојање статистичке значајне разлике између узорака ($p < 0,05$), показане на основу резултата једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Тукеу'с тестом.

Екстракт	pH вредност	Индекс рефракције (RI)	Релативна густина (RD) g/ml
PSME	6,79 \pm 0,03 ^б	1,336 \pm 0,004 ^Б	0,830 \pm 0,036 ^Б
PSEE	5,24 \pm 0,04 ^д	1,362 \pm 0,003 ^б	0,943 \pm 0,042 ^б
PSPE	4,86 \pm 0,01 ^б	1,383 \pm 0,002 ^а	1,037 \pm 0,022 ^а
PSWE	4,08 \pm 0,03 ^з	1,340 \pm 0,001 ^Б	1,013 \pm 0,027 ^{а,б}
RCME	6,46 \pm 0,04 ^Б	1,334 \pm 0,009 ^Б	0,816 \pm 0,029 ^Б
RCEE	5,32 \pm 0,03 ^д	1,363 \pm 0,004 ^б	0,897 \pm 0,025 ^{б,Б}
RCPE	4,65 \pm 0,01 ^е	1,386 \pm 0,006 ^а	1,045 \pm 0,030 ^а
RCWE	3,69 \pm 0,03 ^ј	1,338 \pm 0,004 ^Б	1,016 \pm 0,017 ^{а,б}
SNME	8,09 \pm 0,02 ^а	1,333 \pm 0,004 ^Б	0,845 \pm 0,010 ^Б
SNEE	6,78 \pm 0,01 ^б	1,361 \pm 0,004 ^б	0,951 \pm 0,013 ^б
SNPE	5,96 \pm 0,01 ^г	1,375 \pm 0,003 ^{а,б}	1,048 \pm 0,012 ^а
SNWE	4,29 \pm 0,03 ^ж	1,335 \pm 0,005 ^Б	1,001 \pm 0,007 ^{а,б}
SAME	6,42 \pm 0,04 ^Б	1,337 \pm 0,012 ^Б	0,843 \pm 0,037 ^Б
SAEE	5,29 \pm 0,03 ^д	1,364 \pm 0,005 ^б	0,910 \pm 0,029 ^{б,Б}
SAPE	4,63 \pm 0,02 ^е	1,381 \pm 0,004 ^а	1,057 \pm 0,022 ^а
SAWE	3,87 \pm 0,04 ^и	1,339 \pm 0,008 ^Б	1,002 \pm 0,037 ^{а,б}

Што се тиче индекса рефракције и релативне густине, измерене вредности су биле у складу са очекиваним вредностима параметара који се односе на коришћене раствараче за екстракцију. Утицај растварача на вредности ова два параметра је потврђен, док врста плода није имала утицај на вредности истих. Екстракти са 45% пропиленгликолом имали су највеће вредности индекса рефракције (у опсегу вредности од 1,375 до 1,386), као и највећу релативну густину (од 1,037 g/ml до 1,057 g/ml), као последица примене 45% пропиленгликола у екстракцији. Са друге стране,

најмање вредности ових параметара измерене су код метанолних екстраката плодова. Индекси рефракције код метанолних и водених екстраката имали су сличне вредности, које се нису статистички значајно разликовале.

4.5. Анализа садржаја полифенолних једињења у испитиваним екстрактима плодова *in vitro* методама

Полифенолним једињењима из плодова се приписује велики број позитивних ефеката на људско здравље, што доводи до повећане употребе плодова у превенцији и контроли многих болести и поремећаја, узрокованих штетним ефектима слободних радикала који воде ка развоју хроничних болести повезаних са старењем (Nile и Park, 2014). Показано је да врста растварача за екстракцију значајно утиче на концентрацију изолованих полифенолних једињења из биљног материјала, а самим тим и на антиоксидативну активност добијених екстраката (Turkmen и сар., 2006).

Анализа садржаја полифенолних једињења у испитиваним екстрактима дивљих плодова обухватала је одређивање садржаја укупних фенола, флавоноида, танина, проантоцијанидина и антоцијана. Резултати испитивања садржаја полифенолних једињења приказани су у Табели 9. У зависности од биљног материјала и растварача за екстракцију, добијени екстракти су показали различит садржај полифенолних једињења. Као најбољи растварач за изоловање полифенолних једињења из плодова показала се вода, а затим 45% пропиленгликол и 70% етанол. Водени екстракти имали су већи садржај флавоноида (2,07–14,14 mg RE/g) и проантоцијанидина (5,29–54,81 mg CE/g) у односу на друге раствараче. Као добар растварач за екстракцију антоцијана показао се 45% пропиленгликол (386,75–1993,03 mg CG/100 g), а 70% етанол за екстракцију фенола (4,62–112,34 mg GAE/g) и танина (0,27–2,73%). Екстракција метанолом дала је просечне садржаје анализираних група полифенола. Метанол је био ефикасан у изолацији антоцијана из плодова зове, где је њихова концентрација била доста висока (1095,75 mg CG/100 g). Са друге стране, у односу на испитивану врсту плодова, шипурак и плодови зове се издвајају по већем садржају полифенолних једињења у поређењу са плодовима трњине и јаребике. Екстракти шипурка су садржали највећу концентрацију танина (просечан садржај у екстрактима је био 1,97%) и проантоцијанидина (са просечним садржајем од 30,14 mg CE/g), док су екстракти плодова зове имали највећи садржај фенола (просечни садржај од 82,95 mg GAE/g) и

флавоноида (8,52 mg RE/g). Плодови зове и трњине су показали већи садржај антоцијана у односу на остале плодове (просечан садржај у екстрактима зове је био највећи – 1279,99 mg CG/100 g), што потврђује њихову улогу као пигмената који дају овим плодовима карактеристичну интензивну боју. Висок садржај антоцијана у плодовима трњине је потврђен и од стране других истраживача (Espín и сар., 2000).

Табела 9. Укупан садржај одређених група полифенолних једињења: фенола (TPC), флавоноида (TFC), танина (TTC), проантоцијанидина (TPAC) и антоцијана (TAC) у испитиваним екстрактима плодова. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD, у односу на масу сувог екстракта (dw). У свакој колони различита слова означавају постојање статистичке значајне разлике између узорака ($p < 0,05$), показане на основу резултата једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Тукеу's тестом. GAE – еквивалент галне киселине; RE – еквивалент рутина; CE – еквивалент катехина; CG – цијанидин-3-О-глукозид хлорид.

Екстракт	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg RE/g)	TTC (%)	TPAC (mg CE/g)	TAC (mg CG/100 g)
PSME	5,54 \pm 1,85 ³	0,50 \pm 0,03 ^k	0,16 \pm 0,02 ^b	12,86 \pm 0,87 ^ж	347,87 \pm 35,85 ^{h,c}
PSEE	4,62 \pm 1,60 ³	2,03 \pm 0,05 ³	0,27 \pm 0,05 ^b	22,10 \pm 0,41 ^г	197,26 \pm 43,80 ^ж
PSPE	18,16 \pm 1,41 ^ж	2,62 \pm 0,06 ^ж	0,23 \pm 0,02 ^b	6,81 \pm 0,16 ^и	413,06 \pm 53,32 ^{h,c}
PSWE	15,08 \pm 1,92 ^ж	3,29 \pm 0,08 ^c	0,11 \pm 0,01 ^b	5,29 \pm 0,14 ^и	517,23 \pm 59,88 ^д
RCME	76,33 \pm 1,69 ^г	0,79 \pm 0,05 ^ј	1,14 \pm 0,02 ^в	13,38 \pm 0,44 ^ж	276,71 \pm 8,93 ^{h,ж}
RCEE	45,86 \pm 1,31 ^h	1,84 \pm 0,04 ^{3,и}	2,73 \pm 0,03 ^а	31,95 \pm 0,84 ^в	350,59 \pm 12,10 ^{h,c}
RCPE	85,87 \pm 1,75 ^в	1,79 \pm 0,05 ^и	2,04 \pm 0,07 ^б	20,43 \pm 0,57 ^д	404,29 \pm 14,60 ^c
RCWE	101,57 \pm 2,04 ^б	2,07 \pm 0,03 ³	1,98 \pm 0,01 ^б	54,81 \pm 0,82 ^а	411,72 \pm 17,88 ^{h,c}
SNME	82,18 \pm 1,78 ^в	5,97 \pm 0,06 ^д	0,19 \pm 0,01 ^h	21,95 \pm 0,70 ^{г,д}	1095,75 \pm 26,43 ^в
SNEE	112,34 \pm 2,32 ^а	7,35 \pm 0,05 ^б	0,74 \pm 0,02 ^г	13,67 \pm 0,44 ^{е,ж}	760,97 \pm 35,39 ^г
SNPE	51,71 \pm 1,37 ^д	6,61 \pm 0,05 ^в	0,16 \pm 0,01 ^h	22,71 \pm 0,38 ^г	1993,03 \pm 50,67 ^а
SNWE	85,56 \pm 1,49 ^в	14,14 \pm 0,18 ^а	0,82 \pm 0,03 ^г	48,71 \pm 0,57 ^б	1270,20 \pm 34,33 ^б
SAME	8,93 \pm 1,56 ³	5,48 \pm 0,07 ^h	0,42 \pm 0,02 ^д	17,57 \pm 0,71 ^h	352,65 \pm 20,41 ^{h,c}
SAEE	38,78 \pm 1,94 ^c	6,23 \pm 0,05 ^г	0,44 \pm 0,07 ^д	15,29 \pm 0,29 ^c	140,09 \pm 17,51 ^ж
SAPE	48,94 \pm 2,44 ^{д,h}	3,27 \pm 0,04 ^c	0,46 \pm 0,06 ^д	19,05 \pm 0,30 ^{д,h}	386,75 \pm 14,82 ^{h,c}
SAWE	22,16 \pm 1,89 ^ж	3,32 \pm 0,03 ^c	0,20 \pm 0,03 ^h	8,52 \pm 0,22 ³	286,48 \pm 20,39 ^{h,ж}

Полифенолна једињења се у плодовима могу наћи у растворљивој, слободној форми или везани у комплексе са другим једињењима (процењује се око 25% од укупне количине полифенола може бити везано за угљене хидрате или протеине), са различитим структурама, као једноставни (нпр. антоцијани) или високо полимеризовани молекули (нпр. танини), тако да ова хетерогеност утиче на коначан резултат анализа за одређивање садржаја ових једињења (Dai и Mumpert, 2010; Sun и сар., 2002).

Садржај укупних фенола у испитиваним екстрактима био је у распону од 4,62 mg GAE/g до 112,34 mg GAE/g. Највећи садржај укупних фенола имао је 70% етанолни екстракт плодова зове. Затим следе водени и 45% пропиленгликолни екстракти шипурка (са вредностима од 101,57 mg GAE/g и 85,87 mg GAE/g). Различити растварачи су изоловали различите концентрације фенола из испитиваних плодова. Тако је 45% пропиленгликол екстраховао највише фенола из плодова трњине и јаребике, код шипурка растварач избора је била вода, а код плодова зове 70% етанол. Претпоставља се да је узрок ових варијација постојање великог броја органских интерферирајућих супстанци у екстрактима (шећери, ароматични амини, аскорбинска киселина, органске киселине, протеини, аминокиселине), које поред фенолних једињења реагују са FC реагенсом. Такође, нека неорганска једињења учествују у овој реакцији и доприносе привидно већој концентрацији укупних фенола (Prior и сар., 2005). Пошто су плодови заправо смеше великог броја различитих једињења, која доприносе садржају укупних фенола, очекивано је да ТРС вредности буду различите између различитих плодова и њихових екстраката. Упркос овој неспецифичности, ТРС анализа је примењена у циљу евалуације садржаја великог броја фенолних једињења, као биоактивних супстанци присутних у екстрактима плодова, који доприносе антиоксидативној и биолошкој активности испитиваних екстраката.

У литератури постоје различите вредности за садржај полифенолних једињења у испитиваним плодовима, услед различитих процедура екстракције, порекла биљног материјала, разлика у степену зрелости плодова, итд. Резултати претходних истраживања дају ниже ТРС вредности за плодове трњине, у опсегу од 1,34 mg GAE/g до 4,73 mg GAE/g свеже материје (Ganhão и сар., 2010; Jabłońska-Ryś и сар., 2009). Ganhão и сар. (2010) су пронашли веће ТРС вредности у воденим, у односу на етанолне и метанолне екстракте плодова трњине и шипурка, што је у складу са приказаним резултатима да поларнији растварачи екстрахују веће количине фенола из плодова. У студијама других истраживача добијене су ТРС вредности за екстракте шипурка у

опсегу од 12,5 mg GAE/g до 96,0 mg GAE/g (Ercisli, 2007; Kähkönen и сар., 1999), што се слаже са резултатима из ове дисертације.

Mikulic-Petkovsek и сар. (2016б) показали су да екстракт зове, добијен ултразвучном екстракцијом плодова мешавином метанола и 3% (v/v) мравље киселине садржи укупне феноле у количини од 6,83 mg GAE/g свежег материјала, што је доста мање у поређењу са резултатима из ове дисертације. Duymuş и сар. (2014) испитивали су састав екстраката плодова зове добијених методом мацерације и ултразвучне екстракције са различитим растварачима и одређивали садржај укупних фенола. Добијени садржај укупних фенола је био следећи: у воденим екстрактима (мацерација) 89,74 mg GAE/g dw, у 70% етанолним (мацерација) 75,94 mg GAE/g dw, метанолним (мацерација) 49,17 mg GAE/g dw и метанолним са 0,1% HCl (ултразвучна екстракција) 63,99 mg GAE/g dw (вредности приближне или мање у односу на вредности из ове дисертације). TPC вредности за плодове јаребике се у литератури крећу у границама од 8,62 mg GAE/g до 26,8 mg GAE/g (Kähkönen и сар., 1999; Olszewska и Michel, 2009; Šavikin и сар., 2017).

Екстракти плодова зове показали су веће концентрације флавоноида у односу на остале плодове. Највећи садржај флавоноида био је у воденом екстракту плодова зове (14,14 mg RE/g), док је у метанолном екстракту плодова трњине измерена најнижа концентрација флавоноида (0,50 mg RE/g). Сличне концентрације флавоноида (без статистички значајне разлике) имали су 70% етанолни екстракти плодова трњине и шипурка, као и водени екстракти плодова трњине и јаребике. Према истраживању које су радили Velickovic и сар. (2016), вредност TFC у воденим екстрактима трњине из Југоисточне Србије је био 0,42 mg кверцетина/g свежје материје, а у етанолним 0,70 mg кверцетина/g свежје материје, док су Barros и сар. (2010) у метанолним екстрактима трњине из Португалије одредили вредност TFC од 8,68 mg/g. Други истраживачи су забележили мањи садржај флавоноида у екстрактима шипурка (Nađpal и сар., 2016), али и мањи садржај флавоноида у плодовима јаребике (Kylli и сар., 2010; Olszewska и Michel, 2009), у поређењу са резултатима TFC теста из приказане дисертације. Показано је да се садржај флавоноида у плодовима мења у зависности од времена брања плодова, климатских фактора и степена зрелости плодова (Elmastaş и сар., 2017).

Садржај танина у испитиваним екстрактима кретао се у распону од 0,11% (PSWE) до 2,73% (RCSE). Висок садржај танина био је у екстрактима RCPE и RCWE, чије се TPC вредности нису статистички значајно разликовале. Растварачи метанол, 70% етанол и 45% пропиленгликол екстраховали су сличне концентрације танина из

плодова јаребике, са изостанком статистички значајне разлике између добијених вредности. Слична ситуација је била код 45% пропиленгликолних и водених екстраката шипурка.

Више од 10 пута већа концентрација проантоцијанидина била је у воденом екстракту шипурка (54,81 mg CE/g) у односу на водени екстракт плодова трњине где је ТРАС био најнижи (5,29 mg CE/g). Метанол је екстраховао сличне концентрације проантоцијанидина из плодова трњине и шипурка, док су 70% етанолни екстракти плодова зове и јаребике имали сличан садржај ове групе полифенолних једињења. Подаци у литератури везани за ТТС и ТРАС у испитиваним екстрактима су веома оскудни. Претходне студије су се углавном бавиле испитивањем садржаја елагитанина у плодовима (Fecka, 2009; Ganhão и сар., 2010). С друге стране, Mikulic-Petkovsek и сар. (2017) су показали веома низак ТТС у екстрактима плодова култивисаних врста јаребике, у односу на дивље плодове описане у овом раду. Према подацима из научне литературе, екстракти плодова трњине (без семена) садржали су 5,88 mg/g проантоцијанидина, али екстракти су добијени другачијим поступком екстракције и коришћен је другачији метод анализе ове групе једињења (Ganhão и сар., 2010). Узимајући у обзир припрему екстраката и описану методологију, презентовани резултати показују већи садржај укупних проантоцијанидина у шипурку и плодовима јаребике у поређењу са резултатима доступним у научној литератури (Ganhão и сар., 2010; Olszewska и Michel, 2009).

Плод зове екстрахован применом 45% пропиленгликола, показао је највећи садржај антоцијана (1993,03 mg CG/100 g), који му дају карактеристичну боју. Дуумиш и сар. (2014) испитивали су састав екстраката плодова зове добијених методом мацерације и ултразвучне екстракције са различитим растварачима (вода, метанол, метанол са 0,1% HCl) у односу на садржај укупних антоцијана. Добијени резултати су били у опсегу од 408,6 mg CG/100 g dw до 1066,6 mg CG/100 g dw: у воденим екстрактима (мацерација) 878,5 mg CG/100 g dw, у 70% етанолним (мацерација) 1066,6 mg CG/100 g dw, метанолним (мацерација) 408,6 mg CG/100 g dw и метанолним са 0,1% HCl (ултразвучна екстракција) 600 mg CG/100 g dw. Осим за етанолни екстракт, резултати у овој дисертацији су већи у погледу садржаја антоцијана испитиваним у екстрактима плодова зове.

Добијени резултати за вредности ТАС у плодовима трњине су били знатно већи од оних које су добили други истраживачи из Србије, који су износили 11,0 mg цијанидин-3-О-глукозида/100 g свеже материје за етанолне и 12,0 mg цијанидин-3-О-

глукозида/100 g свеже материје за водене екстракте (Velicković и сар., 2016). С друге стране, Sikoga и сар. (2013) забележили су ТАС у метанолном екстракту трњине пореклом из Пољске од 415,04 mg/100 g, што је слично приказаним налазима. Садржај антоцијана у шипурку је био већи од садржаја којег су измерили Ganhão и сар. (2010). Поред тога, екстракти плодова јаребике садржали су неколико пута већу концентрацију антоцијана у поређењу са резултатима из научне литературе (Коропен и сар., 2007; Kylli и сар., 2010).

Многи параметри, као што су варијетети биљних врста, услови раста, степен зрелости, време бербе, транспорт, услови руковања и касније складиштења, као и припреме узорка, утичу на хемијски састав испитиваних плодова. Са друге стране, добијени резултати за анализирана полифенолна једињења у испитиваним узорцима су углавном већи од литературних, што је афирмативни резултат за њихову даљу примену.

4.6. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења, органских киселина и витамина у екстрактима испитиваних плодова

С обзиром да су испитивани екстракти комплексне смеше које садрже различите групе полифенолних једињења (феноле, флавоноиде, танине, проантоцијанидине, антоцијане), органских киселина, витамина и др., њихова активност зависи од садржаја различитих биоактивних једињења присутних у њима и њиховог синергистичког/антагонистичког дејства, па је неопходно извршити детаљну HPLC анализу да би се стекао увид у садржај појединих фитохемикалија у екстрактима.

4.6.1. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења у екстрактима испитиваних плодова

Квалитативни и квантитативни профил полифенолних једињења у испитиваним екстрактима након HPLC анализе приказан је у Табели 10. Хроматограми испитиваних екстраката са пиковима идентификованих полифенолних једињења приказани су на Слици 3. У екстрактима је идентификован велики број различитих полифенолних једињења: фенолне киселине (гална, неохлорогенска, протокатехинска, хлорогенска,

ванилинска, кафена киселина и њени деривати, сиригинска, *p*-кумарна киселина, синапинска, ферулна, елагинска киселина и њени деривати, *trans*-циметна киселина); флаван-3-оли (катехин, епикатехин); флавоноли (рутин, хиперозид, кверцетин и његови деривати, изокверцетин, тилирозид, кемферол и кемферол-3-*O*-глукозид); флавоноли (лутеолин, апигенин-7-*O*-глукозид, витексин); флаванони (нарингенин-7-*O*-глукозид); антоцијани (делфинидин-3-*O*-рутинозид, делфинидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-3-*O*-рутинозид, цијанидин-3-*O*-глукозид); проантоцијанидини (процијанидин Б2); тритерпенски сапогенини (урсолна и олеанолна киселина); кумарини (скополетин и скопарон); дихидрохалкони (флоретин), итд.

HPLC анализа је показала постојање разлика у квалитативном и квантитативном саставу испитиваних полифенолних једињења између екстраката плодова. Екстракти плодова зове и шипурка били су најбогатији полифенолним једињењима, нарочито екстракти SNPE (укупан садржај полифенолних једињења у овом екстракту износио је 2,77%), SNEE (2,36%), RCPE (1,94%) и RCWE (1,72%). Ако посматрамо садржај полифенолних једињења у односу на врсту растварача коришћеног за израду екстраката, употребљени растварачи су из различитих плодова екстраховали различите количине полифенолних једињења услед њиховог различитог састава. Тако, на пример, 45% пропиленгликол је код шипурка и плодова зове дао екстракте најбогатије овим једињењима. Код плодова трњине то је била вода (1,28% полифенолних једињења), а код плодова јаребике метанол (0,99%). Сви испитивани екстракти су садржали галну киселину, чија је концентрација била у опсегу од 16,69 mg/100 g до 296,02 mg/100 g (у екстракту RCWE). Показано је да је гална киселина моћан антиоксиданс који инхибира ћелијску пролиферацију и ћелијску смрт у ћелијској линији канцера простате (Nile и Park, 2014). Такође, катехин, неохлорогенска, хлорогенска и ферулна киселина били су присутни у свим екстрактима. Катехин је био најзаступљенији у екстрактима плодова зове (у просечној количини од 58,11 mg/100 g). Катехин делује као јак антиоксиданс и присутан је у већој количини у спољашњим ткивима плодова него у унутрашњим (Nile и Park, 2014). Епикатехин је детектован у највећој количини у екстрактима шипурка, у просечној количини од 7,76 mg/100 g. Рутин, као један од главних представника флавонола, био је најзаступљенији у екстракту SNPE. Поред тога, хиперозид и изокверцетин су били присутни код већине испитиваних екстраката. Резултати испитивања које су извршили Dawidowicz и сар. (2006) показују присуство флавонола и антоцијана у алкохолном екстракту плодова зове, а рутин је био најзаступљенији из групе флавонола.

Хлорогенска киселина је била присутна у већој концентрацији у екстрактима, са садржајем од 1,05 mg/100 g до чак 241,40 mg/100 g (екстракт PSWE). Екстракти плодова јаребике су имали висок садржај хлорогенске киселине, у просеку 141,58 mg/100 g. Guimarães и сар. (2013) су документовали висок садржај фенолних киселина у плодовима трњине, од којих је највећу заступљеност имала хлорогенска киселина, која има важну улогу у превенцији оксидативног стреса.

Ванилинска киселина је детектована само у екстрактима плодова трњине (највише у екстракту са 70% етанолом). Постојање кафене киселине (продукта хидролизе растворљиве хлорогенске киселине и њених изомера), као и њених деривата показано је у екстрактима плодова трњине и јаребике, што је у складу са резултатима претходних студија (Espín и сар., 2000; Mattila и сар., 2006).

Насупрот томе, сиригинска киселина је била присутна у екстрактима шипурка и плодова зове. Значајно већу концентрацију сиригинске киселине у односу на остале екстракте садржао је екстракт SNPE – 688,73 mg/100 g. Екстракти плодова јаребике су садржали веће концентрације неохлаорогенске, кафене киселине и *p*-кумарне киселине у односу на екстракте осталих плодова, што је у складу са другим истраживањима у којима је у плодовима јаребике нађен висок садржај фенолних киселина од 103 mg/100 g свежих плодова (Mattila и сар., 2006).

Скополетин је детектован само у екстрактима плодова трњине са 70% етанолом и водом. Скопарон и тилирозид су били заступљени једино у екстрактима шипурка са метанолом и 70% етанолом и то у врло ниским концентрацијама. Што се тиче садржаја антоцијана, могла се претпоставити њихова велика заступљеност у екстрактима плодова зове и трњине. Највеће концентрације делфинидин-3-*O*-глукозида, цијанидин-3-*O*-рутинозида и цијанидин-3-*O*-глукозида биле су у екстракту SNME, док је делфинидин-3-*O*-рутинозид детектован једино у екстракту SNWE. Висок садржај различитих једињења из групе антоцијана у дивљим плодовима зове и трњине утврђен је од стране других истраживача (Duymuş и сар., 2014; Espín и сар., 2000; Но и сар., 2017; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016a).

Посматрајући укупан садржај појединих полифенолних једињења у свим екстрактима, закључује се да су најзаступљенији били пирогалол (чија се концентрација кретала у распону од 128,24 mg/100 g до 864,55 mg/100 g), олеанолна киселина (од 63,64 mg/100 g до 857,61 mg/100 g) и гална киселина (од 16,69 mg/100 g до 296,02 mg/100 g). Поред ових једињења, доста заступљене су биле и урсолна, протокатехинска, сиригинска и хлорогенска киселина.

У складу са другим студијама, показано је присуство полифенолних једињења у екстрактима испитиваних плодова, које су такође истицале висок садржај фенолних киселина и флавоноида у плодовима (Denev и сар., 2014; Guimarães и сар., 2013; Но и сар., 2017; Kullu и сар., 2010; Tian и сар., 2017), што оправдава дугогодишњу примену ових плодова у традиционалној медицини. Важно је напоменути да директно поређење полифенолног састава различитих плодова са подацима других истраживача је углавном сложено, управо због разноликости аналитичких процедура, примене различитих растварача за екстракцију, метода екстракције, итд. Такође, климатски фактори и фактори животне средине, као и степен зрелости плодова утичу на метаболизам и конверзију полифенолних једињења, што може довести до разлика између резултата (Demir и сар., 2014).

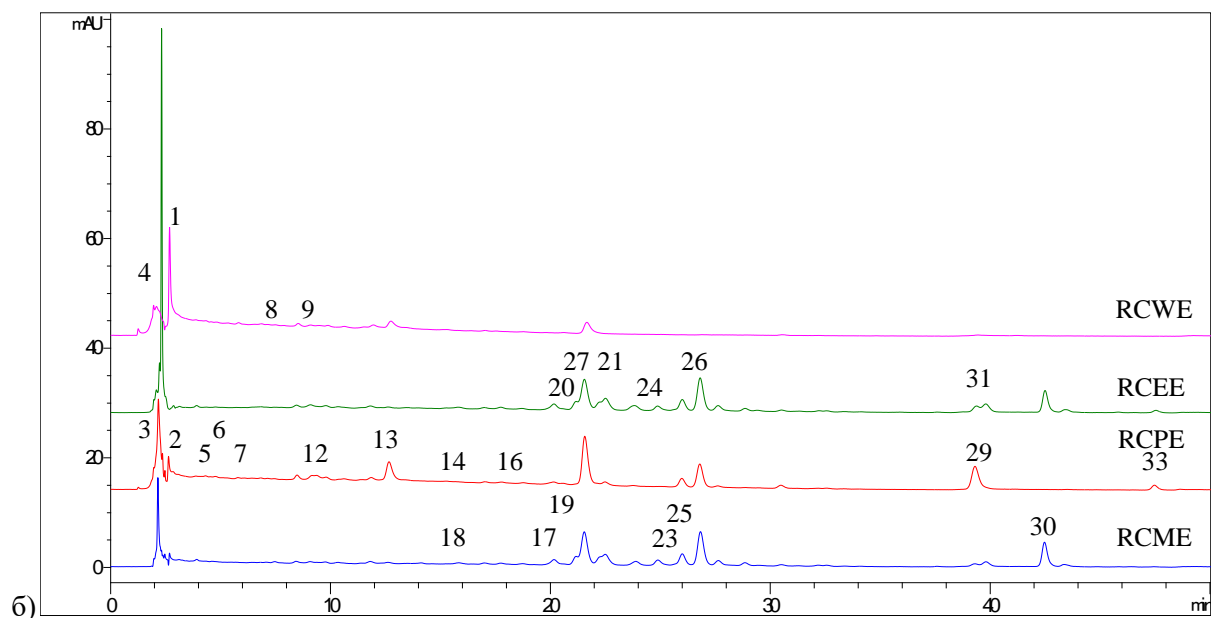
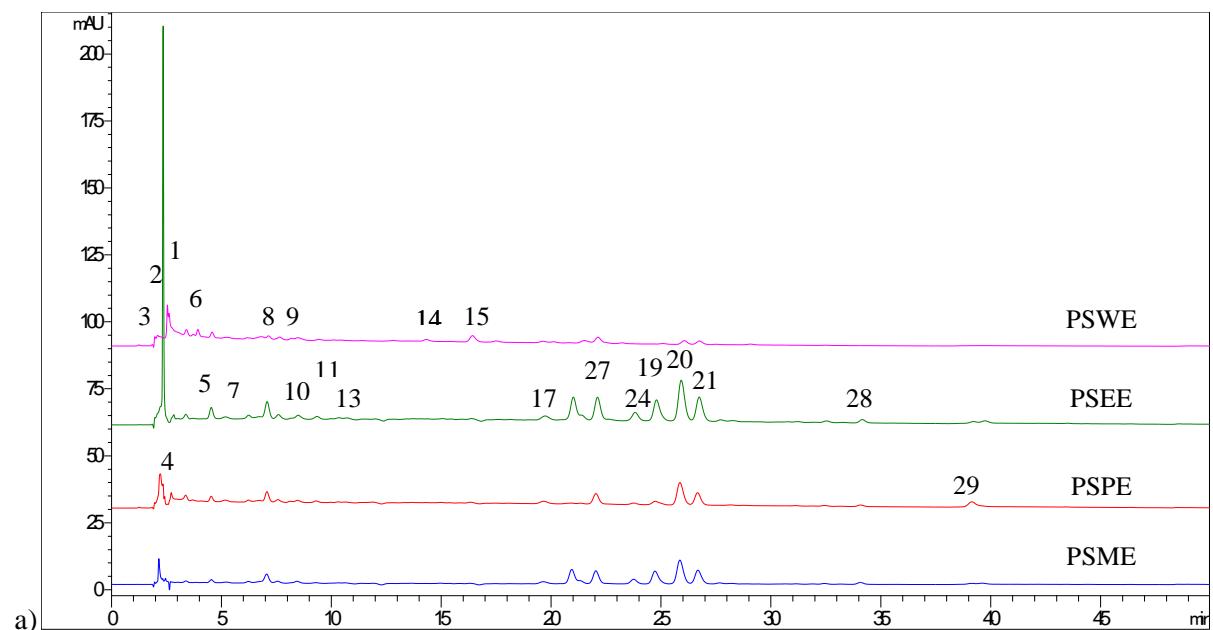
Табела 10. Квалитативни и квантитативни садржај полифенолних једињења (mg/100 g екстракта) у екстрактима испитиваних плодова. Између свих узорака постоји статистички значајна разлика (ANOVA са *post hoc* Тукеу's тестом, $p < 0,05$) у укупном садржају, осим између узорака означених *.

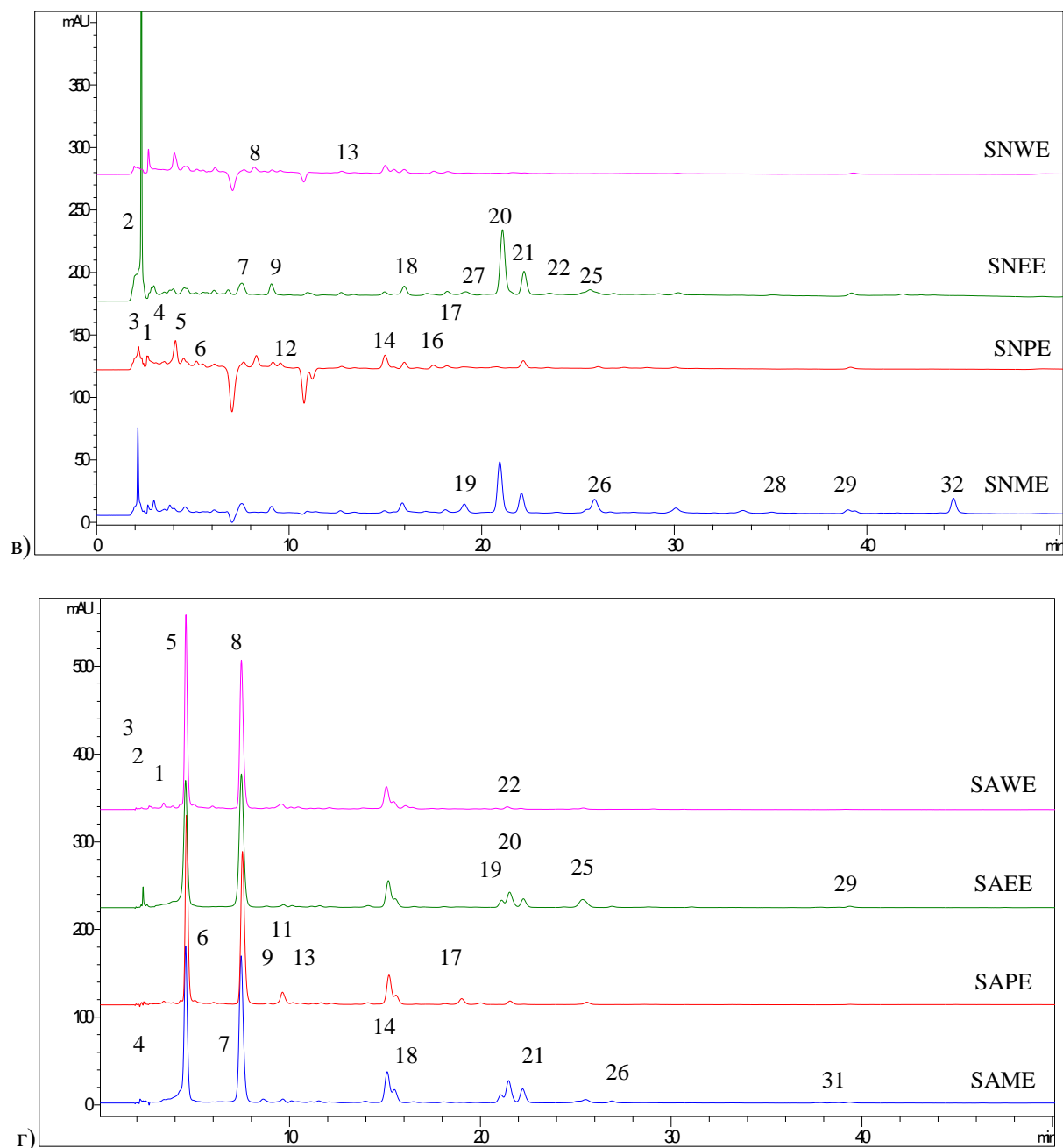
Полифенолна једињења	Садржај полифенолних једињења у екстрактима (mg/100 g)															
	PSME	PSEE	PSPE	PSWE	RCME	RCEE	RCPE	RCWE	SNME	SNEE	SNPE	SNWE	SAME	SAEE	SAPE	SAWE
Гална киселина	44,09	88,67	111,30	181,98	41,30	40,99	212,21	296,02	66,16	132,36	285,17	175,21	52,73	16,69	77,97	94,51
Урсолна киселина	31,95	91,31	70,99	85,50	74,04	52,53	216,21	133,07	-	807,32	-	-	26,59	28,22	-	63,63
Олеанолна киселина	-	181,82	63,64	148,14	507,32	169,10	857,61	214,05	385,56	465,02	479,77	230,44	-	71,48	65,01	79,73
Пирогалол	241,43	128,24	347,80	334,62	-	757,30	422,85	864,55	315,29	561,85	726,90	485,65	620,43	260,20	289,04	387,75
Неохлорогенска киселина	0,54	3,36	1,53	1,96	2,55	2,26	5,23	3,84	1,38	3,50	3,87	1,02	50,33	45,46	43,95	39,40
Протокатехинска киселина	27,33	46,08	52,16	62,61	36,55	9,17	104,91	63,89	121,47	127,02	366,57	98,24	0,44	-	80,04	39,82
Катехин	10,84	34,10	10,78	16,27	2,73	3,41	17,09	5,80	52,32	69,77	99,55	10,79	14,06	11,48	11,61	10,26
Хлорогенска киселина	3,35	12,29	4,00	241,40	2,93	2,41	1,05	48,52	7,89	17,14	14,62	157,42	150,22	147,84	138,30	129,95
Процијанидин Б2	7,85	25,14	11,54	42,59	14,61	8,18	8,51	15,81	10,22	36,81	33,58	33,07	-	5,22	6,73	6,55
Ванилинска киселина	72,99	227,84	86,43	156,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кафена киселина	0,14	0,83	0,45	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00	1,05	4,11	2,01
Сирингинска киселина	-	-	-	-	18,29	11,45	75,33	68,17	159,27	82,18	688,73	180,27	-	-	-	-
Епикатехин	-	3,49	-	-	1,41	1,39	19,11	9,13	2,72	-	3,12	7,07	4,88	1,52	11,44	3,00
<i>p</i> -Кумарна киселина	0,15	0,54	0,25	0,96	-	-	0,35	0,16	0,33	-	2,49	-	59,51	48,74	55,90	42,55
Скополетин	-	0,58	-	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	0,11	-	0,43	-	1,42	-	-	-	-	-
Ферулна киселина	0,22	0,62	0,35	0,25	0,32	0,28	0,06	0,01	0,67	0,97	1,32	0,49	0,65	0,29	2,08	0,50
Витексин	-	-	-	-	0,17	0,30	-	-	1,53	0,84	2,33	0,32	1,51	0,73	0,88	0,69
Рутин	0,47	1,25	0,16	0,37	0,39	0,36	0,04	-	1,90	1,41	2,01	-	0,79	0,76	1,51	-
Хиперозид	0,29	0,61	0,28	0,05	0,12	0,21	-	-	1,87	2,47	1,11	-	0,77	0,80	0,17	0,15
Изокверцетин	1,16	2,50	0,96	0,25	0,69	0,72	0,13	-	3,93	4,25	1,30	0,26	2,81	1,75	0,34	0,27

Табела 10. Наставак

Полифенолна једињења	Садржај полифенолних једињења у екстрактима (mg/100 g)															
	PSME	PSEE	PSPE	PSWE	RCME	RCEE	RCPE	RCWE	SNME	SNEE	SNPE	SNWE	SAME	SAEE	SAPE	SAWE
Етил стар протокатехинске киселине	-	-	-	-	-	-	-	-	5,38	43,63	51,42	0,38	-	-	0,13	0,24
Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Скопарон	-	-	-	-	0,23	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нарингенин-7-О-глукозид	2,64	5,21	0,84	-	1,34	1,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кемферол-3-О-глукозид	-	-	-	-	0,16	0,15	0,10	-	0,17	0,12	-	-	1,38	1,56	0,97	7,21
Лутеолин-7-О-глукозид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Апигенин-7-О-глукозид	-	-	-	-	0,50	0,50	0,34	-	0,54	0,19	-	-	0,18	0,10	-	0,04
Флоридзин-дихидрат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Елагинска киселина	1,00	3,73	0,70	0,96	1,17	1,22	0,91	0,47	-	0,97	-	0,05	-	-	-	-
<i>trans</i> -Циметна киселина	2,21	3,90	1,76	0,54	-	-	-	-	7,45	-	-	-	-	-	-	-
Кверцетин	0,06	0,14	0,15	-	0,12	0,21	0,30	-	0,52	0,35	0,20	0,13	0,07	0,11	-	-
Тилирозид	-	-	-	-	0,39	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лутеолин	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-	-
Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-	12,18	-	-	-	-	-	-	-
Кемферол	-	-	-	-	-	0,03	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Делфинидин-3-О-рутинозид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-
Делфинидин-3-О-глукозид	-	-	-	-	-	-	-	-	2,91	0,37	0,42	2,72	-	-	-	-
Цијанидин-3-О-рутинозид	-	-	0,01	-	-	-	-	-	12,43	-	0,19	-	-	-	-	-
Цијанидин-3-О-глукозид	0,07	0,06	0,01	-	-	-	-	-	6,52	0,06	0,07	2,91	0,02	0,03	-	-
Дериват елагинске киселине	-	-	-	-	0,31	0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Дериват кафене киселине	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,09	0,12	-	0,53
Дериват кверцетина	0,57	1,61	-	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Укупан садржај (%)	0,45	0,86	0,77*	1,28	0,71	1,06	1,94	1,72	1,18	2,36	2,77	1,39	0,99	0,64	0,79*	0,05

Највећи садржај полифенолних једињења је одређен код екстраката плодова зове добијених применом 45% пропиленгликола и 70% етанола, као и екстраката шипурка са 45% пропиленгликолом и водом (кретао се у опсегу од 1,72% до 2,77%). Добијени резултати показују да се ови екстракти могу стандардизовати на концентрацију полифенолних једињења у опсегу 1,5–2,0% и потенцијално примењивати за израду фармацеутских препарата за примену на кожи.





Слика 3. Хроматограми испитиваних екстракта плодова са пиковима идентификованих полифенолних једињења добијених DAD детекцијом: а) екстракти плодова трњине (360 nm), б) екстракти шипурка (360 nm), в) екстракти плодова зове (325 nm), г) екстракти плодова јаребике (360 nm). Идентификација пикова: 1 – гална киселина; 2 – урсолна киселина; 3 – олеанолна киселина; 4 – пирогалол; 5 – неохлорогенска киселина; 6 – протокатехинска киселина; 7 – катехин; 8 – хлорогенска киселина; 9 – процијанидин Б2; 10 – ванилинска киселина; 11 – кафена киселина; 12 – сиригинска киселина; 13 – епикатехин; 14 – *p*-кумарна киселина; 15 – скополетин; 16 – синапинска киселина; 17 – ферулна киселина; 18 – витексин, 19 – рутин; 20 – хиперозид; 21 – изокверцетин; 22 – етил стар протокатехинске киселине; 23 – скопарон; 24 – нарингенин-7-*O*-глукозид; 25 – кемферол-3-*O*-глукозид; 26 – апигенин-7-*O*-глукозид; 27 –

елагинска киселина; 28 – *trans*-циметна киселина; 29 – кверцетин; 30 – тилирозид; 31 – лутеолин; 32 – флоретин; 33 – кемферол.

4.6.2. HPLC анализа садржаја органских киселина у екстрактима испитиваних плодова

Органске киселине су примарни метаболити биљака и у великој мери доприносе квалитету плодова. Наиме, поред шећера и ароматичних једињења, органске киселине у великој мери доприносе укусу плодова (Mikulic-Petkovsek и сар., 2016б). Познато је да се примена шипурка у медицини и фармацији у великој мери темељи на високом садржају витамина Це у овим плодовима. Ови плодови се сматрају природним извором витамина Це, тј. аскорбинске киселине. Лимунска киселина се доста користи за регулацију киселости и као антиоксиданс (Adamczak и сар., 2012; Demir и сар., 2014). Стога је важно проверити садржај ове, али и осталих органских киселина у екстрактима плодова.

Анализиране су следеће органске киселине: лимунска, јабучна, оксална, L-аскорбинска, ћилибарна, винска, пирогрожђана, бадемова, млечна и хининска киселина. Садржај органских киселина у екстрактима испитиваних плодова приказан је у Табели 11. Хроматограми испитиваних екстраката са пиковима идентификованих органских киселина дати су на Слици 4.

Врста плода и примењени растварач за екстракцију, утицали су на квалитативни и квантитативни састав органских киселина у екстрактима. Лимунска, јабучна, оксална, L-аскорбинска и бадемова киселина су биле најзаступљеније у екстрактима шипурка. Екстракти плодова трњине су имали највећи садржај ћилибарне киселине, док су пирогрожђана, млечна и хининска киселина у највећој концентрацији биле заступљене у екстрактима плодова зове. Екстракти шипурка и плодова трњине имали су сличан садржај винске киселине. Хининска киселина је била присутна једино у екстрактима плодова зове и јаребике.

Екстрати плодова јаребике су имали најмањи просечни садржај органских киселина (0,94%), за разлику од осталих плодова чији су просечни садржаји били слични (1,32% до 1,40%). Најбогатији органским киселинама били су екстракти RCPE (2,03%) и PSWE (1,97%). Екстракти PSEE и RCWE били су на трећем месту по заступљености органских киселина у њима са истим укупним садржајем (1,70%). Код

плодова трњине и зове применом воде и 70% етанола као растварача за екстракцију добијени су екстракти са највећим укупним садржајем органских киселина (1,60–1,97%). Са друге стране код шипурка и плодова јаребике, као екстракти са највећим укупним садржајем органских киселина (1,17–2,03%) били су 45% пропиленгликолни и водени екстракти. Према томе, вода се издваја као погодан растварач за ефикасно изоловање органских киселина из испитиваних плодова. Са аспекта примене различитих растварача за екстракцију, интересантно је напоменути да је највећи садржај L-аскорбинске киселине пронађен у екстрактима плодова са метанолом, а да је у екстрактима свих плодова са 70% етанолом детектована млечна киселина.

Доминантне органске киселине у екстрактима плодова трњине биле су ћилибарна киселина (43,29–79,69% од укупног садржаја анализираних органских киселина) и лимунска киселина (11,66–28,52%). Mikulic-Petkovsek и сар. (2016а) су у дивљим плодовима трњине пронашли у највећој количини јабучну и лимунску киселину, које су сачињавале 69,01% и 17,54% од укупног садржаја анализираних органских киселина. Нижи садржај јабучне киселине у испитиваним плодовима је повезан са њиховим већом слаткоћом. Бадемова и млечна киселина су детектоване у екстрактима PSEE и PSWE. Показано је да дивљи плодови трњине садрже значајно веће концентрације органских киселина у односу на култивисане врсте (Mikulic-Petkovsek и сар., 2016а). Плодови трњине садржали су приближно 25% L-аскорбинске киселине (екстракт PSME) у односу на укупни садржај анализираних органских киселина, а њено присуство у овим плодовима је показано од стране Ruiz-Rodríguez и сар. (2014).

Екстракти шипурка су садржали највеће количине лимунске киселине (44,72–69,53% од укупног садржаја анализираних органских киселина) у односу на остале плодове. Јабучна и L-аскорбинска киселине су биле присутне у мањој мери. Бадемова киселина је детектована у највећем садржају (12,18–15,37% од укупног садржаја) у екстрактима RCEE, RCPE и RCWE. Други истраживачи су, у складу са овим резултатима, у шипурку нашли висок садржај лимунске киселине, док је L-аскорбинска киселина била присутна у мањој количини (Adamczak и сар., 2012). Demir и сар. (2014) су у шипурку (из кога је претходно уклоњено семе) показали присуство L-аскорбинске, лимунске и јабучне киселине.

У екстрактима плодова зове доминантне су биле лимунска и хининска киселина (њихов садржај је био у опсегу 40,20–91,40% од укупног садржаја анализираних органских киселина). Висок садржај млечне киселине (43,96%) је био у екстракту SNWE, а скоро дупло мањи у екстракту SNEE. Екстракти плодова зове, за разлику од

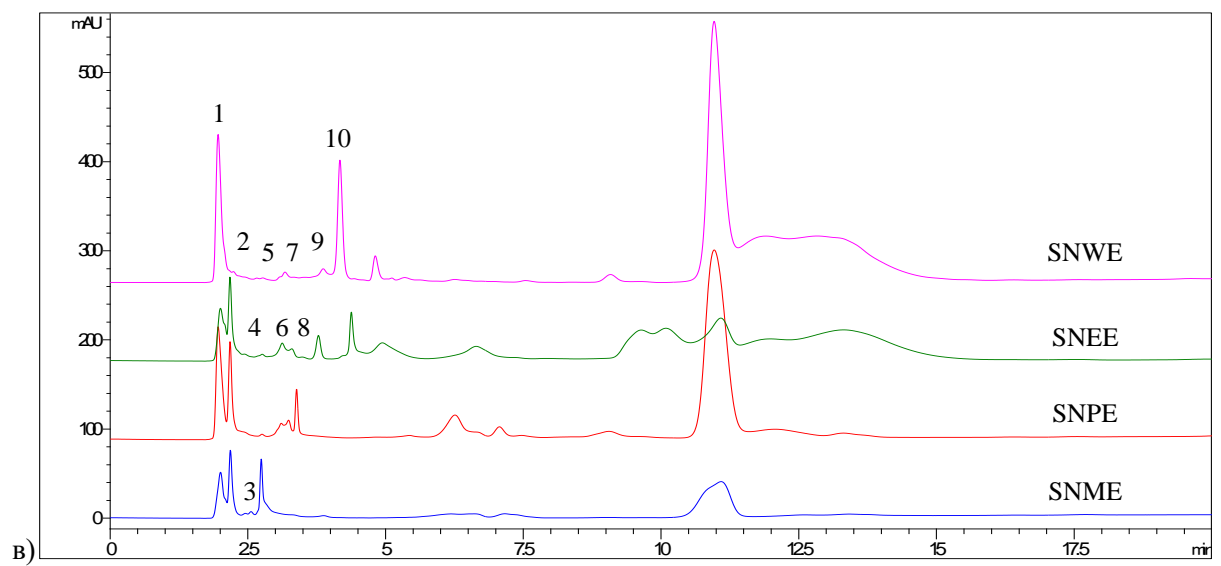
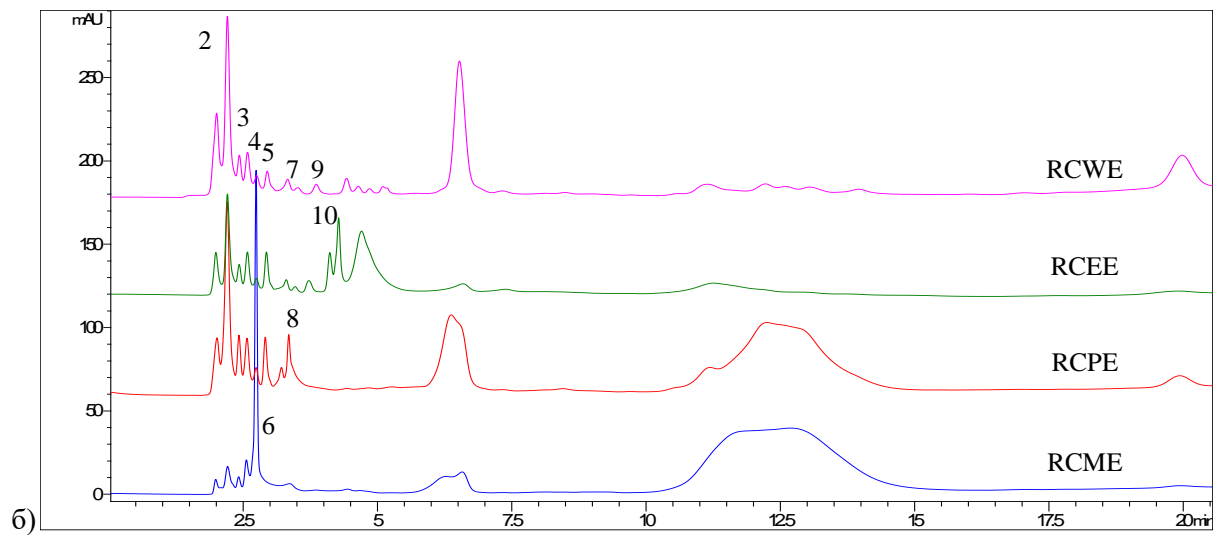
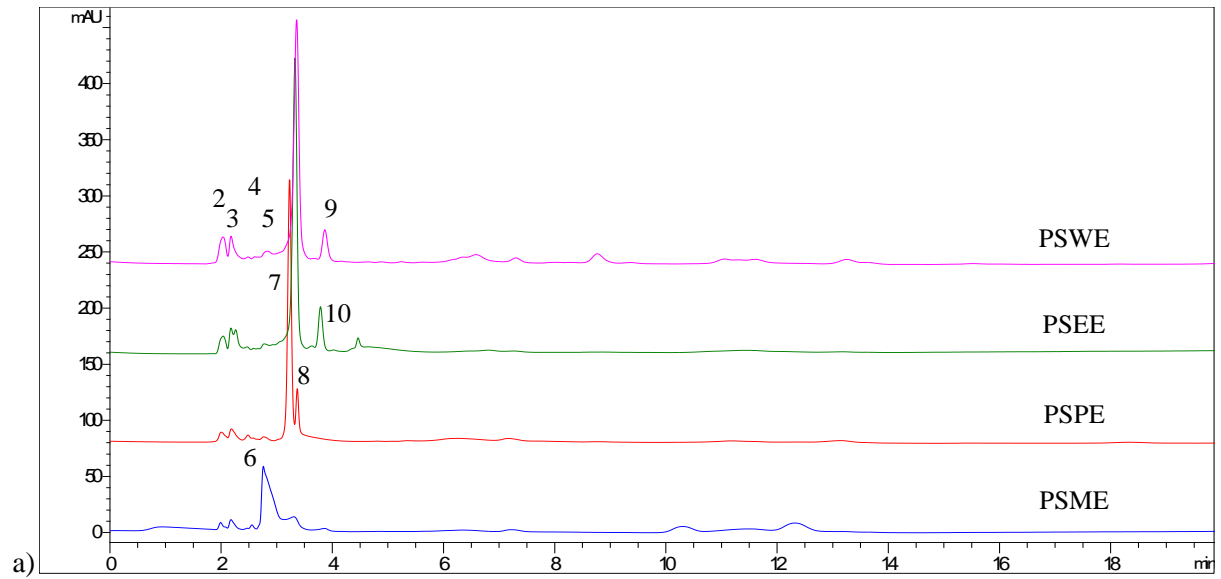
осталих плодова, нису садржали оксалну киселину (осим екстракта SNME, где је оксална киселина нађена у ниској концентрацији). Сви екстракти плодова зове садржали су пирогрођану киселину и L-аскорбинску киселину. Јабучна и винска киселина су биле присутне у појединим екстрактима плодова зове у мањим количинама. Присуство органских киселина (лимунске, јабучне, винске) у плодовима зове показано је и од стране других истраживача (Mikulic-Petkovsek и сар., 2016б). Mikulic-Petkovsek и сар. (2016б) су утврдили да плодови зове (врсте *S. nigra*) садрже око 10 пута већу концентрацију органских киселина у односу на хибриде ове биљне врсте.

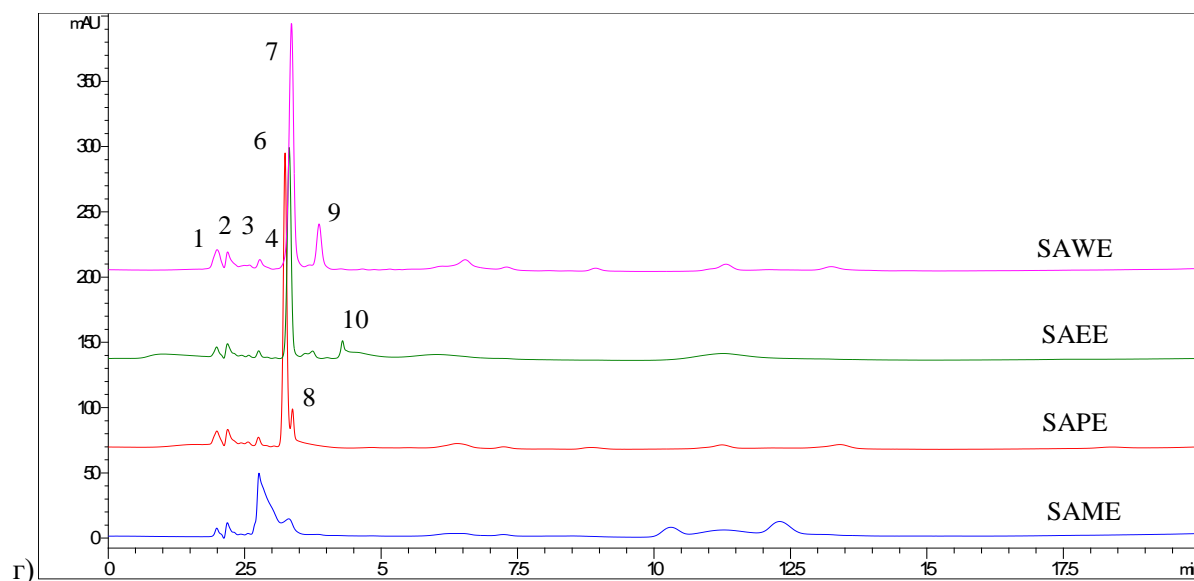
Ћилибарна и лимунска киселина су биле доминантне органске киселине у екстрактима плодова јаребике (највише у екстракту са водом) и чиниле су од 71,09% до 91,85% од укупног садржаја анализираних органских киселина. У свим екстрактима је показано присуство јабучне, оксалне и L-аскорбинске киселине. Пирогрођана киселина је детектована само у екстрактима SAEE и SAWE, а млечна киселина једино у екстракту SAEE (7,90%). У складу са овим резултатима, друге студије су показале да плодови јаребике садрже лимунску, јабучну и винску киселину (Mikulic-Petkovsek и сар., 2012).

Из приказаних резултата, може се извести закључак да су екстракти испитиваних плодова, због високог садржаја органских киселина, погодни за примену у фармацеутској индустрији (укупан садржај органских киселина у свим екстрактима износио је у просеку 1,25%). Највећи потенцијал за примену, са највећом концентрацијом органских киселина, показали су екстракти шипурка са 45% пропиленгликолом и водом и водени екстракт плодова трњине, који се могу примењивати у фармацеутским препаратима за примену на кожи, као стандардизовани екстракти са укупним садржајем органских киселина у концентрацији од минимум 1,50%.

Табела 11. Квалитативни и квантитативни садржај органских киселина (mg/100 g екстракта) у екстрактима испитиваних плодова. Подаци су анализирани применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Тукеју's тест и показано је да између свих узорака постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у укупном садржају органских киселина, изузев између узорака означених *.

Екстракт	Садржај органских киселина (mg/100 g)										
	лимунска	јабучна	оксална	L-аскорбинска	ћилибарна	винска	пирогрођјана	бадемова	млечна	хининска	Укупан садржај (%)
PSME	102,67	4,68	3,69	89,90	155,84	-	3,07	-	-	-	0,36
PSEE	204,41	24,68	3,12	8,40	1354,71	30,01	20,63	41,62	8,09	-	1,70*
PSPE	155,11	24,40	3,45	4,61	920,18	218,46	-	-	-	-	1,33
PSWE	317,56	119,95	6,47	17,10	1371,28	21,30	19,07	90,12	7,94	-	1,97
RCME	201,23	69,14	7,93	94,05	75,24	-	-	-	-	-	0,45
RCEE	615,71	94,15	15,49	17,32	63,28	20,23	5,56	169,08	100,15	-	1,10
RCPE	1306,05	129,61	27,98	21,29	80,73	219,93	-	247,19	-	-	2,03
RCWE	1181,97	113,53	22,30	13,67	81,18	33,18	5,83	248,79	-	-	1,70*
SNME	605,10	18,67	3,53	42,06	-	-	1,52	-	-	126,10	0,80
SNEE	858,64	44,53	-	8,70	183,07	71,18	15,59	-	299,12	159,51	1,64
SNPE	1053,64	-	-	3,32	103,62	98,29	18,91	-	-	286,41	1,56
SNWE	259,87	-	-	6,33	138,57	-	24,94	86,43	703,31	383,25	1,60
SAME	140,18	11,09	2,73	88,43	144,19	-	-	-	-	14,63	0,40
SAEE	132,80	9,64	2,14	4,24	690,65	19,48	3,73	-	75,86	16,64	0,96
SAPE	144,68	12,60	2,22	4,20	833,20	142,66	-	-	-	26,01	1,17
SAWE	161,83	15,25	3,02	6,55	967,92	17,91	21,71	-	-	40,75	1,23





Слика 4. Хроматограми испитиваних екстраката а) плодова трњине, б) шипурка, в) плодова зове и г) плодова јаребике са пиковима идентификованих органских киселина, добијених DAD детекцијом на 220 nm. Идентификација пикова: 1 – хининска киселина; 2 – лимунска киселина; 3 – оксална киселина; 4 – јабучна киселина; 5 – бадемова киселина; 6 – L-аскорбинска киселина; 7 – ћилибарна киселина; 8 – винска киселина; 9 – пирогрожђана киселина; 10 – млечна киселина.

4.6.3. HPLC анализа садржаја витамина у екстрактима испитиваних плодова

Плодови су богати витаминима који помажу у побољшању функције имуног система, смањују упалу и сматрају се антиоксидансима који помажу у борби против штетног утицаја оксидативног стреса (Nile и Park, 2014).

У екстрактима испитиваних плодова одређиване су количине витамина Бе1 – тиамина, витамина Бе2 – рибофлавина и α -токоферола. Садржај витамина у испитиваним екстрактима приказан је у Табели 12. Хроматограми испитиваних екстраката са пиковима идентификованих витамина су приказани на Слици 5.

Табела 12. Квалитативни и квантитативни садржај анализираних витамина ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ екстракта) у екстрактима испитиваних плодова. Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након које је рађен Тукеј's тест, показано је да између свих узорака постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у садржају сваког од испитиваних витамина.

Екстракт	Садржај витамина ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		
	тиамин (витамин Бe1)	рибофлавин (витамин Бe2)	α -токоферол (витамин Е)
PSME	0,60	1,08	109,88
PSEE	1,07	2,68	-
PSPE	2,03	6,65	-
PSWE	1,25	2,80	-
RCME	-	1,67	758,11
RCEE	-	2,60	926,89
RCPE	-	19,69	-
RCWE	-	19,23	-
SNME	-	-	807,57
SNEE	-	0,47	-
SNPE	4,35	12,47	-
SNWE	1,81	10,20	-
SAME	-	-	600,76
SAEE	-	-	-
SAPЕ	2,55	7,39	-
SAWE	0,26	3,54	-

Тиамин је био присутан у екстрактима плодова трњине, зове и јаребике, а највећа концентрација овог витамина била је у екстрактима са 45% пропиленгликолом као растварачем за екстракцију. Екстракт SNPE је садржао највећу концентрацију тиаминa ($4,35\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), скоро двоструко више од екстракта PSPE и SAPE. Тиамин је пронађен у малој концентрацији у метанолним и 70% етанолним екстрактима, једино у плодовима трњине.

Рибофлавин је био заступљен у свим плодовима, са највећим садржајем у екстрактима са 45% пропиленгликолом и водом. Највише рибофлавина је нађено у екстрактима шипурка (RCPE – $19,69\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ и RCWE – $19,23\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), а затим у екстрактима плодова зове са истим растварачима за екстракцију. У литератури скоро и да нема података за садржај ових витамина у испитиваним плодовима. Özcan (2008) је

документовао постојање витамина Бе1 и Бе2 у плодовима трњине, што је у складу са резултатима докторске дисертације.

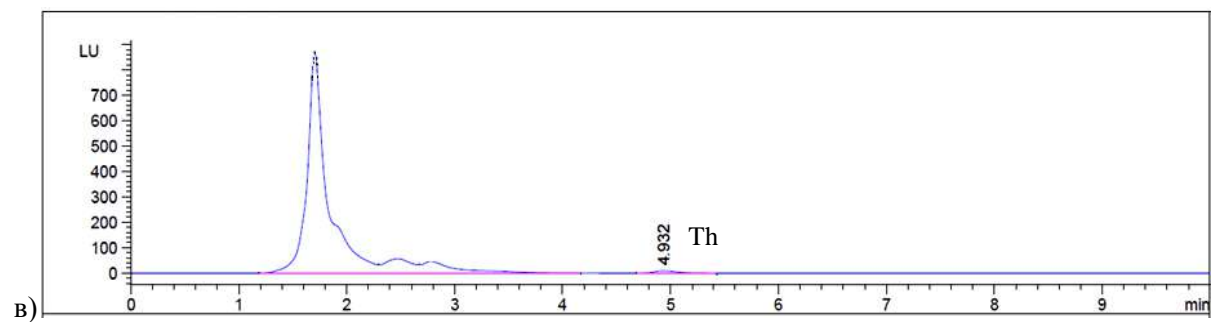
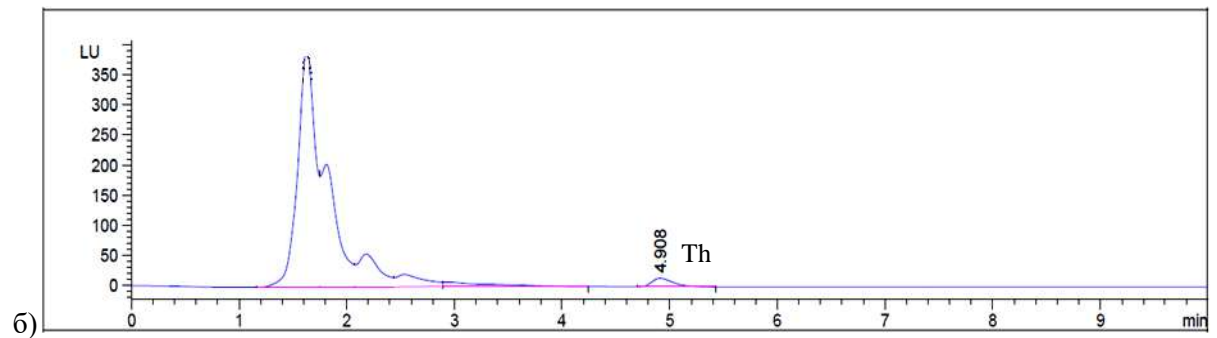
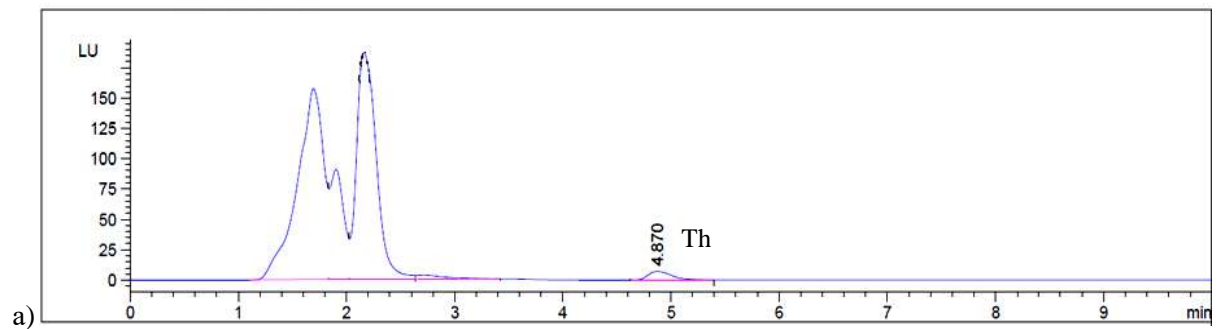
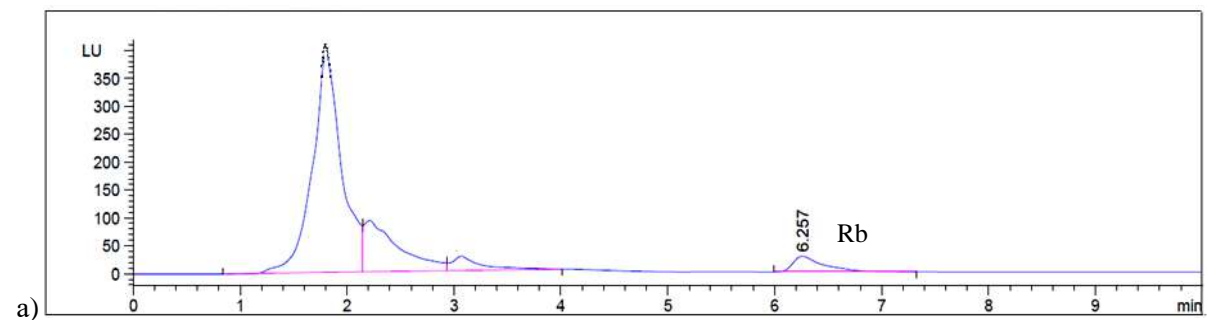
α -Токоферол, главни облик витамина Е, је антиоксиданс растворљив у липидима и функционише тако што спречава липидну пероксидацију у ћелијским мембранама, али и као хватач ROS, као што је синглетни кисеоник. Сматра се првом линијом одбране у процесу липидне пероксидације и штити PUFAs у ћелијским мембранама од напада слободних радикала (Barros и сар., 2010). Показан је фотопротективни потенцијал витамина Е у ниским концентрацијама на хумане фибробласте коже изложене UVA зрачењу (Offord и сар., 2002).

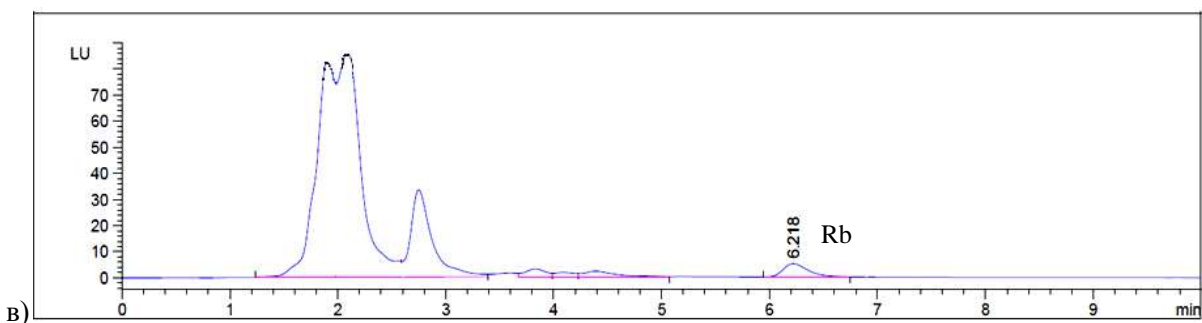
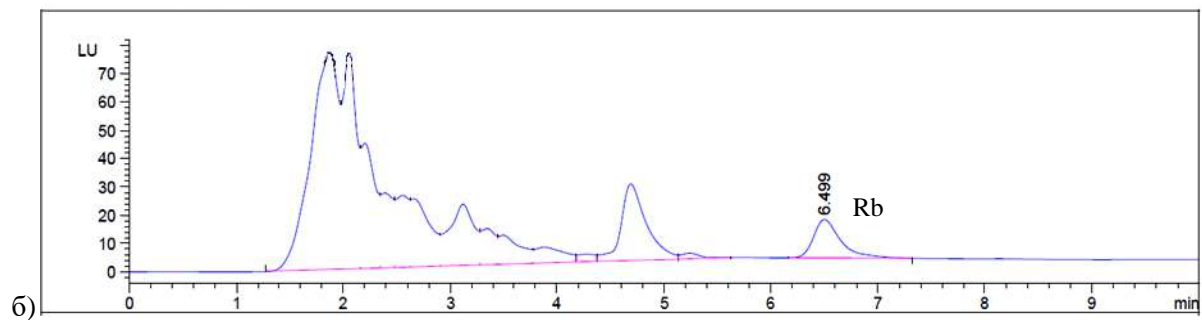
Присуство полифенолних једињења, нарочито флавоноида и антоцијана (као подгрупе флавоноида), у екстрактима испитиваних плодова узрокује интензиван пик у хроматограму применом FLD детекције. Ово отежава и омета директну анализу α -токоферола из екстракта плодова на таласној дужини FLD детектора ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 330 \text{ nm}$). α -Токоферол такође апсорбује и у UV области спектра са максимумом апсорпције од 295 nm. Међутим, у UV области је још мања селективност одређивања овог витамина, јер велики број једињења присутних у испитиваним екстрактима апсорбује у овој области (поглавља 4.6.1. и 4.6.2.).

Из тог разлога је било неопходно припремити на одговарајући начин узорак екстракта за анализу α -токоферола, што је постигнуто применом екстракције на чврстој фази (SPE). Предности ове екстракционе методе су у примени врло мале запремине узорка и растварача. Највећа предност методе је у високој селективности која се постиже избором одговарајућих сорбената кертрица (Wells, 2003). Данас је доступан велики број различитих типова сорбената, а издвајање једињења из сложеног узорка на њима зависи од поларности тог једињења, поларности сорбента, као и могућности успостављања различитих типова интеракција између анализата и сорбента. За екстракцију на чврстој фази изабран је кертриц са сорбентом типа C18 ес, јер спада у изразито неполарне сорбенте, па се могло очекивати да ће се α -токоферол на њему јаче везати и боље издвојити од поларнијих флавоноида (антоцијана).

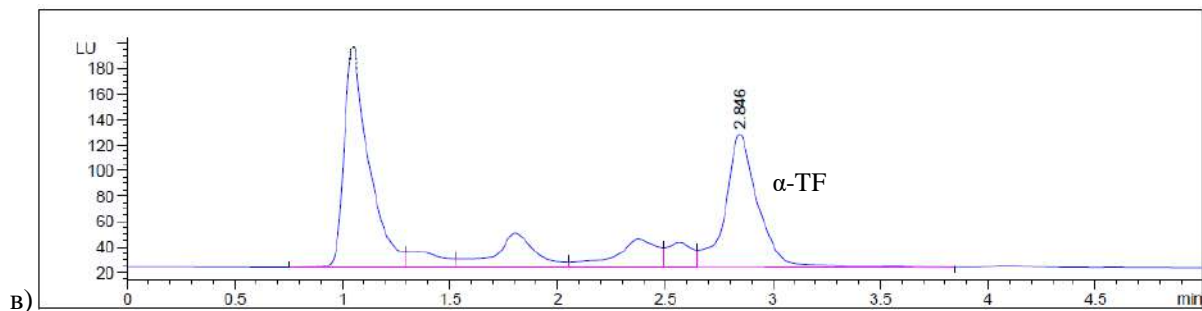
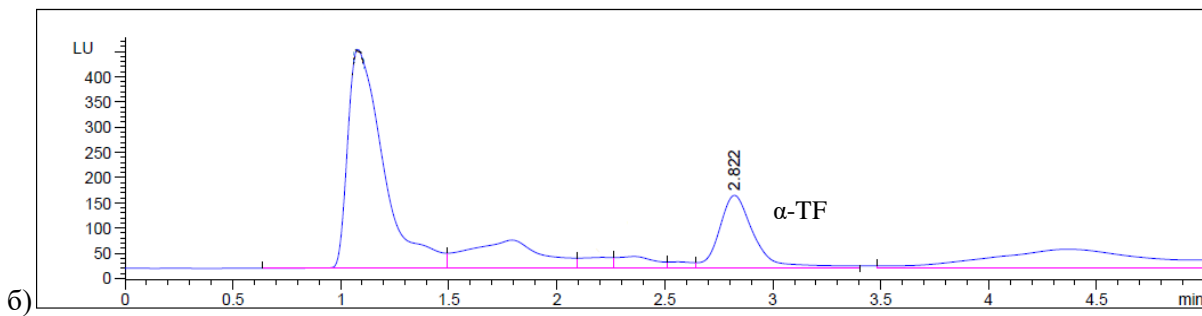
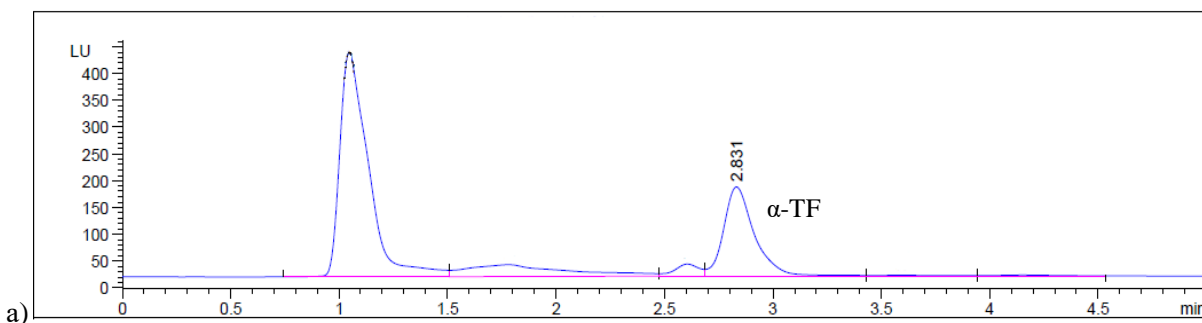
α -Токоферол је био присутан у метанолним екстрактима свих плодова, с тим што је код шипурка нађен висок садржај овог витамина и у екстрактима са 70% етанолом. На основу добијених резултата може се извести закључак да се метанол показао као најселективнији растварач за изоловање овог витамина из испитиваних плодова. Највећа концентрација α -токоферола била је у екстрактима шипурка, а најмања у екстрактима плодова трњине. Подаци из литературе дају различите резултате о

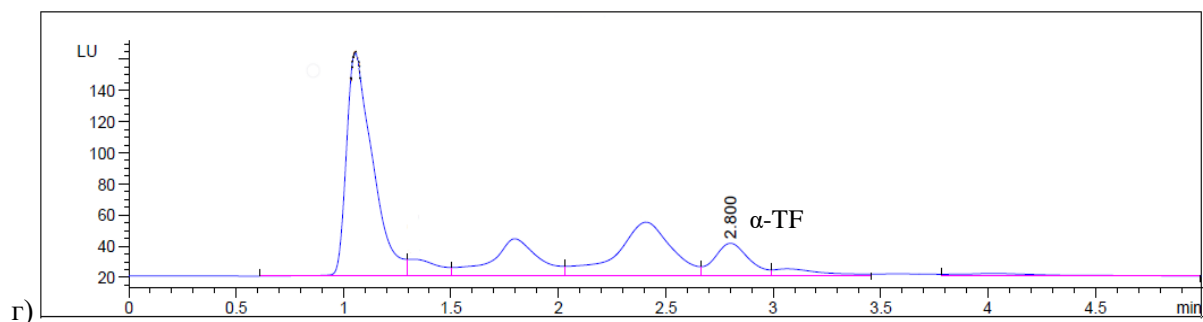
садржају α -токоферола у плодовима трњине, дивље руже и јаребике (Barros и сар., 2010; Klavins и сар., 2016; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016a; Özcan, 2008; Šavikin и сар., 2017), док је код зове истраживан садржај α -токоферола само у уљу изолованом из семена (Fazio и сар., 2013).

А**Б**



B





Слика 5. Хроматограми екстраката плодова са пиковима идентификованих витамина: **A** – тиамина у екстрактима а) PSPE; б) SNWE; в) SAPE ($\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$); **B** – рибофлавина у екстрактима а) RCWE; б) SNWE; в) SAPE ($\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$); **B** – α -токоферола у екстрактима а) RCEE; б) SNME; в) SAME; г) PSME ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ и $\lambda_{em} = 330 \text{ nm}$), добијени FLD детекцијом. Идентификација пикова: Th – тиамин; Rb – рибофлавин; α -TF – α -токоферол.

4.7. *In vitro* испитивање антиоксидативне активности екстраката плодова

Многа биоактивна једињења из плодова понашају се као природни антиоксиданси и штите ћелије од оксидативног оштећења узрокованог слободним радикалима и настанка хроничних болести. Разне врсте слободних радикала оштећују ћелијску мембрану и ДНК у процесу оксидативног стреса и доводе до њихове дисфункције (Nile и Park, 2014). Процена антиоксидативног потенцијала екстраката плодова у односу на стандарде антиоксиданаса вршена је у циљу карактеризације испитиваних екстраката, тј. плодова из којих су добијени екстракти.

Екстракти плодова показали су способност антиоксидантног деловања путем неколико различитих механизма – поседовали су способност спречавања оксидативне деградације и „хватања“ слободних радикала (DPPH, NO и \bullet OH радикалских врста), хелирања прооксидативних метала, инхибиције липидне пероксидације и редукције јона гвожђа.

Способност неутрализације слободних радикала је важна у превенцији оштећења изазваних оксидативним стресом, као и у процесу инхибиције липидне пероксидације (Khan и сар., 2013). DPPH је стабилан радикал који има апсорпциони максимум на таласној дужини од 517 nm. У присуству антиоксиданаса, реакцијом трансфера атома водоника или електрона, он се редукује у дериват хидразина, што доводи до смањења апсорбанце (Duymuş и сар., 2014). Антиоксиданси су способни да неутралишу

слободне DPPH радикале (који су љубичасто обојени) и преведу их у безбојне производе.

Сви екстракти су показали задовољавајући ниво способности неутралисања DPPH слободних радикала (Табела 13). На основу добијених резултата екстракт SNWE је био најактивнији у погледу хватања слободних DPPH радикала са најмањом DPPH IC₅₀. Екстракт RCEE је био други по показаној активности, док је на трећем месту био екстракт RCWE. Сва три екстракта су показала сличну активност са приближним DPPH IC₅₀ вредностима. Међутим, ниједан од екстраката није био активан колико позитивне контроле, тролокс (DPPH IC₅₀ од 1,75 ± 0,01 µg/ml) и ВНТ (DPPH IC₅₀ од 8,20 ± 0,04 µg/ml). Посматрајући биљне врсте, плодови дивље руже, тј. шипурак је показао најбољу способност хватања DPPH радикала, када су за екстракцију коришћени вода, односно 70% етанол.

Азот-оксид је важан хемијски медијатор који учествује у регулацији различитих физиолошких процеса. Натријум-нитропрусид у воденој средини спонтано доводи до стварања азот-оксида, који реагује са кисеоником стварајући нитритне јоне. Екстракти, као потенцијални „хватачи“ NO радикала спречавају реакцију азот-оксида са кисеоником и спречавају настанак штетних слободних радикала, који имају улогу у настанку бола и инфламације (Darsini и сар., 2013; Gutierrez и Ahuatzí, 2015). Редослед екстраката по способности „хватања“ NO радикала био је следећи: RCWE > RCPE > RCME (Табела 13), на основу чега закључујемо да је и овде шипурак показао највећу антиоксидативну активност (са просечном вредношћу IC₅₀ од 633,69 µg/ml). Вредност NO IC₅₀ за позитивну контролу, L-аскорбинску киселину, била је 164,54 ± 2,09 µg/ml.

Хидроксилни радикал ([•]OH) је најреактивнији и најдоминантнији међу реактивним кисеоничним врстама (ROS) који се ствара ендогено процесом аеробног метаболизма, из супероксидног ањона или водоник-пероксида у присуству металних јона. Доводи до старења ћелија и настанка болести, тако што реагује са многим биолошким молекулима (ДНК). Превенција ових штетних ефеката је веома значајна, како са аспекта очувања здравља људи, тако и очувања хране, фармацеутских или козметичких препарата (Darsini и сар., 2013). Процена способности неутрализације хидроксилних радикала се базира на деградацији 2-дезоксид-рибозе у присуству хидроксилних радикала, генерисаних тзв. *Fenton* системом (Fe³⁺-аскорбат-ЕДТА-H₂O₂). Производ реакције је малоналдеhid који се квалитативно може проценити кондензацијом са ТВА и формирањем пинк обојеног хромогена (Halliwell и сар., 1987).

У тестовима испитивања способности неутрализације $\bullet\text{OH}$ радикала, $\bullet\text{OH}_{\text{NS}}$ и $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$, екстракт RCWE био је најактивнији, а добру активност у оба теста показао је и екстракт SNWE (Табела 13). Вода је била растварач избора када се ради о добијању екстраката са великим потенцијалом неутрализације $\bullet\text{OH}$ радикала. Већина екстраката је показала одличну антиоксидативну активност у овим тестовима, чак већу од позитивне контроле манитола, чије су вредности биле $\bullet\text{OH}_{\text{NS}} \text{IC}_{50} 580,79 \pm 4,37 \mu\text{g/ml}$ и $\bullet\text{OH}_{\text{SS}} \text{IC}_{50} 563,46 \pm 3,58 \mu\text{g/ml}$. Интересантно је да је у тесту $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$, код плодова трњине и јаребике, метанол дао екстракте са најбољом антиоксидативном активношћу у поређењу са осталим растварачима. У оба теста, посматрајући просечну активност екстраката за сваки плод појединачно, јаребика је показала највећу способност хватања ове врсте радикала (просечне активности у оба теста су биле $\bullet\text{OH}_{\text{NS}} \text{IC}_{50} 539,86 \mu\text{g/ml}$ и $\bullet\text{OH}_{\text{SS}} \text{IC}_{50} 461,75 \mu\text{g/ml}$).

Резултати процене инхибиције деградације 2-дезокси-D-рибозе могу дати информације о механизму антиоксидативног деловања испитиваних екстраката. У $\bullet\text{OH}_{\text{NS}}$ тесту, ЕДТА формира комплекс са гвожђем(III), па се антиоксидативна активност у том случају огледа у неутрализацији већ формираних $\bullet\text{OH}$ радикала у раствору. Пошто у $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$ тесту изостаје ЕДТА, гвожђе(III) се може везати за 2-дезокси-D-рибозу и произвести $\bullet\text{OH}$ радикале на овом месту. Тако да једињења која хелирају гвожђе могу смањити степен деградације 2-дезокси-D-рибозе и утицати на стварање радикала, чак иако нису ефикасни хватачи $\bullet\text{OH}$ радикала. Стога се претпоставља да су екстракти који показују већу активност у $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$ тесту у односу на $\bullet\text{OH}_{\text{NS}}$, уједно и бољи хелатори гвожђа него хватачи $\bullet\text{OH}$ радикала (Hinneburg и сар., 2006), што су показали и резултати испитивања дати у Табелама 13 и 14. Најочигледнији пример су екстракти PSME, SAME и SNEE који су показали добру активност у $\bullet\text{OH}_{\text{SS}}$ тесту, а такође и висок хелатациони потенцијал.

Табела 13. Антиоксидативна активност екстраката плодова: способност неутрализације DPPH радикала (DPPH), азот-оксид радикала (NO), хидроксилних радикала – неспецифична за место везивања ($\cdot\text{OH}_{\text{NS}}$) и специфична за место везивања ($\cdot\text{OH}_{\text{SS}}$). Резултати су приказани као средња вредност \pm SD. У свакој колони различита слова означавају постојање статистичке значајне разлике између узорака ($p < 0,05$), показане на основу резултата једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Tukey's тестом.

Екстракт	IC ₅₀ (µg/ml)			
	DPPH	NO	$\cdot\text{OH}_{\text{NS}}$	$\cdot\text{OH}_{\text{SS}}$
PSME	525,28 \pm 1,98 ^и	797,29 \pm 4,14 ^и	763,54 \pm 3,45 ^з	364,33 \pm 1,49 ^б
PSEE	262,94 \pm 1,01 ^ј	1041,45 \pm 4,98 ^к	652,88 \pm 2,98 ^е	576,01 \pm 4,57 ^з
PSPE	181,74 \pm 0,32 ^з	648,93 \pm 3,19 ^б	450,26 \pm 1,73 ^б	590,92 \pm 3,94 ^и
PSWE	493,28 \pm 1,30 ^к	1597,09 \pm 3,99 ^ј	637,72 \pm 2,38 ^б	421,79 \pm 2,02 ^и
RCME	89,41 \pm 0,54 ^е	610,19 \pm 3,24 ^б	819,86 \pm 3,83 ^ј	712,51 \pm 4,01 ^и
RCEE	55,21 \pm 0,21 ^б	817,67 \pm 4,19 ^б	1046,77 \pm 9,14 ^и	764,18 \pm 3,71 ^б
RCPE	66,82 \pm 0,39 ^г	558,01 \pm 6,21 ^а	783,00 \pm 4,69 ^и	632,03 \pm 3,72 ^ј
RCWE	58,10 \pm 0,30 ^б	548,89 \pm 5,37 ^а	382,39 \pm 2,27 ^а	354,08 \pm 1,29 ^а
SNME	78,89 \pm 0,22 ^б	1037,72 \pm 6,35 ^к	952,79 \pm 6,05 ^к	410,15 \pm 3,11 ^г
SNEE	70,85 \pm 0,39 ^и	661,93 \pm 3,27 ^б	727,49 \pm 5,34 ^к	427,14 \pm 2,16 ^и
SNPE	241,42 \pm 0,51 ^и	1291,74 \pm 8,43 ^з	715,55 \pm 5,42 ^к	674,24 \pm 4,02 ^к
SNWE	52,55 \pm 0,49 ^а	1332,75 \pm 6,15 ^и	410,80 \pm 3,44 ^б	398,88 \pm 2,09 ^б
SAME	117,41 \pm 0,47 ^к	902,00 \pm 4,78 ^е	654,61 \pm 4,06 ^е	439,63 \pm 2,92 ^б
SAEE	71,05 \pm 0,59 ^и	733,25 \pm 5,05 ^г	520,79 \pm 5,18 ^и	476,06 \pm 1,21 ^к
SAPE	67,30 \pm 0,41 ^г	1630,70 \pm 9,51 ^к	511,01 \pm 3,38 ^и	478,56 \pm 2,53 ^к
SAWE	88,30 \pm 0,40 ^е	1321,61 \pm 10,28 ^и	473,01 \pm 1,99 ^г	452,74 \pm 1,72 ^е

Хелатациони капацитет се сматра делом антиоксидативне активности у спречавању оксидативног оштећења, јер хелатација металних јона доводи до превенције стварања слободних радикала и нагомилавања јона гвожђа (Gutierrez и Ahuatzli, 2015). Редослед екстраката по хелатационој способности био је следећи: SNEE > PSME > SAME (Табела 14), на основу чега закључујемо да су 70% етанол и метанол

показали већу ефикасност у екстракцији једињења са испитиваном активношћу хелатације металних јона. Посматрајући просечну активност екстраката за сваки плод појединачно, јаребика је показала највећи хелатациони потенцијал (са просечном вредношћу IC_{50} од 502,91 $\mu\text{g/ml}$). Добро познати хелатор, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, коришћен је као референтни стандард и показао је највећу активност (вредност IC_{50} је била $82,03 \pm 1,45 \mu\text{g/ml}$).

Масна уља из плодова која ће се инкорпорирати у липофилне кремове садрже незасићене масне киселине, које се лако могу оксидовати у присуству оксидативних агенаса. Пошто је циљ ове докторске дисертације да се ултразвучни екстракт плодова одабране биљне врсте употреби у улози антиоксиданса у емулзионом систему типа В/У, веома је важно одредити антиоксидативну активност екстраката у медијуму са незасићеним масним киселинама. Метода са системом β -каротен/линолна киселина се користи у циљу испитивања степена оксидације незасићених масних киселина и одређивања способности инхибиције липидне пероксидације (као способности инхибиције обезбојавања β -каротена).

Разлике у растворљивости антиоксидантних једињења утичу на њихову активност у овом тесту. Хидрофобни антиоксиданси су се показали ефикаснијим у односу на хидрофилне, тако што се групишу у уљаној фази и на међуфази између уља и воде и директно сузбијају настајак липидних радикала и оксидацију β -каротена (Gutierrez и Ahuatzí, 2015). У овом тесту најбољу активност показали су екстракти плодова зове са 70% етанолом и метанолом, као и метанолни екстракт шипурка (Табела 14), па се на основу тога може закључити да ови екстракти имају највеће концентрације хидрофобних антиоксиданаса. Просечна активност код екстраката плодова зове је била највећа, а вредност IC_{50} је износила 433,90 $\mu\text{g/ml}$. Најмању вредност за IC_{50} од $10,80 \pm 0,40 \mu\text{g/ml}$ показао је ВНТ, коришћен као позитивна контрола.

Способност редукције јона гвожђа процењивана је FRAP тестом, који се заснива на колориметријској реакцији редукције Fe^{3+} комплекса трипиридилтриазина $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ у интензивно плаво обојени Fe^{2+} комплекс у киселој средини. Тест се широко користи у процени антиоксидативне активности различитих узорака (Darsini и сар., 2013; Gutierrez и Ahuatzí, 2015). Позитивне контроле су показале највећу FRAP антиоксидативну снагу: L-аскорбинска киселина ($27,90 \pm 0,38 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$) и ВНТ ($18,10 \pm 0,43 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$). Од испитиваних екстраката, најактивнији је био екстракт RCWE, а затим RCPE и RCEE (Табела 14), на основу чега закључујемо да шипурак

поседује највећу способност редукције јона гвожђа (просечна активност екстраката ових плодова износила је $1062,12 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$).

Табела 14. Антиоксидативна активност екстраката плодова: способност хелатације јона гвожђа (FIC), способност обезбојавања β -каротена (BCB) и способност редукције јона гвожђа (FRAP). Резултати су приказани као средња вредност \pm SD. У свакој колони различита слова означавају постојање статистичке значајне разлике између узорака ($p < 0,05$), показане на основу резултата једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Tukey's тестом.

Екстракт	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$
	FIC	BCB	FRAP
PSME	$226,14 \pm 1,75^{\text{b}}$	$675,43 \pm 2,51^{\text{c}}$	$242,75 \pm 0,15^{\text{d}}$
PSEE	$558,75 \pm 4,34^{\text{b}}$	$613,68 \pm 4,50^{\text{ж}}$	$229,36 \pm 1,39^{\text{jb}}$
PSPE	$585,62 \pm 3,87^{\text{e,ж}}$	$607,83 \pm 6,38^{\text{ж}}$	$281,07 \pm 0,98^{\text{k}}$
PSWE	$807,56 \pm 4,69^{\text{k}}$	$863,61 \pm 8,05^{\text{j}}$	$206,74 \pm 1,17^{\text{m}}$
RCME	$649,52 \pm 2,57^{\text{c}}$	$403,84 \pm 3,88^{\text{b}}$	$962,97 \pm 2,12^{\text{f}}$
RCEE	$693,98 \pm 3,17^{\text{h}}$	$449,70 \pm 4,18^{\text{f}}$	$1015,14 \pm 0,80^{\text{b}}$
RCPE	$580,02 \pm 3,92^{\text{c}}$	$496,92 \pm 5,67^{\text{h}}$	$1023,92 \pm 2,88^{\text{b}}$
RCWE	$883,39 \pm 4,88^{\text{h}}$	$1161,89 \pm 10,30^{\text{k}}$	$1246,45 \pm 2,95^{\text{a}}$
SNME	$760,73 \pm 4,52^{\text{j}}$	$370,63 \pm 5,49^{\text{b}}$	$686,43 \pm 1,28^{\text{e}}$
SNEE	$175,80 \pm 1,99^{\text{a}}$	$234,64 \pm 3,97^{\text{a}}$	$793,54 \pm 2,57^{\text{b}}$
SNPE	$593,02 \pm 3,39^{\text{ж}}$	$546,56 \pm 7,14^{\text{b}}$	$242,29 \pm 0,75^{\text{d}}$
SNWE	$927,33 \pm 5,03^{\text{jb}}$	$583,76 \pm 4,62^{\text{c}}$	$934,81 \pm 2,03^{\text{d}}$
SAME	$379,62 \pm 1,53^{\text{b}}$	$662,31 \pm 3,11^{\text{c}}$	$395,57 \pm 1,19^{\text{h}}$
SAEE	$539,80 \pm 6,35^{\text{h}}$	$727,31 \pm 2,78^{\text{h}}$	$493,91 \pm 1,15^{\text{c}}$
SAPE	$510,90 \pm 2,41^{\text{f}}$	$1251,13 \pm 9,72^{\text{h}}$	$519,76 \pm 1,60^{\text{ж}}$
SAWE	$581,31 \pm 2,25^{\text{c}}$	$614,72 \pm 1,20^{\text{ж}}$	$327,24 \pm 0,80^{\text{j}}$

Узимајући у обзир велику различитост у методологијама израде екстраката и методама анализе антиоксидативне активности, у коришћењу различитих растварача за екстракцију, као и разликама у самим плодовима и биљним врстама, поређење добијених резултата са подацима из научне литературе није једноставан задатак. У

претходним студијама приказаним у научној литератури, показана је антиоксидативна активност екстракта плодова трњине у спречавању настанка DPPH радикала, где је IC₅₀ имала вредности у опсегу од 64,98 µg/ml до 597,50 µg/ml (Barros и сар., 2010; Guimarães и сар., 2014). Pinacho и сар. (2015) су документовали већу DPPH активност етанолних у односу на водене екстракте трњине добијене методом мацерације. Што се тиче неутрализације •ОН радикала плодова трњине, у литератури постоје резултати само у виду процента инхибиције од 52,25% (Egea и сар., 2010). Дobar антиоксидативни потенцијал плодова трњине је показан ВCB IC₅₀ вредностима у опсегу од 641,11 µg/ml до 986,9 µg/ml (Barros и сар., 2010; Guimarães и сар., 2014) и вредношћу FRAP теста од 141,7 µmol Fe²⁺/g свежег материјала (Jabłońska-Ryś и сар., 2009).

За шипурак, DPPH IC₅₀ вредности у литератури су веће и крећу се у границама од 278,9 µg/ml до 750,0 µg/ml (Barros и сар., 2011; 2010; Demir и сар., 2014). Вредности IC₅₀ за испитивање неутрализације •ОН радикала код екстракта шипурка забележене од стране других истраживача биле су у опсегу 119–1480 µg/ml (Nađral и сар., 2016). Антиоксидативна снага екстракта шипурка у подацима из литературе, измерена применом FRAP теста износила је 1043,5 µmol/g, слично резултатима ове дисертације (Gao и сар., 2000). Такође, резултати ВCB теста су се слагали са подацима из литературе, где је забележена ВCB IC₅₀ вредност екстракта шипурка од 396,06 µg/ml (Barros и сар., 2010).

Према резултатима Дуумиџ и сар. (2014), DPPH IC₅₀ вредност воденог екстракта плода зове била је 123 µg/ml, док је 70% етанолни екстракт показао највећу способност инхибиције оксидације линолне киселине у тесту са β-каротеном (58% инхибиције). За екстракте плода зове са етанолом (у концентрацији од 50% и 96%) DPPH IC₅₀ вредност се кретала у опсегу од 138,8 µg/ml до 158,9 µg/ml (Ho и сар., 2017). Резултати DPPH и ВCB анализа претходних студија са екстрактом плода зове добијеног течном екстракцијом смешом етанола и воде (80:20, v/v) под повишеним притиском, показали су постојање антиоксидативне активности испитиваних екстракта (Dawidowicz и сар., 2006).

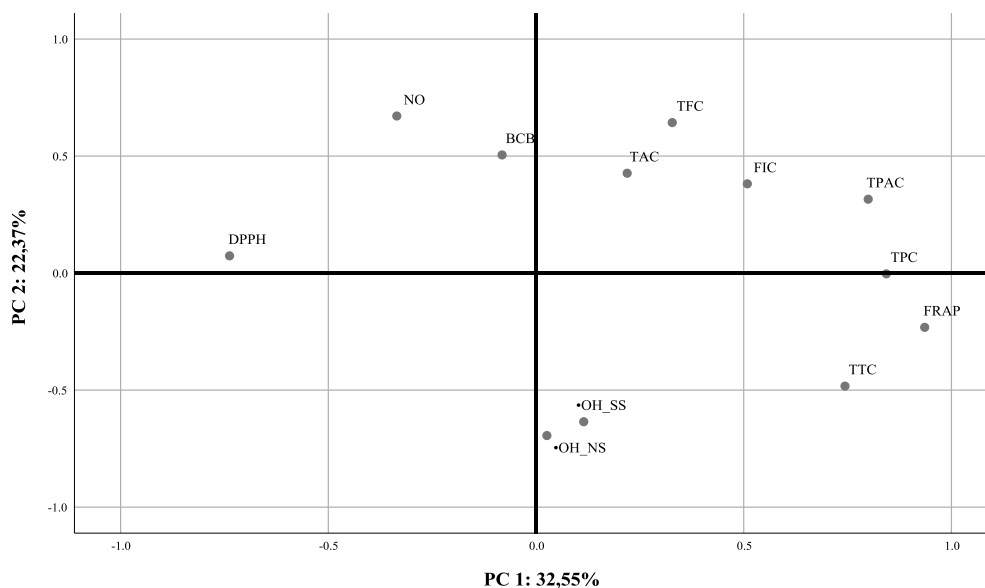
Подаци из литературе показују мању способност неутрализације DPPH радикала од стране екстракта плодова јаребике (Aladedunye и Matthäus, 2014; Olszewska и Michel, 2009). У студији коју су извели Olszewska и Michel (2009), FRAP

антиоксидативна снага екстраката плодова јаребике је била 441,5 $\mu\text{mol/g}$, што је у складу са приказаним резултатима.

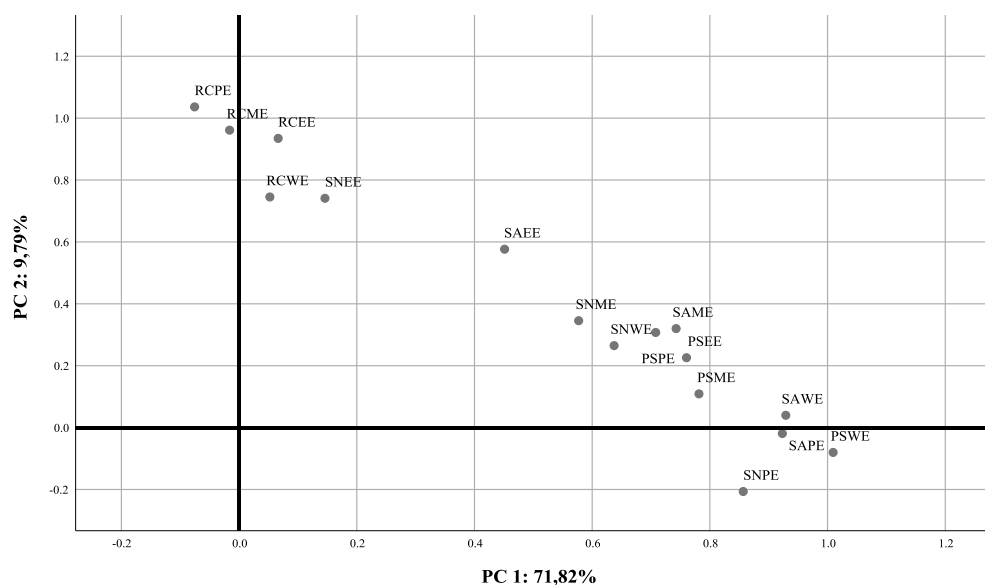
Резултати су показали да екстракти са високим садржајем полифенолних једињења испољавају већу активност у неутрализацији слободних радикала, што потврђује чињеницу да полифеноли имају важну улогу у антиоксидативној активности екстраката. Међутим, поред фенолних, присуство других једињења у екстрактима може допринети њиховој антиоксидативној активности. Типичан пример су екстракти плодова јаребике, који нису имали висок садржај полифенолних једињења, а показали су добру просечну антиоксидативну активност у неутрализацији $\cdot\text{OH}$ радикала и хелатацији металних јона. Осим тога, фенолна једињења једноставније структуре, иако нису ефикасни „хватачи“ слободних радикала, реагују са FC реагенсом, тако да треба узети у обзир да различита полифенолна једињења испољавају различиту антиоксидативну активност, у зависности од њихове структуре или синергистичког ефекта са другим једињењима присутним у екстрактима плодова (Huang и сар., 2005).

4.7. Анализа главних компоненти и корелациона анализа садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката испитиваних плодова

Факторска анализа, тј. анализа главних компоненти (PCA), на основу садржаја полифенолних једињења и резултата испитивања антиоксидативне активности екстраката, урађена је у циљу лакшег тумачења резултата и међусобних веза између садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката, као и веза између самих екстраката плодова (Графикон 1а и б). PCA је у оба приказана случаја открила присуство две компоненте (PC 1 и PC 2) које заједно објашњавају 54,92% укупне варијансе у случају дистрибуције испитиваних варијабли (Графикон 1а), односно 81,61% укупне варијансе ако се посматра дистрибуција екстраката плодова (Графикон 1б).



а)



б)

Графикон 1. Анализа главних компоненти садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстракта испитиваних плодова: а) дистрибуција варијабли – садржај полифенолних једињења и антиоксидативне активности, б) дистрибуција испитиваних екстракта. Укупан садржај фенола (TPC), флавоноида (TFC), танина (TTC), проантоцијанидина (TPAC), антоцијана (TAC), способност неутрализације DPPH радикала (DPPH), азот-оксид радикала (NO), хидроксилних радикала – неспецифична за место везивања (*OH_NS) и специфична за место везивања (*OH_SS), способност хелатације јона гвожђа (FIC), способност обезбојавања β -каротена (BCB) и способност редукције јона гвожђа (FRAP).

На основу PCA анализе у комбинацији са корелационом анализом резултата, показано је постојање корелације између садржаја полифенолних једињења и

антиоксидативне активности екстраката (са статистичком значајношћу $p < 0,05$). Као што се види на Графикону 1а, РС 1 је у негативној корелацији са DPPH IC₅₀, NO IC₅₀ и ВСВ IC₅₀, а у позитивној корелацији са осталим параметрима, док је РС 2 у негативној корелацији са вредностима •OH_{SS} IC₅₀, •OH_{NS} IC₅₀ и FRAP, док су остали параметри били у позитивном региону ове компоненте.

Уочена је статистички значајна корелација између вредности ТРС, ТТС, ТРАС и вредности DPPH IC₅₀, са Пирсоновим коефицијентима корелације (r) који су износили редом: $r = -0,608$, $r = -0,474$ и $r = -0,410$. Између садржаја танина и способности неутрализације NO радикала (NO IC₅₀) показана је значајна корелација ($r = -0,487$), као и између вредности фенола и NO IC₅₀ ($r = -0,309$). Флавоноиди су показали највећу повезаност са резултатима DPPH ($r = -0,304$) и •OH_{SS} теста ($r = -0,321$), док су феноли, танини и проантоцијанидини били одговорни у највећој мери за укупну антиоксидативну снагу екстраката измерену применом FRAP теста (што се види на основу њихове близине на PCA дијаграму – Графикон 1а), са статистички значајним коефицијентима корелације, редом: $r = 0,820$, $r = 0,841$ и $r = 0,671$.

Са друге стране, Графикон 1б показује да су скоро сви екстракти у позитивном региону обе компоненте, што говори у прилог да је већина екстраката показала висок садржај полифенолих једињења повезан са добром антиоксидативном активношћу у испитиваним тестовима. У негативном региону РС 1 били су екстракти RCPE и RCME, који су показали велики потенцијал у неутрализацији NO радикала, док су екстракти SNPE, PSWE и SAPE били у негативној корелацији са РС 2 и показали су задовољавајућу укупну антиоксидативну активност. Сви испитивани екстракти плодова су били међусобно у позитивној корелацији на основу измерених параметара садржаја полифенола и антиоксидативних активности. Показана је статистички значајна корелација између екстраката добијених из исте врсте плодова ($r > 0,56$; $p < 0,05$). Ако посматрамо корелације између различитих биљних врста, екстракти плодова трњине су показали највећи степен корелације са екстрактима плодова јаребике ($r > 0,74$; $p < 0,05$).

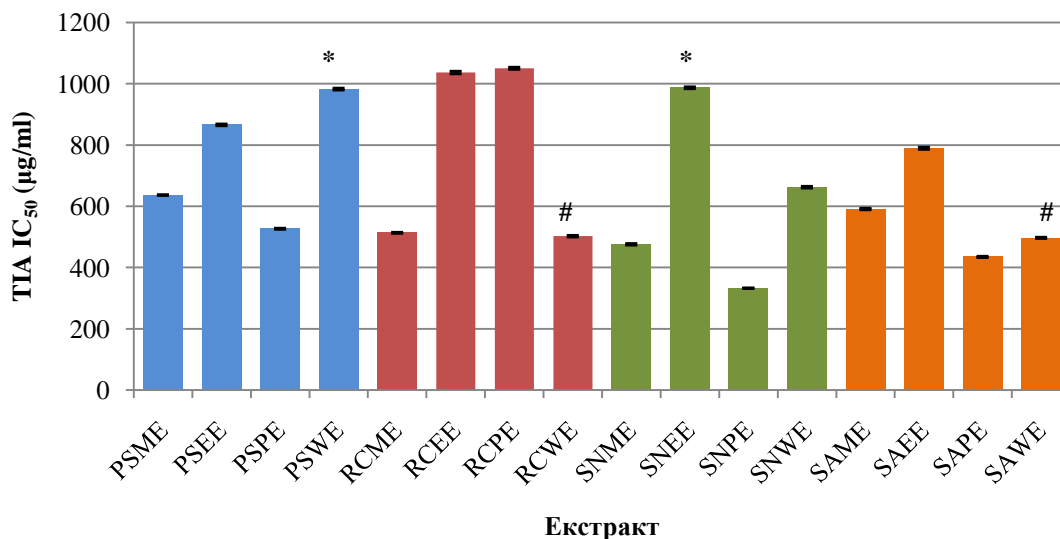
Приказана *in vitro* испитивања садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката урађена су у циљу евалуације потенцијалне примене екстраката као природних извора антиоксидантних и биоактивних једињења у фармацеутским формулацијама за примену на кожи. Сви екстракти су показали одређени ниво антиоксидативне активности, с тим што су се екстракти шипурка

издвојили по својој ефикасности. Међу њима, екстракт RCWE показао се као најефикаснији у неутрализацији NO и •OH радикала и FRAP тесту, а испољио је и добру активност као „хватач“ DPPH радикала, што је последица показаног високог садржаја полифенолних једињења (пре свега фенола, танина и проантоцијанидина), органских киселина и витамина у овом екстракту. Овај екстракт се може инкорпорирати у липофилни крем, као природни извор антиоксиданаса и биоактивних једињења, ради спречавања штетних ефеката оксидативног стреса, превенцији настанка дисбаланса оксиданси/антиоксиданси и успоравања процеса старења.

4.8. *In vitro* испитивање антитирозиназне активности екстраката плодова

Примена природних инхибитора тирозиназе је веома важна код поремећаја меланогенезе, хиперпигментација коже и других проблема повезаних са меланином (Maisuthisakul и Gordon, 2009). Процена антитирозиназног потенцијала испитиваних екстраката даје информацију о њиховој могућој примени као природних извора супстанци са инхибиторним деловањем на ензим тирозиназу у фармацеутским препаратима за примену на кожи, код разних поремећаја повезаних са хиперпродукцијом меланина и у препаратима за избељивање коже.

Као што се види на Графикону 2, сви екстракти показују одређени ниво антитирозиназне активности (IC_{50} вредности у опсегу од $332,86 \pm 1,17 \mu\text{g/ml}$ до $1050,26 \pm 3,78 \mu\text{g/ml}$), иако неколико пута мању активност у поређењу са активношћу коџик киселине (IC_{50} вредност је износила $101,90 \pm 1,08 \mu\text{g/ml}$), односно L-аскорбинске киселине ($164,63 \pm 1,97 \mu\text{g/ml}$). Екстракт SNPE је показао највећи потенцијал у инхибицији ензима тирозиназе (са најмањом вредношћу IC_{50} од $332,86 \pm 1,17 \mu\text{g/ml}$), а затим су следећи по активности били екстракти SAPE ($434,71 \pm 2,44 \mu\text{g/ml}$) и SNME ($475,83 \pm 2,85 \mu\text{g/ml}$).



Графикон 2. Антитирозиназна активност (ТИА) екстраката плодова. Резултати су представљени као средња вредност \pm SD. Применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Tukey's тестом, показано је да између свих узорака постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$), изузев између парова узорака означених * или #.

Код свих испитиваних плодова 45% пропиленгликолни екстракти су показали најбољу антитирозиназну активност, осим код шипурка где је то био водени екстракт (IC₅₀ код екстракта RCWE је износила $502,33 \pm 2,99 \mu\text{g/ml}$). Посматрајући екстракте сваке биљне врсте појединачно, јаребика је показала најбољу просечну активност у овом тесту (са најмањом просечном вредношћу IC₅₀ од $578,03 \mu\text{g/ml}$). У литератури скоро и да нема података о антитирозиназној активности испитиваних екстраката плодова. У једној студији је анализирана антитирозиназна активност воденог екстракта шипурка (без семена), где је активност тирозиназе била смањена за 98,45% у присуству овог екстракта, а овакво деловање приписано је високом садржају фенолних једињења (епигалокатехин, елагинска киселина, *p*-хидроксибензоева киселина) и органских киселина (лимонска киселина) у екстракту (Zossa и сар., 2011).

Резултати студије показали су да се израђени екстракти плодова, као извори природних активних компоненти, могу користити у формулисању фармацеутских препарата за третман хиперпигментација коже и поремећаја повезаних са повећаном синтезом меланина у кожи.

4.9. *In vitro* испитивање примене екстраката плодова на ћелијским културама

Постоје бројне студије у којима је испитиван утицај биљних екстраката на различите типове ћелија, у циљу процене њихове безбедности и ефикасности. Важан део истраживања је процена утицаја екстраката на ћелијску вијабилност и испитивање потенцијалне цитотоксичности екстраката (Ahmad и сар., 2005; Ju и сар., 2004; Kim и сар., 2010; Polydoro и сар., 2004; Silva и сар., 2016). За одређивање иритационог потенцијала, као важног дела испитивања приликом развоја формулација за примену на кожи, користе се алтернативне *in vitro* методе на културама одређених ћелијских линија (Vinardell и Mitjans, 2008). Сходно томе, испитивани су ефекти екстраката плодова на вијабилност фибробласта L-929 ћелијске линије. Експеримент је вршен на фибробластним ћелијама да би се проценила безбедност (потенцијал да иритирају кожу) и ефекти примене екстраката плодова (добитених коришћењем различитих растварача за екстракцију), ради њихове потенцијалне употребе у формулацији фармацеутских препарата за апликацију на кожи. Ефекти екстраката плодова у различитим концентрацијама на ћелијску вијабилност квантификовани су применом МТТ теста, а резултати су приказани на Графикону 3.

У концентрацији од 0,1 mg/ml, екстракти свих испитиваних плодова су били нецитотоксични, пошто је проценат вијабилности фибробласта био већи од 90% у односу на негативну контролу (осим 45% пропиленгликолног екстракта плодова јаребике који је био благо цитотоксичан са процентом вијабилности ћелија од 86,8%). Поједини екстракти шипурка, плодова трњине и зове су показали одређен ниво стимулације вијабилности испитиваних ћелија. Најповољнији утицај на вијабилност фибробласта показали су екстракти шипурка и плодова трњине, код којих је вијабилност ћелија била преко 75% код свих екстраката, у свим испитиваним концентрацијама (у распону вредности од 79,21% до 115,5%). Сви екстракти плодова трњине су имали позитиван утицај на вијабилност фибробласта, док је водени екстракт ових плодова (PSWE) показао највећи ефекат стимулације вијабилности ћелија, са процентом вијабилности фибробласта у опсегу од 107,1% до 115,5% (Графикон 3а). Метанолни екстракт плодова трњине (PSME) у већим концентрацијама од 0,4 и 1,0 mg/ml показао је благу цитотоксичност. Висок проценат ћелијске вијабилности који је износио преко 80% био је у екстрактима шипурка (Графикон 3б). Екстракти RCWE, RCPE и RCEE, добијени из шипурка, испољили су ефекат са високим степеном

вијабилности ћелија (94,51–108,52%), који се одржао и при већим концентрацијама. Екстракт шипурка са метанолом (RCME) је у највећој испитиваној концентрацији од 4,0 mg/ml био благо цитотоксичан, са процентом вијабилности фибробласта од 81,57%.

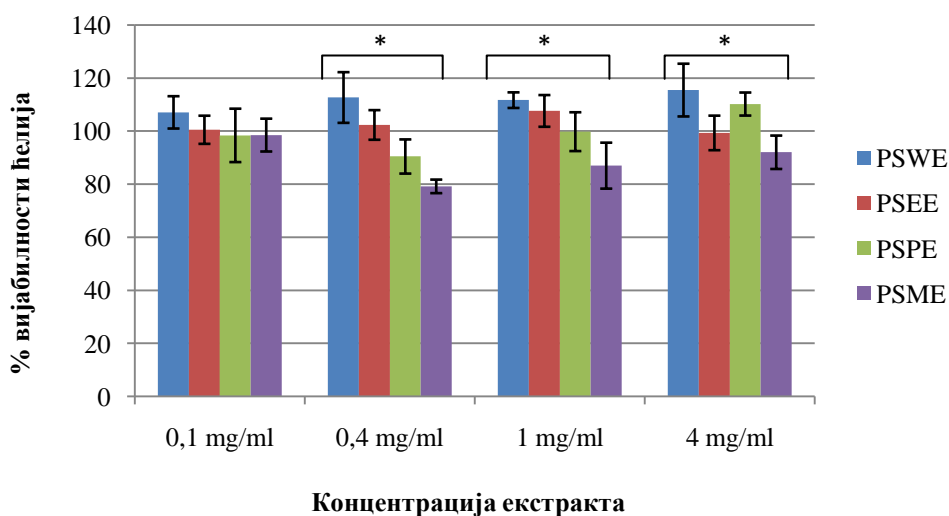
За разлику од шипурка и плодова трњине, мањи проценат ћелијске вијабилности је уочен код екстраката плодова зове и јаребике, када су ћелије третиране појединим екстрактима ових плодова у већим концентрацијама (Графикон 3в и г). Екстракти плодова зове SNWE и SNME су били благо цитотоксични у концентрацијама од 1,0 mg/ml и 4,0 mg/ml, док је екстракт плодова зове са 70% етанолом (SNEE) био благо цитотоксичан само у највећој концентрацији (74,4% вијабилности ћелија). Ако посматрамо екстракте плодова зове, најмања вијабилност фибробласта је била након примене воденог екстракта (SNWE) у највећој испитиваној концентрацији и износила је 65,33%. За разлику од ових екстраката, 45% пропиленгликолни екстракт плодова зове (SNPE) је био нецитотоксичан у свим испитиваним концентрацијама, са процентом вијабилности ћелија већим од 90% (од 101,25% до 109,98%).

Код екстраката плодова јаребике SAWE и SAME је повећањем концентрације екстраката (4,0 mg/ml) уочена појава цитотоксичних ефеката. Само у ниским концентрацијама од 0,1 mg/ml екстракти плодова јаребике нису испољавали цитотоксичност (45% пропиленгликолни екстракт је био благо цитотоксичан), па би у тој концентрацији екстракти били потенцијално безбедни за употребу. У свим испитиваним концентрацијама, екстракт плодова јаребике са 45% пропиленгликолом (SAPE) је доводио до највећег процента вијабилности фибробласта, али у границама благе цитотоксичности (64,81–86,8%).

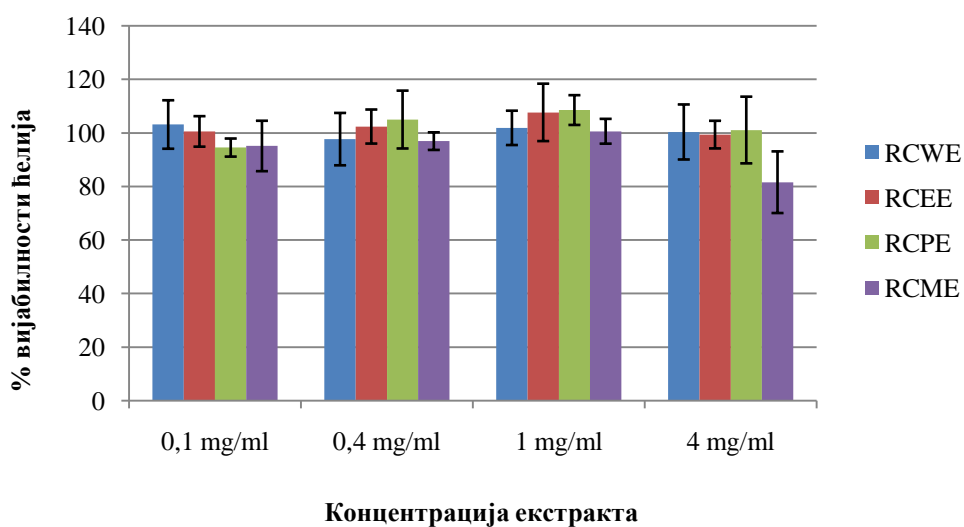
Претходне студије се углавном односе на испитивања цитотоксичности биљних екстраката на различитим линијама туморских ћелија. Показана је антипролиферативна активност екстраката шипурка на ћелије канцера колона, захваљујући високом садржају полифенолних једињења у екстрактима (Jiménez и сар., 2016). Установљена је цитотоксичност 50% етанолних екстраката цветова зове на различите ћелијске линије туморских ћелија, где је највећа биолошка активност екстраката показана у култури ћелија добијених из ћелијске линије мишићних фибробласта (Vučjanović и сар., 2019).

Биолошка активност биљних екстраката зависи од садржаја разних фитохемикалија у њима, које се изолују применом одговарајућих техника екстракције и растварача за екстракцију. Велики број биолошки активних једињења су примарни и секундарни метаболити биљака. Биљни екстракти, тј. активни принципи у њима могу

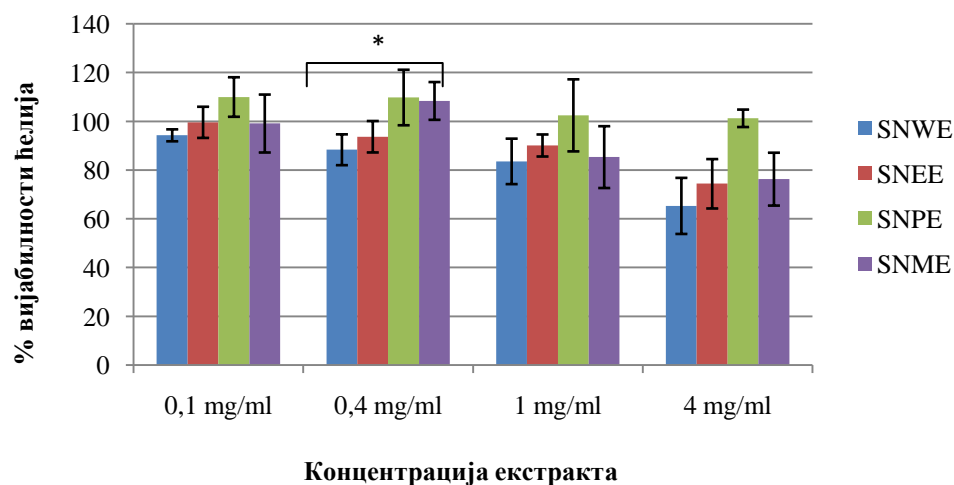
да делују на разне циљне молекуле у ћелијама. У случајевима туморских ћелија, антипролиферативна активност екстракта може бити веома корисна (Vujanović и сар., 2019).



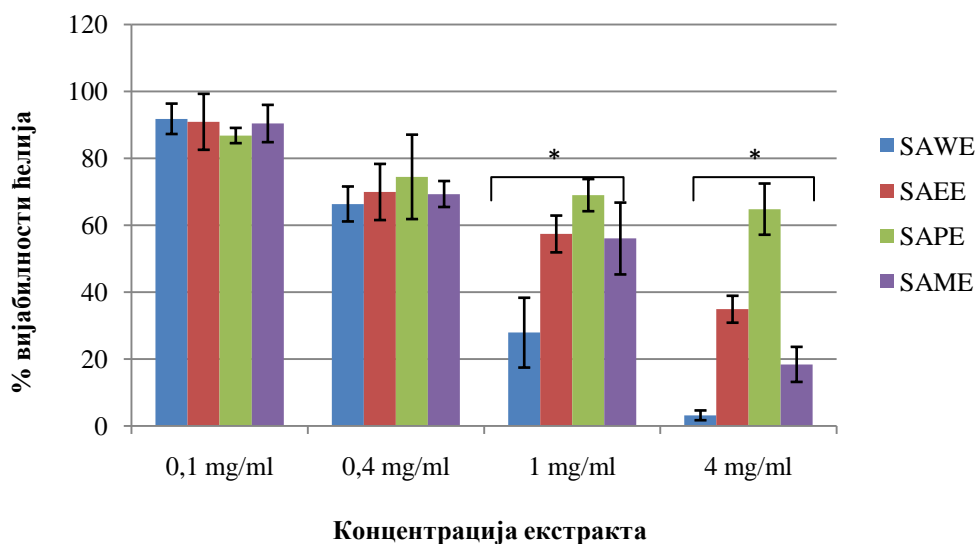
a)



б)



в)



г)

Графикон 3. *In vitro* одређен утицај испитиваних екстраката а) плодова трњине, б) шипурка, в) плодова зове и г) плодова јаребике, у различитим концентрацијама, на вијабилност фибробласта L-929 ћелијске линије (изражен у %). Резултати су приказани као средња вредност \pm SD. Екстракти плодова са различитим растварачима означени * разликују се статистички значајно у вредностима за проценат вијабилности ћелија, што је показано применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест ($p < 0,05$).

Резултати су показали да се екстракти шипурка и плодова трњине могу сматрати безбедним за примену на кожи, а поједини екстракти деловали су стимулаторно на вијабилност фибробласта L-929 ћелијске линије. Што се тиче екстраката плодова зове, они су показали прихватљиву вијабилност у концентрацијама од 0,1 mg/ml, 0,4 mg/ml и 1,0 mg/ml, док је екстракт са 45% пропиленгликолом био нецитотоксичан у свим испитиваним концентрацијама. Екстракти плодова јаребике су довели до најмањег процента вијабилности фибробласта, па су потенцијално безбедни за употребу само у најнижој концентрацији од 0,1 mg/ml. Ако се посматра избор растварача за екстракцију, екстракти са 45% пропиленгликолом су показали најповољнији ефекат на вијабилност фибробласта, а такав његов утицај на ћелије је био најочљивији код плодова зове, где су једино ови екстракти били нецитотоксични у свим испитиваним концентрацијама и чак су деловали стимулаторно на ћелије. Такође, водени екстракти плодова трњине и шипурка испољили су ефекат са високим процентом вијабилности ћелија.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА ДРУГЕ ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.10. Масно уље – значај и садржај у испитиваним биљним врстама

Екстракција и карактеризација садржаја масног уља из плодова и семена испитиваних биљних врста, може бити веома корисна са аспекта њихове повећане употребе у побољшању здравственог стања људи. Семе издвојено из плодова, обично као нуспроизвод приликом прераде плодова, може бити примарна сировина за производњу масног уља. Представља извор биоактивних једињења која се потенцијално могу користити у фармацеутској индустрији.

Семена из разних плодова су богата масним уљима, која садрже висок ниво полинезасићених масних киселина. Јединствени састав масних киселина, често у комбинацији са високим садржајем антиоксиданаса растворљивих у липидима, чини да семе многих дивљих плодова буде корисна сировина за фармацеутску индустрију. Доказана је *in vitro* антиоксидативна активност уља из семена појединих биљних врста (Yang и сар., 2011).

4.10.1. Екстракција масних уља из плодова и семена испитиваних биљних врста различитим техникама екстракције – Soxhlet екстракција и наткритична екстракција

Као једна од метода за добијање масног уља из узорака плодова примењена је Soxhlet екстракција, коришћењем петролетра као растварача. Наиме, очекивало се да петролетар, као један од неполарних растварача за екстракцију, има бољу селективност за екстракцију масног уља у поређењу са поларним растварачима. Soxhlet екстракција је једна од конвенционалних метода за изолацију неполарних компоненти. Широко се употребљава за екстракцију важних биоактивних једињења из различитих природних извора. У многим истраживањима се користи као референтна метода за поређење са новим алтернативним методама, као што је у овом случају метода наткритичне екстракције. Најчешћи фактори који утичу на процес екстракције су својства матрикса биљног материјала, растварач, температура, притисак и време екстракције (Azmir и сар., 2013; Stanković и сар., 2018).

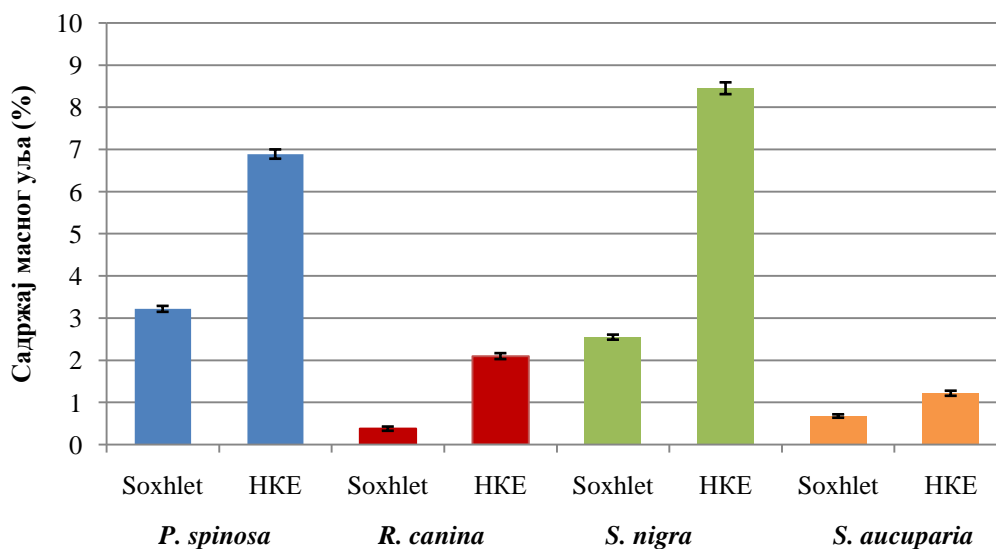
С друге стране, у циљу повећања укупног приноса и селективности изолације биоактивних компоненти из биљног материјала, као и добијања екстраката високог квалитета, коришћена је наткритична екстракција (НКЕ). НКЕ је погодна за екстракцију једињења у краћем временском периоду, уз мањи утрошак растварача. Као идеални растварач за НКЕ сматра се угљеник(IV)-оксид (CO_2). Због ниске поларности идеалан је за екстракцију липида, масти и неполарних компоненти. Главни фактори који утичу на принос НКЕ су особине узорка за екстракцију (садржај воде и величина честица) и параметри процеса екстракције (температура, притисак, време екстракције, проток CO_2 и однос растварача и узорка за екстракцију) (Azmir и сар., 2013). Показано је да се принос уља приликом НКЕ семена шипурка повећавао са смањењем величина честица узорка за екстракцију (Machmudah и сар., 2007).

Поновљени рефлукс наткритичног флуида кроз узорак омогућава комплетну екстракцију. Такође, омогућава екстракцију малих количина узорка (неколико милиграма) за разлику од конвенционалних метода екстракције (Azmir и сар., 2013). Овом екстракцијом се добијају екстракти високог квалитета, без онечишћења екстракта услед заосталог растварача као код конвенционалних метода. НКЕ је идеална за екстракцију термолабилних једињења, јер се врши на ниским температурама што минимизира ризик од термалне деградације активних супстанци. Пошто се екстракција одиграва у одсуству кисеоника, смањује се могућност настанка оксидативног оштећења биоактивних компонента у екстракту, а сама примена наткритичног CO_2 нема штетног утицаја на животну средину (Yang и сар., 2011).

Упоредни приказ садржаја масног уља испитиваних плодова након Soxhlet екстракције и наткритичне екстракције приказан је на Графикону 4. Садржај је изражен у процентима (%), m/m, у односу на масу сувих плодова. Плодови су показали статистички значајне разлике у садржају уља ($p < 0,05$), који се разликовао у зависности од биљног материјала и од методе екстракције.

Пре извођења Soxhlet екстракције, вршена је механичка припрема узорка плодова у контролисаним условима (повишени притисак и температура). Принос масног уља након Soxhlet екстракције плодова трњине (3,22%) и зове (2,55%) је био већи у односу на остале биљне врсте. Шипурак је садржао најмање масног уља (0,38%), а нешто већи садржај су показали плодови јаребике (0,68%). НКЕ је дала веће приносе масног уља након екстракције плодова у односу на Soxhlet екстракцију (1,79 до 5,53 пута веће). Највећи принос уља након НКЕ је био код плодова зове (8,45%),

затим код плодова трњине (6,89%), а мањи садржај уља је био у шипурку (2,10%) и плодовима јаребике (1,22%).



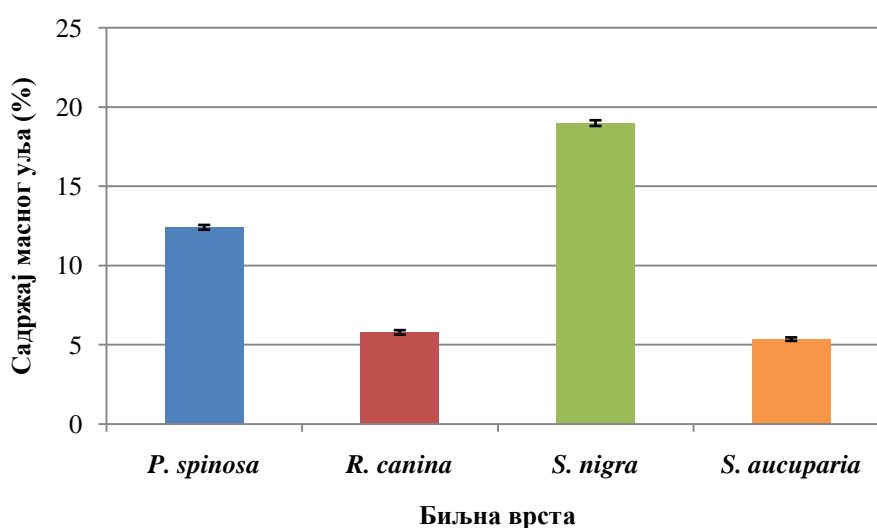
Графикон 4. Садржај уља у плодовима испитиваних биљних врста добијених методом Soxhlet екстракције и наткритичне екстракције (изражен у % (m/m) у односу на масу сувих плодова). Резултати су упоређивани у односу на врсту плода и на избор методе екстракције једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Тукеу's тест и показано је да између свих узорака међусобно постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у садржају масног уља.

У наставку истраживања, пошто су приноси масног уља НКЕ плодова били већи, као и због претходно наведених предности НКЕ, као једне од савремених метода екстракције, изоловање масног уља из семена је рађено само овом техником.



Слика 6. Семе из плодова испитиваних биљних врста коришћено за добијање масног уља методом наткритичне екстракције: 1 – семе трњине; 2 – семе шипурка; 3 – семе зове; 4 – семе јаребике

Принос масног уља након НКЕ из семена (Слика 6), добијеног механичким одвајањем из плодова, био је 1,80 до 4,39 пута већи од приноса уља из плодова код свих испитиваних биљних врста (Графикон 5). На основу овога се може закључити да се масно уље налази у плодовима преваходно у семену, а мање у пулпи. Садржај масног уља у семену кретао се од 5,35% (у семену јаребике) до 18,97% (у семену зове). Семе шипурка садржало је незнатно већи проценат уља у односу на семе јаребике (5,78%), док је висок проценат масног уља (12,40%) нађен у семену трњине. Зова и трњина су показале највећи садржај масног уља и у плодовима и у семену (након Soxhlet екстракције и НКЕ).



Графикон 5. Садржај уља у семену испитиваних биљних врста добијених методом наткритичне екстракције. Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) и *post hoc* Тукеј's тестом, показано је да између свих узорака постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у садржају масног уља.

У научној литератури нема много података за поређење садржаја масног уља у испитиваним плодовима и семену, услед различитих метода екстракције или различитог биљног материјала. Садржај липида у сувим плодовима трњине (добијених сушењем свежих плодова и плодова који су били претходно замрзнути током 3 месеца), износио је од 2,04 до 2,05% (Sikora и сар., 2013), што је мање у односу на резултате из докторске дисертације. Soxhlet екстракција шипурка са *n*-хексаном на 60 °C у трајању од 6 h, дала је принос укупних масти од 1,78% (Ercisli, 2007). Принос НКЕ семена шипурка у истраживању које су извршили Jahongir и сар. (2019) износио је 7,63%, док су Szentmihályi и сар. (2002) добили принос од 5,72%, што је у сагласности

са резултатима приказаним у дисертацији. При вишим температурама (80 °C, на 300 МПа) принос уља из семена шипурка након НКЕ је био већи (15,93%) (Machmudah и сар., 2007).

Barros и сар. (2010) су испитивали садржај масти у плодовима трњине и шипурка пореклом из Португалије, методом Soxhlet екстракције уз примену петролетра као растварача. Добијене вредности су биле 1,98% (за плодове трњине) и 0,65% (за шипурак), што је у складу са приказаним резултатима. У већини случајева, научна литература даје податке за садржај масти у семену зове, док се само неколико научних студија бавило испитивањем садржаја уља у плодовима јаребике. У студији коју су радили Fazio и сар. (2013), количина масног уља изолована из семена зове применом Soxhlet екстракције са комбинацијом растварача (петролетра и хексана) била је 15,9%, што се може поредити са приказаним садржајем уља у семену зове добијеног НКЕ. Садржај липида у плодовима јаребике пореклом из Финске је износио 6,2%, у семену је било 16,5% липида, док је у пулпи плодова нађен најмањи садржај липида (2,3%) (Raspé и сар., 2000).

Добијени резултати дају корисне податке о садржају масног уља у плодовима и семену испитиваних биљних врста. НКЕ се показала ефикаснијом у погледу екстракције масног уља у односу на Soxhlet екстракцију, са већим приносима масних уља, као и бројним другим предностима. НКЕ се користи за екстракцију масних уља из сировина природног порекла, а добијено уље се сматра безбедним за фармацеутску употребу, без трагова органских растварача, високог квалитета и чистоће, за разлику од уља добијених конвенционалним методама екстракције. НКЕ добијају се уља са високим садржајем биоактивних липидних компоненти (полинезасићене масне киселине, токофероли, токотриеноли, фитостероли, каротеноиди, сквален), па се користи за добијање многих природних уља (Akanda и сар., 2012). Добијена масна уља из плодова и семена испитиваних биљних врста се могу користити као сировина у фармацеутској индустрији, у полуврстим препаратима (кремовима) за примену код стања суве коже, атопијског дерматитиса и у превенцији старења коже.

4.10.2. Анализа садржаја масних уља применом техника гасне хроматографије (GC-FID и GC-MS)

У наставку истраживања извршена је анализа садржаја масних уља изолованих из плодова и семена испитиваних биљних врста применом НКЕ екстракције, са посебним акцентом на садржај масних киселина у њима. Анализа је извршена применом технике гасне хроматографије (GC-FID и GC-MS метода). Циљ је био да се испита садржај масних киселина у масним уљима након њихове транс-естерификације, па је претходно извршено метиловање естара масних киселина као би се извршила њихова квалитативна и квантитативна анализа. Посебан акценат је стављен на садржај незасићених масних киселина, нарочито линолне киселине, као есенцијалне масне киселине, јер ће на основу њеног садржаја у масним уљима бити извршена њихова стандардизација и формулација липофилних кремава.

На основу анализе синтетисаних метил естара масних киселина (енг. *Fatty Acid Methyl Esters* – FAMES) добијени су подаци о садржају масних киселина у испитиваним уљима. Применом GC-MS хроматографије извршена је квалитативна и квантитативна анализа масних киселина (њихов релативни удео у масном уљу изражен у процентима). Квантитативна анализа компонената у добијеним масним уљима одређена је применом GC-FID методе и методе спољашњег стандарда. Резултати квалитативне и квантитативне анализе масних уља приказани су у Табели 15.

У добијеним масним уљима из плодова и семена свих испитиваних биљних врста доминантне су биле незасићене масне киселине, тј. њихови естри (FAMES). У уљима из плодова и семена трњине и јаребике доминантне су биле линолна и олеинска киселина, док су у уљима из плодова и семена зове и шипурка биле најзаступљеније линолна и α -линолеинска киселина. Количине осталих незасићених масних киселина биле су у знатно мањем проценту. Линолна киселина је била заступљена у свим масним уљима са уделом од 27,9% до 47,2% у плодовима, а у масним уљима из семена њен садржај је био већи (од 36,4% до чак 65,0%). Олеинска киселина је била присутна у масним уљима из плодова и семена трњине и јаребике (25,1–62,4%). α -Линолеинска киселина је детектована у масним уљима из плодова и семена зове и шипурка (32,7–47,8%). Интересантно је да је масно уље из плодова садржало више олеинске киселине у односу на масно уље из семена. Код шипурка је примећено да је уље из плодова богатије α -линолеинском киселином. Удео незасићених масних киселина је био већи у

уљу добијеном из семена (90,5–93,2%) у поређењу са уљима добијеним екстракцијом плодова (70,1–91,1%). Ако посматрамо плодове, најбогатија незасићеним масним киселинама била су уља из плодова трњине и зове. Посматрајући масна уља из семена, уља из семена шипурка и трњине била су најбогатија незасићеним масним киселинама. У масном уљу из плодова и семена трњине пронађена је палмитолеинска киселина, из групе незасићених масних киселина, која овом уљу даје карактеристичну ноту и издваја га од других уља.

Код свих биљних врста уочено је да су уља из плодова богатија засићеним масним киселинама (8,1–25,7%) у поређењу са уљима из семена. Најбогатија засићеним масним киселинама била су масна уља из плодова и семена јаребике (плод – 25,7%, семе – 9,1%). Уље из плодова јаребике садржало је највећи проценат палмитинске киселине (16,8%) и стеаринске киселине (3,5%).

У претходним студијама, масно уље из семена трњине окарактерисано је са високим садржајем мононезасићене олеинске киселине (43,9%) и малим садржајима палмитинске киселине (5,2%) и стеаринске киселине (2,1%). Још једна важна масна киселина нађена у овом уљу била је линолна киселина са садржајем од 37,0%, што је у сагласности са резултатима ове дисертације. Управо због оваквог садржаја масних киселина (висок садржај незасићених киселина, олеинске и линолне, а низак садржај засићених масних киселина), семе трњине се издваја као потенцијална сировина за изоловање масног уља за примену у фармацеутској индустрији. Такође, са технолошког аспекта, низак садржај α -линолеинске киселине у масном уљу из семена трњине чини га у мањој мери осетљивим на процес оксидације и доприноси његовој већој стабилности (Matthäus и Özcan, 2009).

Количине линолне и α -линолеинске киселине у испитиваном уљу из семена шипурка су биле веће у односу на податке из научне литературе, где је добијени процентуални садржај линолне киселине у овом уљу добијеном Soxhlet екстракцијом из семена шипурка износио 54,05%, а садржај линолеинске киселине је био 19,37%. Палмитинска киселина је била заступљена у концентрацији од 3,34%, а стеаринска киселина у концентрацији од 1,69% (Ilyasoğlu, 2014). Ercisli и сар. (2007) су анализом садржаја масног уља семена шипурка из Турске, добијеног Soxhlet екстракцијом са диетил-етром, добили вредности за садржај незасићених масних киселина у уљу од 91,85%, док је садржај засићених масних киселина био 8,08%. Најзаступљенија је била линолна киселина (51,18%), што је у складу са резултатима приказаним у дисертацији. Још једна студија испитивала је састав масних уља семена шипурка пореклом из

различитих региона Турске и потврдила је присуство линолне киселине у највећој количини у опсегу концентрација од 48,64% до 54,41% (Özcan, 2002).

Machmudah и сар. (2007) испитивали су садржај масних киселина у уљу из семена шипурка добијеном НКЕ применом наткритичног CO₂. Резултати овог експеримента показали су да екстраховано масно уље углавном садржи линолну киселину (47,02–50,25%), а у мањим количинама линолеинску киселину (33,02–40,21%), палмитинску киселину (< 5%) и стеаринску киселину (< 3%), што је у сагласности са резултатима добијеним у овој дисертацији.

Приказани резултати садржаја масних киселина у масном уљу из семена зове су у сагласности са резултатима из литературе. Fazio и сар. (2013) добили су нешто нижи садржај линолне киселине (38,4%) и линолеинске киселине (32,1%). Резултати друге студије у којој је испитивано масно уље из семена зове показали су присуство α-линолеинске киселине у највећој концентрацији од 40,76%, а затим линолне киселине са садржајем од 34,28%. У уљу су нађене и мање количине палмитинске киселине (7,93%) и стеаринске киселине (2,29%) (Dulf и сар., 2013).

Претходне студије су показале да масно уље добијено из семена јаребике НКЕ применом наткритичног CO₂ садржи линолну киселину (62,4%) и олеинску киселину (26,6%) као доминантне масне киселине, а α-линолеинску киселину у занемарљивим количинама (< 1%). Засићене масне киселине су нађене у мањим количинама и то, пре свега, палмитинска киселина (7,1%) и стеаринска киселина (1,3%). Арахидинска и гондоинска киселина су нађене у малим количинама у овом уљу (Yang и сар., 2011). Приказани резултати досадашњих истраживања се у потпуности слажу са подацима из ове докторске дисертације.

Добијени резултати показују да се екстракција масних уља из плодова и семена може успешно изводити процесом НКЕ применом наткритичног CO₂. Масна уља која се добијају су високог квалитета са великим садржајем незасићених масних киселина (енг. *Unsaturated Fatty Acids* – UFAs). Масна уља из семена свих испитиваних биљних врста показала су висок однос UFAs/SFAs, па могу наћи примену као активне компоненте у фармацеутским препаратима (стандардизована на садржај линолне киселине, као есенцијалне масне киселине). Семена из плодова су иначе нуспроизвод који остаје након прераде плодова у индустрији хране (добијање сокова, џемова, алкохолних пића и др.), тако да је са економског и становишта очувања животне средине високо оправдано њихово коришћење. Они се могу ефикасно искористити као сировина за продукцију неконвенционалних масних уља са јединственим садржајем

масних киселина за примену у фармацеутској индустрији. С друге стране, висок садржај UFAs их чини осетљивим на оксидативно оштећење, па је улога антиоксиданаса веома значајна приликом формулације фармацеутског препарата.

Табела 15. Резултати GC-FID и GC-MS анализе масних уља плодова и семена, добијених у процесу наткритичне екстракције (приказане су само компоненте од значаја за приказани експериментални рад). Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) и *post hoc* Tukey's тестом показано је да између свих узорак масних уља постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у укупном садржају незасићених масних киселина (UFAs) и засићених масних киселина (SFAs).

Компоненте	RI*	Садржај изражен у процентима (%)							
		Плод				Семе			
		PS	SA	SN	RC	PS	SA	SN	RC
Тетрадеcanoинска (миристинска) киселина, метил естар (метил миристат)	1722	-	1,3	0,1	-	-	-	-	-
9-хексадеcеноинска (палмитолеинска) киселина, метил естар (метил палмитолеат)	1879	0,8	-	-	-	0,9	0,1	-	-
Хексадеканска (палмитинска) киселина, метил естар (метил палмитат)	1921	5,8	16,8	7,8	9,1	5,7	6,9	6,4	3,2
1-еикозан	1987	-	1,4	0,1	-	0,1	0,2	0,1	
Хептадеканска (маргаринска) киселина, метил естар (метил маргарат)	2028	-	-	-	-	-	-	-	0,1
(Z,Z)-9,12-октадекадиенска (линолна) киселина, метил естар (метил линолеат)	2095	27,9	37,9	42,8	47,2	36,4	65,0	43,7	60,2
(Z)-9-октадеcеноинска (олеинска) киселина, метил естар (метил олеат)	2106	62,4	32,2	-	-	55,4	25,1	-	-
(Z,Z,Z)-9,12,15-октадекатриенска (α -линолеинска) киселина, метил естар (метил линоленат)	2108	-	-	46,2	39,1	-	-	47,8	32,7
Октадеcanoинска (стеаринска) киселина, метил естар (метил стеарат)	2124	1,8	3,5	2,4	3,3	1,2	1,3	1,9	2,0
11-еикозеноинска (гондоинска) киселина, метил естар (метил еикозеноат)	2279	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3
Еикозаноинска (арахидинска) киселина, метил естар (метил еикозаноат)	2329	0,4	1,8	0,2	1,1	0,2	0,4	-	0,9

Табела 15. Наставак

Компоненте	RI*	Садржај изражен у процентима (%)							
		Плод				Семе			
		PS	SA	SN	RC	PS	SA	SN	RC
Докозаноинска (бехенска) киселина, метил естар (метил бехенат)	2531	-	1,1	t	t	-	0,5	-	0,4
Тетракозаноинска (лигноцеринска) киселина, метил естар (метил лигноцерат)	2739	0,1	1,2	t	-	-	-	-	-
Октакозан	2800	0,3	1,3	0,1	-	-	-	-	-
Нонакозан	2900	0,2	1,2	0,1	-	-	-	-	-
3 β ,24S-стигма-5-ен-3-ол (клионастерол)	3351	-	-	t	t	-	-	-	-
Незасићене масне киселине (UFAs)		91,1	70,1	89,0	86,3	92,7	90,5	91,5	93,2
Засићене масне киселине (SFAs)		8,1	25,7	10,5	13,5	7,1	9,1	8,3	6,6

* RI – ретенциони (Kovatz) индекс; t – у траговима (< 0,05%); PS – *Prunus spinosa* L. (трњина); SA – *Sorbus aucuparia* L. (јаребика); SN – *Sambucus nigra* L. (зова); RC – *Rosa canina* L. (дивља ружа).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА ТРЕЋЕ ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.11. Формулација и израда узорака липофилних кремова

Након детаљне претраге литературних података и израде прелиминарних кремова са различитим концентрацијама емулгатора и фактора конзистенције, изабране су формулације са 4,5% емулгатора типа В/У (Abil® WE 09), 2,0% липофилног коемулгатора (Fluidanov™ 20X) и 3,0% пчелињег воска, као фактора конзистенције.

Израђена су четири модел узорка липофилног крема са различитим комбинацијама активних компоненти. На основу претходних резултата испитивања свих екстраката плодова, за инкорпорирање у липофилни крем изабран је водени екстракт шипурка (RCWE). На основу детаљне анализе свих резултата из првог дела експерименталне фазе докторске дисертације (физичко-хемијска анализа екстраката, анализа састава полифенолних једињења, органских киселина и витамина, антиоксидативна и антитирозиназна активност, као и утицаја екстраката на вијабилност фибробласта) закључено је да се овај екстракт показао најпогоднијим за инкорпорирање у липофилни крем. На основу његове антиоксидативне активности (која нам је потребна у циљу заштите масних уља у узорцима липофилних кремова од процеса оксидације) израчуната је оптимална концентрација овог екстракта од 3,5%. Поред тога, кисела природа овог екстракта додатно погодује у формулацији стабилних фармацеутских препарата за примену на кожи.

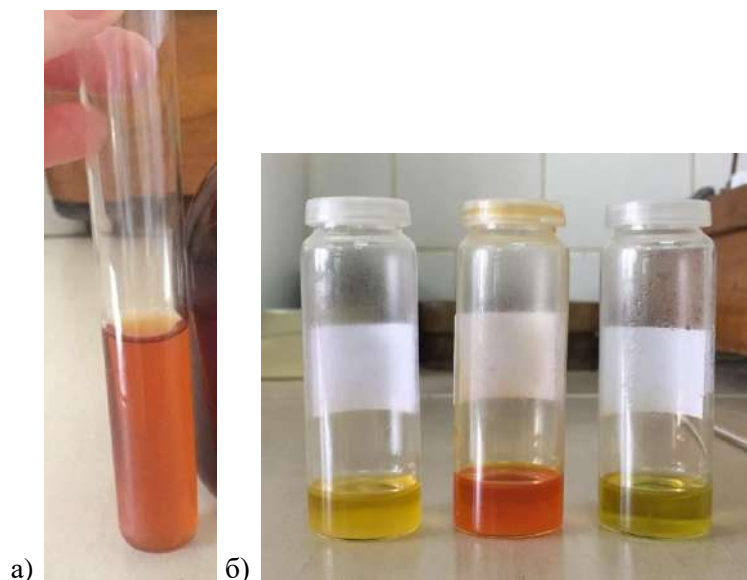
Кремови су садржали различита масна уља добијена НКЕ из семена зове, шипурка и трњине (у концентрацијама које одговарају садржају линолне киселине од 0,815% у формулисаним кремовима) или синтетску линолну киселину (0,815%). Ова концентрација линолне киселине у липофилним кремовима је одабрана ради поређења формулисаних кремова са регистрованим леком (липофилним кремом) на нашем тржишту (који садржи исту концентрацију линолне киселине), а који се користи као помоћна терапија благих до умерено тешких форми промена на кожи у склопу atopijskog дерматитиса. Масно уље из семена јаребике није инкорпорирано у липофилне кремове услед недостатка економичности изолације уља из ових плодова, тј. семена (потребна је велика количина биљног материјала за добијање мале количине масног уља). Нпр. потребно је око 100 g свежих плодова јаребике за издвајање 1 g семена из кога се добија само 0,05 g уља (показан је најмањи принос НКЕ код

јаребике). Поред тога, масна уља из плодова и семена јаребике садржала су најмањи проценат UFAs, а с друге стране највише SFAs у поређењу са осталим уљима.

Предложене и израђене формулације липофилних крема са биљним екстрактом и масним уљима, могу се потенцијално користити као фармацеутски препарати у превенцији и/или третману суве коже, атопијског дерматитиса, код превременог (фото)старења коже, промена и/или поремећаја на кожи узрокованих оксидативним стресом и повећаном продукцијом меланина (хиперпигментација коже).

4.12. Органолептичка процена израђених липофилних крема

Органолептичке карактеристике свих узорака након макроскопског посматрања (боја, мирис, конзистенција, сјај) остале су непромењене након годину дана складиштења на собној температури (22 ± 1 °C), заштићено од директне сунчеве светлости. У наведеном временском року, узорци су остали хомогени и није било знакова фазне сепарације. Коришћени водени екстракт шипурка и масна уља, као активне компоненте у липофилним кремовема, приказани су на Слици 7.



Слика 7. Активне компоненте коришћене у изради узорака липофилних крема: а) водени екстракт шипурка, б) масна уља из семена (редом с лева на десно) трњине, шипурка и зове

Изглед израђених липофилних крема приказан је на Слици 8. Боја узорака крема се разликовала услед различитих масних уља која су инкорпорирана у

кремове. Масно уље шипурка је крему дало карактеристичну пребојеност, док су масна уља трњине и зове у мањој мери обојила кремове. Плацебо и крем са линолном киселином били су беле боје. Конзистенција свих узорака након израде била је получврста, а узорци су били хомогени, сјајни, без знакова фазне сепарације.



Слика 8. Изглед плацебо узорка (1 – PL), активних узорака липофилних кремова са инкорпорираним екстрактом и масним уљима природног порекла (2 – ACSN; 3 – ACRC; 4 – ACPS) и узорка са линолном киселином синтетског порекла (5 – ACLA)

4.13. Процена физичко-хемијске стабилности израђених липофилних кремова у дужем временском интервалу (испитивање „*in use*“ стабилности)

Процена физичко-хемијске стабилности израђених липофилних кремова вршена је студијом природног старења на контролисаној собној температури (22 ± 1 °C), у трајању од годину дана. Физичко-хемијски параметри који су били релевантни показатељи стабилности и чије су се промене пратиле у току времена складиштења узорака били су: рН вредност, електрична проводљивост, као и евентуалне промене у узорцима током центрифугирања. Вредности параметара узорака липофилних кремова су мерене након 7 дана, као и 1, 3, 6 и 12 месеци након израде.

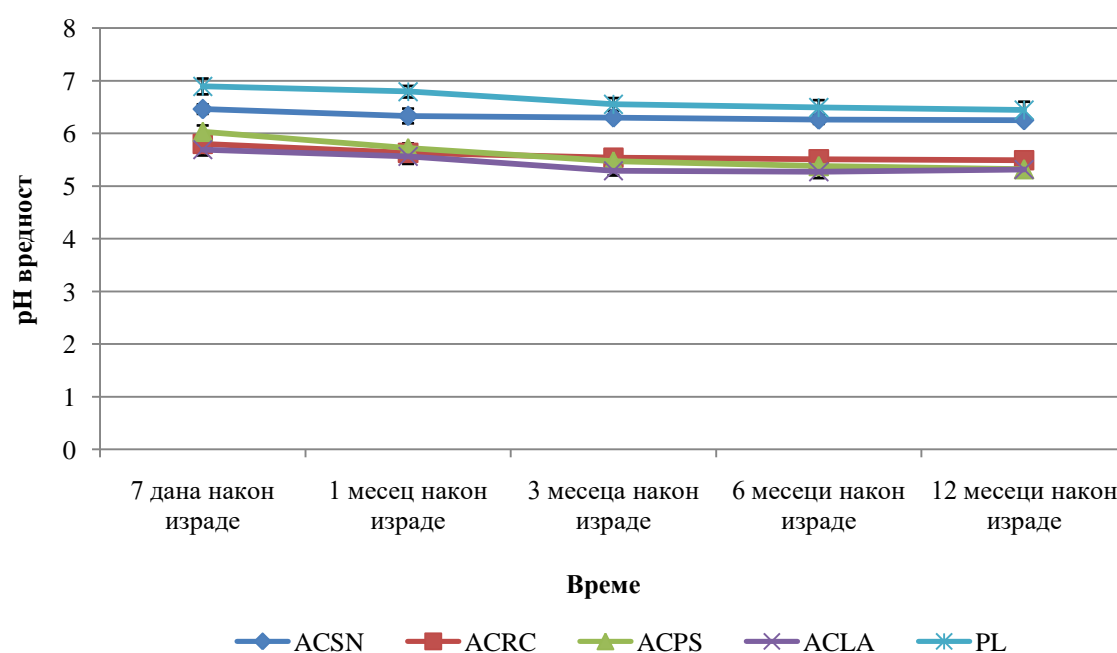
Резултати мерења рН вредности и електричне проводљивости узорака приказани су на Графикону 6. Измерене рН вредности свих испитиваних узорака (Графикон 6а), након израде, као и током целог периода испитивања стабилности од годину дана, биле су у границама препорученим за рН вредности за фармацеутске препарате намењене за примену на кожи и блиске физиолошким вредностима рН коже (Lodén, 2003; Vuleta и

сар., 2012). Измерене рН вредности активних узорака су биле ниже у односу на рН вредности плацебо узорка. Последица инкорпорирања воденог екстракта шипурка у липофилне кремове, тј. кисела природа овог екстракта (Stanković и сар., 2019б) утиче на ниже рН вредности активних кремова у односу на плацебо узорак. Након израде, рН вредност активних узорака се кретала у распону од 5,69 до 6,46, док су рН вредности након годину дана биле незнатно ниже (у границама од 5,31 до 6,25). Плацебо узорак је на почетку испитивања имао рН вредност од 6,89, а на крају испитивања се рН вредност смањила на 6,44. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између рН вредности узорака кремова мерених у временским интервалима 3 месеца *vs.* 6 месеци, као ни између вредности мерених након 6 месеци *vs.* 12 месеци.

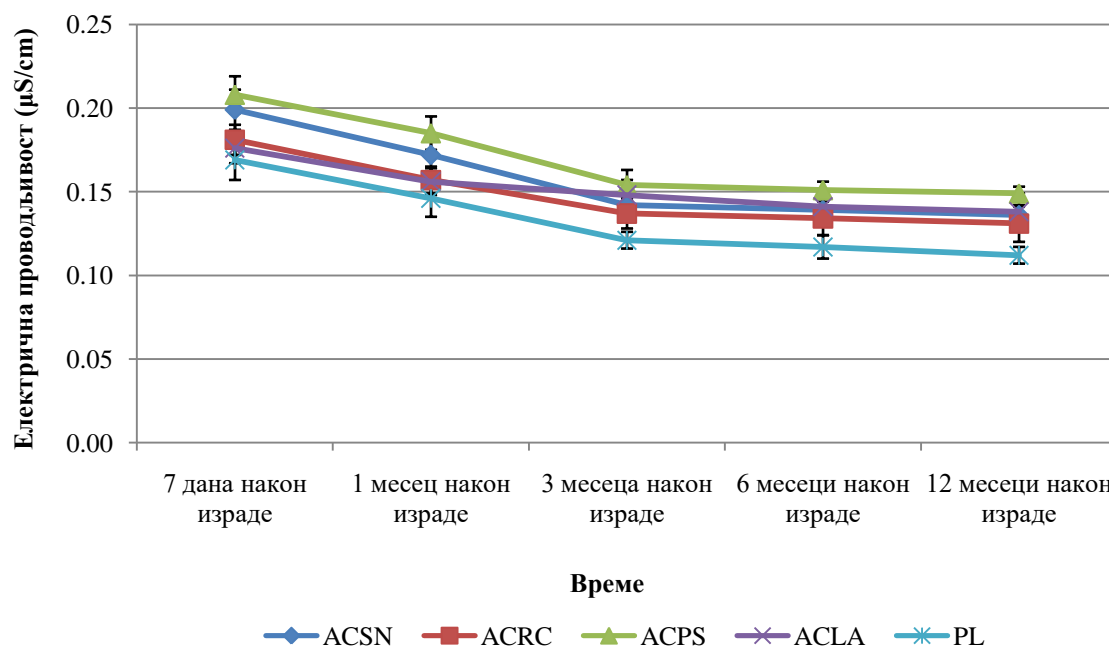
рН регулише баријерну функцију SC-а, синтезу липида у кожи, епидермалну диференцијацију и десквамацију коже. Органске киселине, које су присутне у екстрактима плодова, одржавају заштитну киселу рН вредност и тиме испољавају антимикробну активност, тј. спречавају колонизацију патогених бактерија у кожи. „Нормална“ рН вредност SC-а коже је у киселој области, а повећање рН вредности може довести до развоја патогена у кожи, инфламације коже и појаве разних клиничких симптома, као што су атопијски дерматитис, екцеми, иритантни контактни дерматитис, акне, старење коже, сува кожа (Proksch, 2018; Schmid-Wendtner и Korting, 2006; Wohlrab и сар., 2018). Незнатно смањење рН вредности (мање од 1 рН јединице) узорака кремова током 12 месеци складиштења на собној температури (након 3 месеца даља промена вредности је била без статистичке значајности, $p > 0,05$) указује на задовољавајући степен физичко-хемијске стабилности израђених липофилних кремова.

Кондуктометријска метода, тј. мерење електричне проводљивости узорака током времена, сматра се једном од најосетљивијих метода у предвиђању физичке стабилности и потенцијалних промена у структури фармацеутских емулзија. Чак и мале промене у структури могу се одразити на вредности електричне проводљивости узорака (Masmoudi и сар., 2005). Мерења електричне проводљивости (Графикон бб) потврдила су да су испитивани узорци кремова у основи емулзије В/У типа са малим вредностима за проводљивост (вредности мање од $1 \mu\text{S}/\text{cm}$) (Akhtar и сар., 2011; Jiang и сар., 2013; Lukić, 2014). Емулзије типа В/У обично имају приближно 100 до 1000 пута мању проводљивост од У/В емулзија, пошто је покретљивост јона у овим системима ограничена услед постојања уља које прекида континуитет водене фазе (Prieto и Calvo, 2013).

Након израде, електрична проводљивост активних узорака је била у опсегу од $0,176 \mu\text{S}/\text{cm}$ до $0,208 \mu\text{S}/\text{cm}$, а током целог периода испитивања проводљивост је остала у границама које су у складу са вредностима за проводљивост В/У емулзија. Електрична проводљивост плацебо узорка је током целог периода испитивања стабилности била нижа и кретала се у распону од $0,169 \mu\text{S}/\text{cm}$ на почетку, па све до $0,112 \mu\text{S}/\text{cm}$ на крају испитивања. Постојала је статистичка значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима електричне проводљивости између активних крема и плацебо узорка мерених 3, 6 и 12 месеци након израде. Након 12 месеци електрична проводљивост активних крема се незнатно смањила и имала је вредности од $0,131 \mu\text{S}/\text{cm}$ до $0,149 \mu\text{S}/\text{cm}$. Измерене више вредности електричне проводљивости активних узорака крема у односу на плацебо узорак су последица присуства воденог екстракта шипурка у активним кремевима (присуство хидросолубилних супстанци у екстракту, као што су полифеноли, органске киселине, хидросолубилни витамини и др.). Није било статистички значајне разлике ($p > 0,05$) у електричној проводљивости узорака липофилних крема мерених 12 месеци након израде у односу на вредности мерених 6 месеци након израде, што се може објаснити накнадним структурирањем система (карактеристичним за В/У кремове), које се пре свега односи на промену дистрибуције воде у емулзионом систему и стабилизацију крема. Добијени резултати праћења електричне проводљивости током годину дана складиштења на собној температури од $22 \pm 1^\circ\text{C}$, указују на задовољавајућу физичко-хемијску стабилност испитиваних узорака липофилних крема.



a)



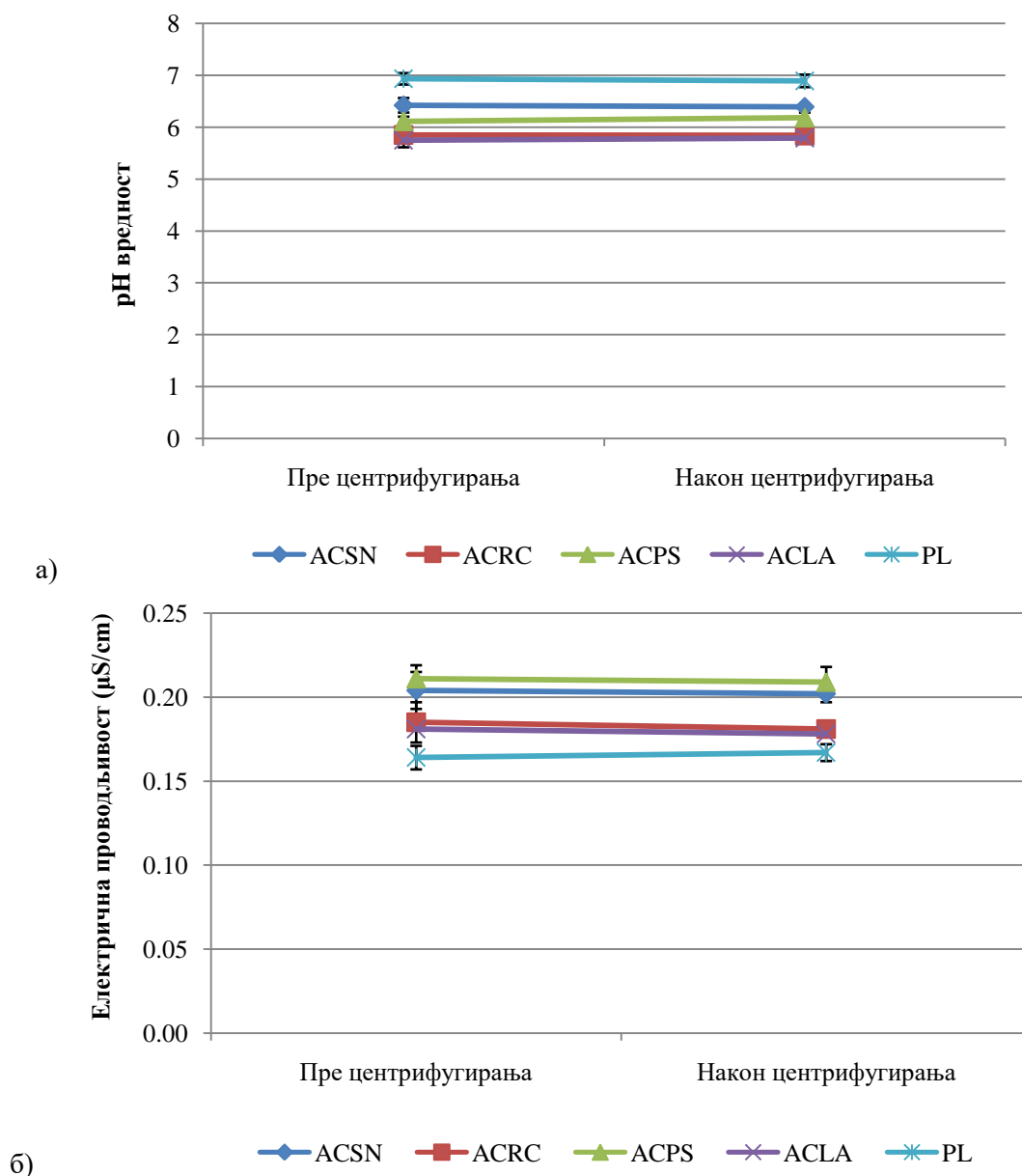
б)

Графикон 6. Вредности рН (а) и електричне проводљивости (б) узорка крема 7 дана, 1, 3, 6 и 12 месеци након израде. Резултати су приказани као средње вредности три мерења \pm SD и упоређивани у односу на примењени крем једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, а промене вредности праћених параметара у различитим временским тачкама анализирани су применом Student's t-теста (ниво значајности $p < 0,05$).

Тест центрифугирања је од велике важности у преформулационим и формулационим истраживањима, јер указује на физичку стабилност фармацеутског препарата. Применом овог теста повећава се утицај гравитације на дисперговане капи унутрашње фазе емулзије и убрзавају процеси који се могу јавити код физички нестабилних емулзионих система (Anchisi и сар., 2001; Arsić и сар., 2012).

Код узорка активних крема, као и код плацебо узорка, није уочено раздвајање фаза након оба циклуса центрифугирања, као ни појава било каквих знакова нестабилности. Сви узорци су задржали своје органолептичке карактеристике као и пре теста центрифугирања. Иницијалне вредности мерених параметара, рН вредности и електричне проводљивости, након центрифугирања се нису статистички значајно промениле (Графикон 7а и б), што потврђује да су израђени узорци остали стабилни. Мерењем рН вредности је утврђено да сви липофилни кремове имају задовољавајућу рН вредност, блиску физиолошкој, у границама које задовољавају критеријуме за препарате за примену на кожи, док електрична проводљивост узорка ($< 1 \mu\text{S}/\text{cm}$) показује да су израђени кремове емулзиони системи В/У типа. Одсуство промена у

вредностима испитиваних параметара показује на задовољавајућу стабилност испитиваних липофилних крема. Физичка стабилност крема је од великог значаја за дефинисање квалитета у одређеним границама и процене рока трајања формулисаног препарата.



Графикон 7. Вредности рН (а) и електричне проводљивости (б) узорка крема пре и након теста центрифугирања. Резултати су приказани као средње вредности три мерења \pm SD и упоређивани у односу на примењени крем једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's тест, а промене вредности параметара пре и након центрифугирања анализиране су применом Student's t-теста (ниво значајности $p < 0,05$).

4.14. Сензорна процена испитиваних узорака липофилних кремова

Сензорна испитивања полуврстих препарата за примену на кожи заснована су на процени унапред дефинисаних сензорних атрибута помоћу одабраног панела испитаника у складу са постојећим стандардима за испитивање сензорних особина и важан су део карактеризације препарата (Almeida и сар., 2008; Lukic и сар., 2012; Zeng и сар., 2008). Пре процене сваки сензорни атрибут је дефинисан описним терминима или скалом, уз прецизно навођење начина на који се врши његово одређивање. Прихватљивост фармацеутских препарата за примену на кожи, у овом случају липофилних кремова, од стране корисника/пацијената (тј. комплијанса) зависи од великог броја фактора, од којих су веома важне органолептичке и сензорне (апликативне) карактеристике препарата (пре свега изглед, мирис, размазивост, осећај након наношења на кожу, итд.). Стога је веома важно да се приликом развоја формулација липофилних кремова, као и осталих фармацеутско-технолошких облика за примену на кожи, узму у обзир и резултати сензорних студија.

У спроведеној сензорној студији испитивани су формулисани липофилни кремови (плацебо узорак – PL; активни узорци – ACSN, ACRC, ACPS и ACLA), као и регистровани (референтни) препарат са тржишта – RP, који је служио за поређење.

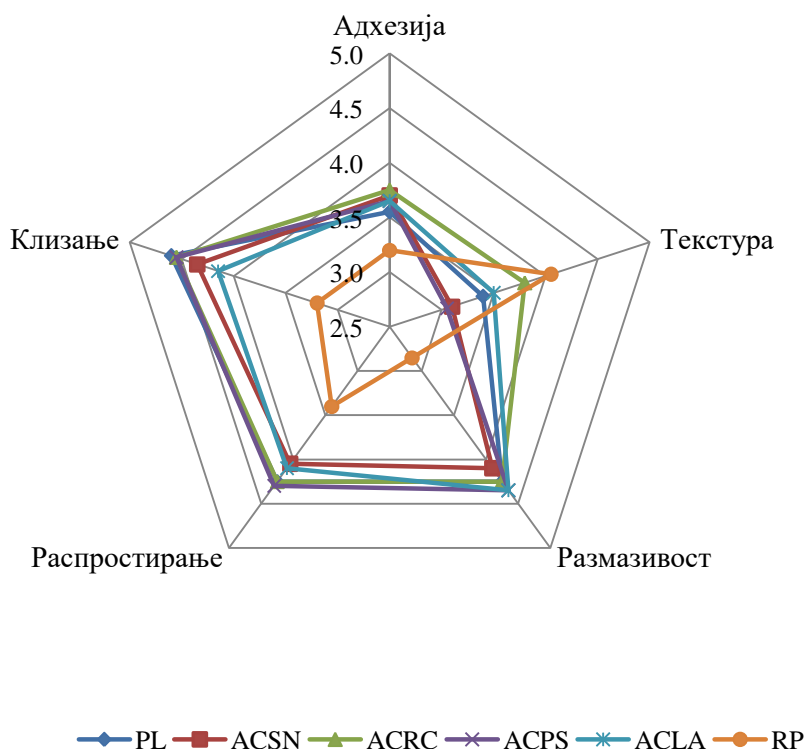
Табела 16. Средња вредност резултата процене сензорних атрибута за липофилне кремове (резултати су приказани као средње вредности двадесет резултата додељених од стране панелиста \pm SD). У сваком реду различита слова означавају постојање статистичке значајне разлике између узорака ($p < 0,05$), показане применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), са *post hoc* Tukey's тестом.

Сензорни атрибути	Узорци липофилних кремова					
	PL	ACSN	ACRC	ACPS	ACLA	RP
Адхезија	3,55 \pm 0,94 ^a	3,70 \pm 0,92 ^a	3,75 \pm 0,91 ^a	3,65 \pm 1,09 ^a	3,65 \pm 1,23 ^a	3,20 \pm 1,44 ^a
Текстура	3,40 \pm 1,23 ^a	3,10 \pm 1,25 ^a	3,80 \pm 0,95 ^a	3,05 \pm 1,50 ^a	3,50 \pm 1,15 ^a	4,05 \pm 1,15 ^a
Размазивост	4,25 \pm 0,55 ^a	4,10 \pm 0,91 ^a	4,25 \pm 0,85 ^a	4,35 \pm 0,81 ^a	4,35 \pm 0,75 ^a	2,85 \pm 1,04 ^b
Распростирање	4,25 \pm 0,72 ^a	4,05 \pm 0,83 ^{a,b}	4,25 \pm 0,79 ^a	4,30 \pm 0,66 ^a	4,10 \pm 0,79 ^{a,b}	3,40 \pm 1,05 ^b
Клизање	4,60 \pm 0,50 ^a	4,35 \pm 0,88 ^a	4,55 \pm 0,60 ^a	4,55 \pm 0,60 ^a	4,15 \pm 0,75 ^a	3,20 \pm 1,15 ^b

На основу резултата процене атрибута за које је коришћена структурирана скала (Табела 16, Графикон 8) може се закључити да се узорак RP статистички значајно разликује по размазивости и клизању у поређењу са осталим узорцима, што се може

приписати разликама у саставу кремова. Такође, статистички значајна разлика у оценама за распрострањање је утврђена између узорака PL, ACRC, ACPS у односу на узорак RP. Иако се формулисани активни кремови разликују само на основу комбинације активних компоненти у њима, уочљиве су биле разлике у појединим атрибутима. Највишу оцену за адхезивност која се процењивала у фази узимања узорка добио је узорак ACRC, а узорци ACPS и ACLA су процењени да се лакше размазују током саме апликације кремова на кожу, док је узорак RP оцењен да се најлошије размазује. Текстура, као једна од сензорних карактеристика кремова процењиваних током њиховог узимања, је имала највећу оцену код узорка RP, а затим код узорака ACRC и ACLA. Код осталих атрибута узорак RP је добио најниже оцене. Узорак ACPS је добио највећу оцену за распрострањање (током апликације), иако између оцена које су добили узорци ACSN, ACRC, ACPS и ACLA за овај атрибут није било статистички значајне разлике. Одсуство статистичке значајности између добијених вредности атрибута за узорке липофилних кремова формулисаних у овој дисертацији, доводи до закључка да различите активне компоненте (екстракт, различита масна уља или синтетска линолна киселина) не доводе до значајних промена у испитиваним сензорним атрибутима.

Резултати добијени за процену сензорних атрибута оцењених описним терминима приказани су у Табели 17. Пошто су сви испитивани кремови (осим RP) били сличног састава, са истом подлогом и разликовали су се у саставу активних компоненти у њима, већина сензорних карактеристика је била слична. Панелисти су описали конзистенцију свих формулација као полуврсту. Узорак RP је описан као густ, да након апликације оставља осећај масноће и благу лепљивост, а његово упијање је оцењено као споро.



Графикон 8. Сензорна мапа испитиваних узорака липофилних крема са атрибутима за које је коришћена структурирана скала

Показано је да ефекти дугорочне апликације препарата, која је неопходна у лечењу хроничних обољења коже, зависе у великој мери од комплијансе пацијената. У тим случајевима прихватљивост саме формулације је предуслов за испољавање клиничке ефикасности препарата. То се пре свега односи на сензорне карактеристике препарата које треба да буду прихватљиве од стране пацијената, па је стога сензорна анализа битан аспект у развоју формулација препарата за примену на кожи. Нпр. комплијанса ће бити мања услед јаког мириса или лепљивости формулације (Almeida и сар., 2008; Lodén, 2003).

Резултати сензорне студије показују да предложене формулације липофилних крема поседују одређене предности у односу на референтни препарат. Наиме, формулације липофилних крема оцењене су од стране панелиста да су мање лепљиве (нису лепљиве) и мање масне током и након апликације, лакше се размазују, њихово упијање у кожу је умерено или брзо. Не остављају на кожи превлаку након апликације или је она умерена код мањег броја панелиста. Добро прихватање липофилних крема

од стране пацијената може допринети побољшању њихове ефикасности, пошто се очекује да ће се будући пацијенти у већој мери придржавати режиму апликације препарата ако он задовољава њихове захтеве и очекивања, нарочито у случајевима хроничних болести са дуготрајним третманима. Сходно томе, формулисани липофилни кремове са комбинацијама активних компоненти могу бити добра алтернатива препаратима са тржишта у лечењу поремећаја суве коже и атопијског дерматитиса или у другим стањима где биоактивни састојци екстраката и масних уља плодова могу бити од великог значаја у лечењу (фотостарење коже услед оксидативног стреса, поремећаји пигментације коже).

Табела 17. Приказ резултата сензорне процене испитиваних узорака липофилних крема за атрибуте за које су коришћени описни термини^а

Фазе субјективне процене	Сензорни атрибут	PL	ACSN	ACRC	ACPS	ACLA	RP
Пре апликације и током узимања узорка	Конзистенција (вискозитет)	Получврста	Получврста	Получврста	Получврста	Получврста	Получврста
	Сјај	Бисерно сјајан/сјајан*	Сјајан	Благо сјајан/сјајан*	Бисерно сјајан/благо сјајан*	Сјајан	Благо сјајан/сјајан*
	Еластичност	Благо еластичан/еластичан*	Благо еластичан	Благо еластичан/еластичан*	Благо еластичан	Благо еластичан/еластичан*	Благо еластичан/еластичан*
Током апликације узорка	Густина	Благо густ	Благо густ	Благо густ	Благо густ	Благо густ	Густ
	Лепљивост	Није лепљив	Није лепљив	Није лепљив	Није лепљив	Није лепљив	Благо лепљив/лепљив*
	Осећај масноће	Благо мастан	Благо мастан	Благо мастан/мастан*	Благо мастан	Благо мастан	Мастан/веома мастан*
	Сјај	Благо сјајан/сјајан*	Благо сјајан	Благо сјајан/сјајан*	Благо сјајан	Благо сјајан	Сјајан
	Упијање (апсорпција)	Умерено/брзо*	Умерено/брзо*	Умерено	Умерено	Умерено/брзо*	Споро
Након апликације узорка	Резидуална превлака	Без превлаке/умерена превлака*	Умерена превлака	Без превлаке/умерена превлака*	Умерена превлака	Без превлаке/умерена превлака*	Умерена превлака/изражена превлака*
	Осећај масноће	Није масна	Није масна/слабо масна*	Није масна/слабо масна*	Није масна	Није масна/слабо масна*	Масна
	Сјај	Благо сјајна	Благо сјајна	Благо сјајна	Благо сјајна	Није сјајна/благо сјајна*	Сјајна
	Осећај хлађења	Не хлади	Не хлади	Не хлади	Не хлади	Не хлади/благо хлади*	Не хлади
	Лепљивост	Није лепљива	Није лепљива	Није лепљива	Није лепљива	Није лепљива/благо лепљива*	Благо лепљива

^а Сваки сензорни атрибут је описан приказаним термином од стране више од 50% испитаника, само су атрибути означени * описани са два термина, где је сваки термин коришћен више од 35% од стране панелиста

4.15. Методе за *in vivo* карактеризацију липофилних крема – биофизичке методе

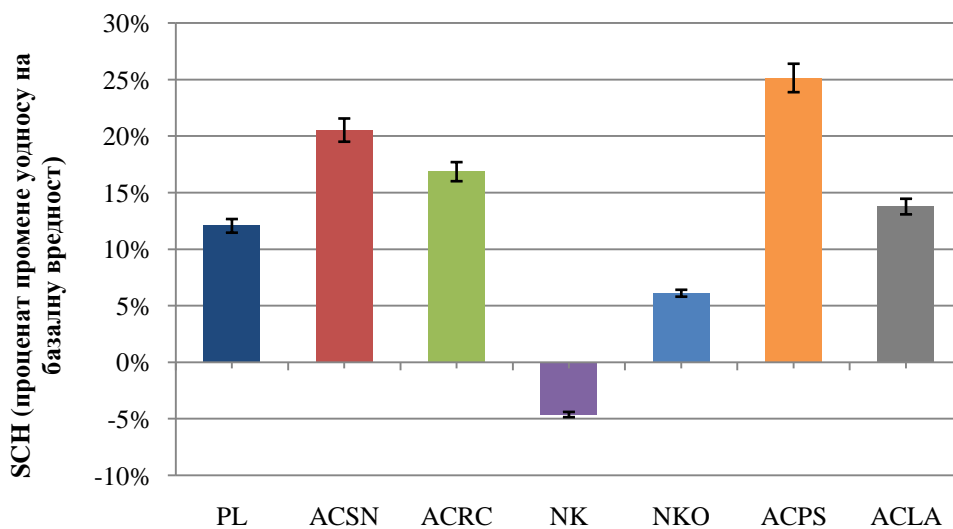
У оквиру овог поглавља докторске дисертације описана су *in vivo* испитивања липофилних крема, која су заједно са свим претходно описаним испитивањима (карактеризација потенцијалних активних компоненти, одабир оптималног фармацеутског облика и састав формулација) важна за дизајн и развој фармацеутских производа намењених за примену на кожи. Применом *in vivo* метода прво је одређен прелиминарни безбедносни профил, односно иритациони потенцијал испитиваних липофилних крема на кожи испитаника. Апликацијом узорака липофилних крема који нису довели до појаве иритације или других локалних нежељених ефеката на кожи, вршена је процена њихове ефикасности у *in vivo* студији са хуманим добровољцима. На основу добијених резултата одабрана је оптимална формулација липофилног крема за потенцијалну примену као фармацеутског препарата за лечење суве коже, код промена на кожи у склопу атопијског дерматитиса (пруритис, ксероза, екцем), болести повезаних са оксидативним оштећењима коже, превременог старења и хиперпигментација коже.

4.15.1. *In vivo* процена безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних крема на кожи здравих хуманих добровољаца

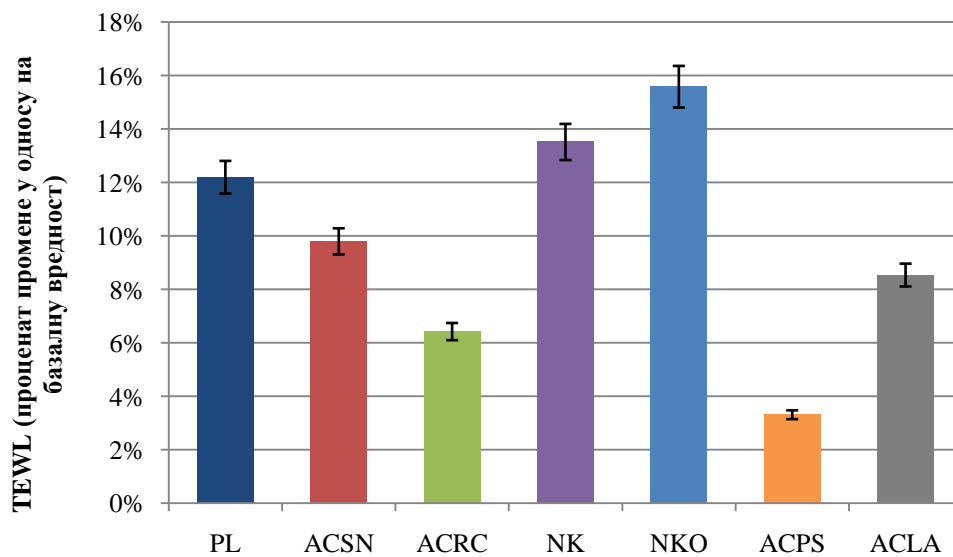
Део процене безбедносног профила је испитивање иритационог потенцијала фармацеутско-технолошких облика за примену на кожи. Испитује се на здравој кожи добровољаца након једнократне апликације узорака и оклузије у трајању од 24 h. На основу промена вредности мерених биофизичких параметара током студије може се утврдити да ли испитивани узорци доводе до појаве нежељених ефеката на кожи и да ли су безбедни за примену (Savić и сар., 2007, 2009; Tasic-Kostov и сар., 2010; Тасић-Костов, 2013).

Испитивање безбедносног профила узорака липофилних крема на кожи, тј. одређивање њиховог иритационог потенцијала, вршено је мерењем одговарајућих параметара пре и након апликације узорака на здраву кожу под оклузијом у трајању од 24 h. Сви учесници студије потврдили су да су поштовали инструкције дате пре почетка студије. На Графикону 9 су приказане процентуалне промене у вредностима

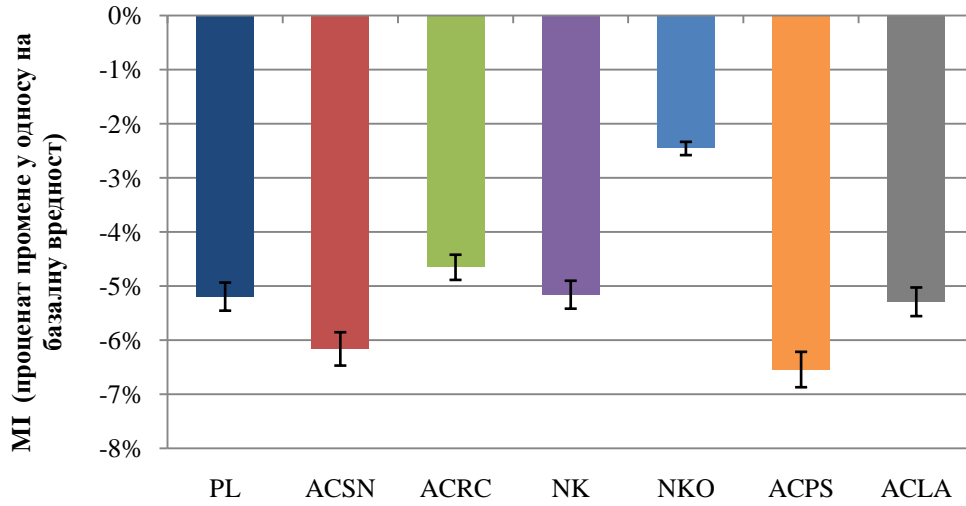
мерених параметара (SCH, TEWL, MI, EI, SSL и pH), пре и након апликације испитиваних узорака на кожу под оклузијом, као и промене вредности мерених параметара за обе контроле, у односу на одговарајуће базалне вредности.



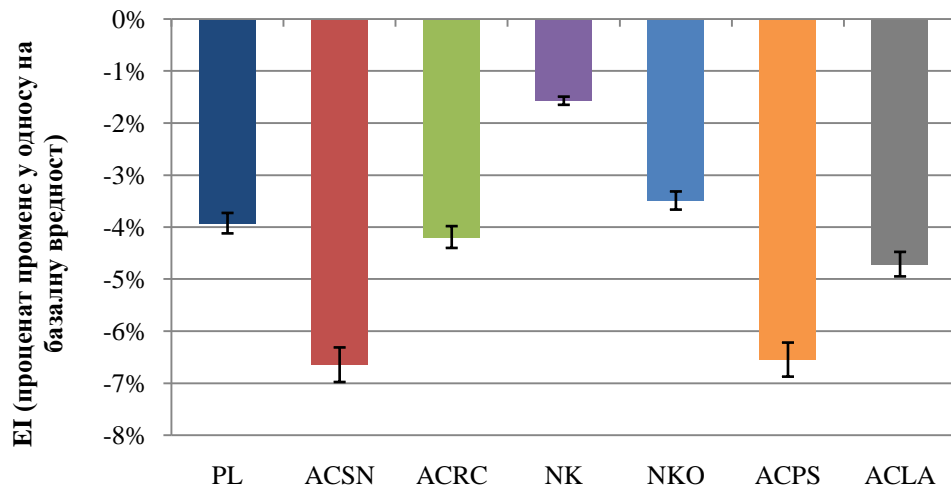
а)



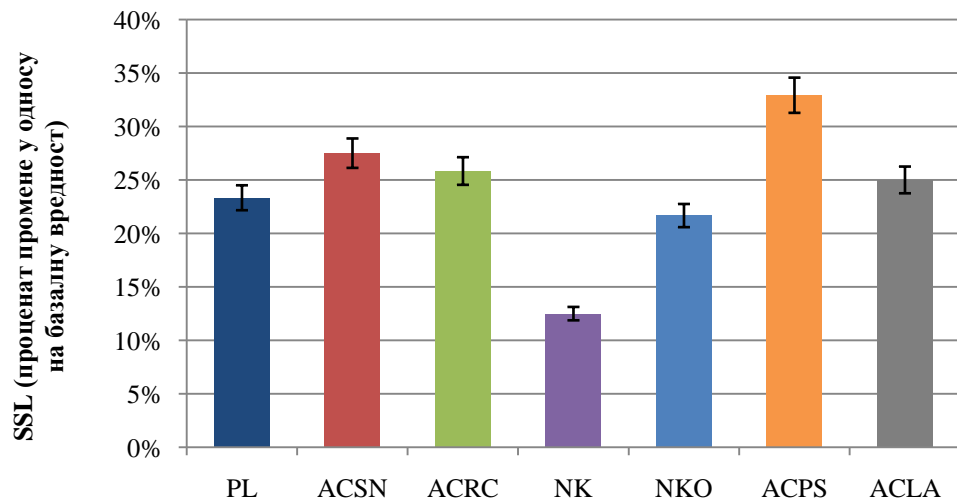
б)



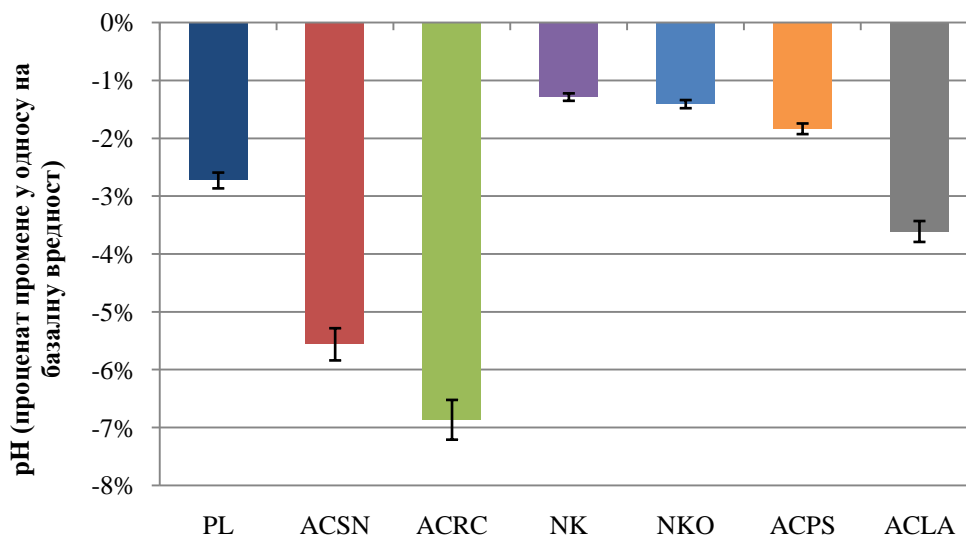
в)



г)



д)



ђ)

Графикон 9. *In vivo* одређени иритациони потенцијал (безбедносни профил) узорака липофилних крема. Резултати су приказани као проценат промене вредности параметара а) SCH, б) TEWL, в) MI, г) EI, д) SSL и њ) pH, у односу на одговарајуће базалне вредности, након апликације узорака под оклузијом у трајању од 24 h. Приликом статистичке обраде података ефекти узорака међусобно као и у односу на одговарајуће контроле (NK и NKO), анализирани су једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's или Dunnett's тест као *post hoc* тест, а ниво статистичке значајности био је $p < 0,05$. Статистичке разлике у вредностима измерених параметара за исти узорак у различитим временским тачкама проверене су Student's t-тестом.

Уочене су промене у хидратацији коже и трансепидермалном губитку воде након оклузије. Дошло је до повећања хидратације епидермалног слоја коже након апликације свих узорака крема у односу на обе контроле (са и без оклузије), што се може видети на Графикону 9а. Статистички значајно повећање вредности SCH било је након примене свих узорака липофилних крема у односу на нетретирану кожу. Благи пораст хидратације уочен је и код нетретиране коже са оклузијом, па се може претпоставити да сама оклузија доводи до повећане хидратације површинског слоја коже, што потврђује већа вредност SCH код контроле под оклузијом у односу на контролу без оклузије. Активни кремови су боље хидратисали кожу у односу на плацебо узорак (узорак ACPS статистички значајно), услед присуства активних компоненти из екстракта (полифенолна једињења, органске киселине, витамини) и масних уља. Такође, узорци ACSN и ACPS су на кожи под оклузијом изазвали значајно

повећање овог параметра у односу на контролу НКО. Ово може бити последица присуства масних уља ових плодова који хидратишу кожу у кратком временском року.

При апликацији узорака PL и ACLA примећено је статистички значајно повећање вредности TEWL (смањење баријерне функције SC-a) у односу на одговарајућу базалну вредност. Претпоставља се да је повећање повезано са оклузијом коже, пошто је дошло до пораста вредности TEWL (статистички значајно) на деловима коже који су означени као нетретирана контрола под оклузијом. Слични ефекти примећени су мерењем параметра TEWL након апликације осталих узорака крема, али повећања нису била статистички значајна (Графикон 9б). С обзиром да су одговарајуће нетретиране контроле НК и НКО показале највећи пораст овог параметра, може се сматрати да сама оклузија нарушава баријерну функцију коже у одређеној мери, док апликација липофилних крема утиче на њено очување (нарочито код узорака ACRC и ACPS). До сличних закључака дошло се и у претходним студијама испитивања безбедности локалне примене различитих узорака (Fluhr и сар., 1999; Savić и сар., 2011; Tasic-Kostov и сар., 2010).

Вредности биофизичких параметара MI и EI (Графикон 9в и г) показале су смањење, док су вредности параметра SSL (Графикон 9д) показале повећање након апликације сваког од испитиваних узорака крема под оклузијом, али без статистички значајне разлике у вредностима између самих узорака, као и у односу на одговарајуће контроле НК и НКО. Вредности параметара MI и EI повезане су директно са појавом иритације и инфламације коже (изазивања црвенила на кожи). Пошто је код свих узорака забележено смањење вредности ових параметара у односу на базалну вредност, ово говори у прилог томе да кремове не изазивају било какве нежељене промене на кожи, у виду иритације коже, црвенила или појаве свраба. Шта више, код узорака ACSN и ACPS дошло је до статистички значајног смањења вредности ова два параметра у односу на базалне вредности. При апликацији узорка ACPS уочено је статистички значајно повећање вредности SSL у односу на одговарајућу базалну вредност, на основу чега се може извести прелиминарни закључак да масно уље трњине које улази у састав овог крема позитивно утиче на садржај липида у кожи, што је од велике важности за третман суве коже.

Ако се посматрају промене рН вредности коже, пре и након апликације испитиваних узорака крема на кожу под оклузијом (Графикон 9ђ), може се закључити да је дошло до смањења рН вредности коже у односу на базалне вредности (које је било статистички значајно код узорака ACSN, ACRC и ACLA). Ово је донекле

било и очекивано, с обзиром да је екстракт шипурка киселе природе (Stanković и сар., 2019б), а присутан је у свим узорцима активних кремова. Ако посматрамо узорке кремова, интересантно је напоменути да је најмање снижење рН вредности било након апликације узорка АСРС, што се може приписати карактеристикама активних супстанци и комбинацији екстракта шипурка и масног уља трњине. Просечне вредности рН коже након апликације испитиваних узорака кремова биле су унутар физиолошких граница (од 4,82 до 5,54), па није дошло до појаве иритације или других локалних нежељених ефеката.

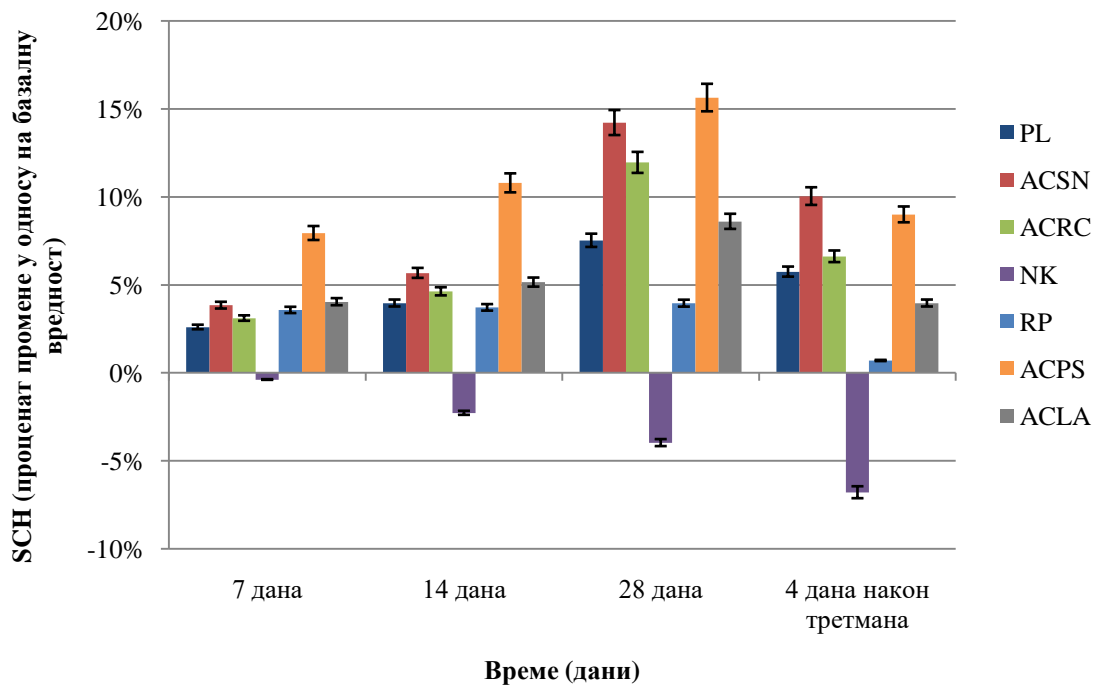
Сви узорци су показали задовољавајући профил безбедности у *in vivo* студији са здравим добровољцима. Узорци кремова су након примене повећали влажност коже, нису изазвали иритацију, ни оштећење баријерне функције коже под оклузијом. Имајући у виду приказане резултате *in vivo* студије безбедносног профила (иритационог потенцијала) липофилних кремова на кожи, испитивани узорци нису довели до појаве нежељених ефеката и могу се декларисати као безбедни за примену на кожи.

4.15.2. *In vivo* испитивање ефикасности липофилних кремова на кожи здравих хуманих добровољаца

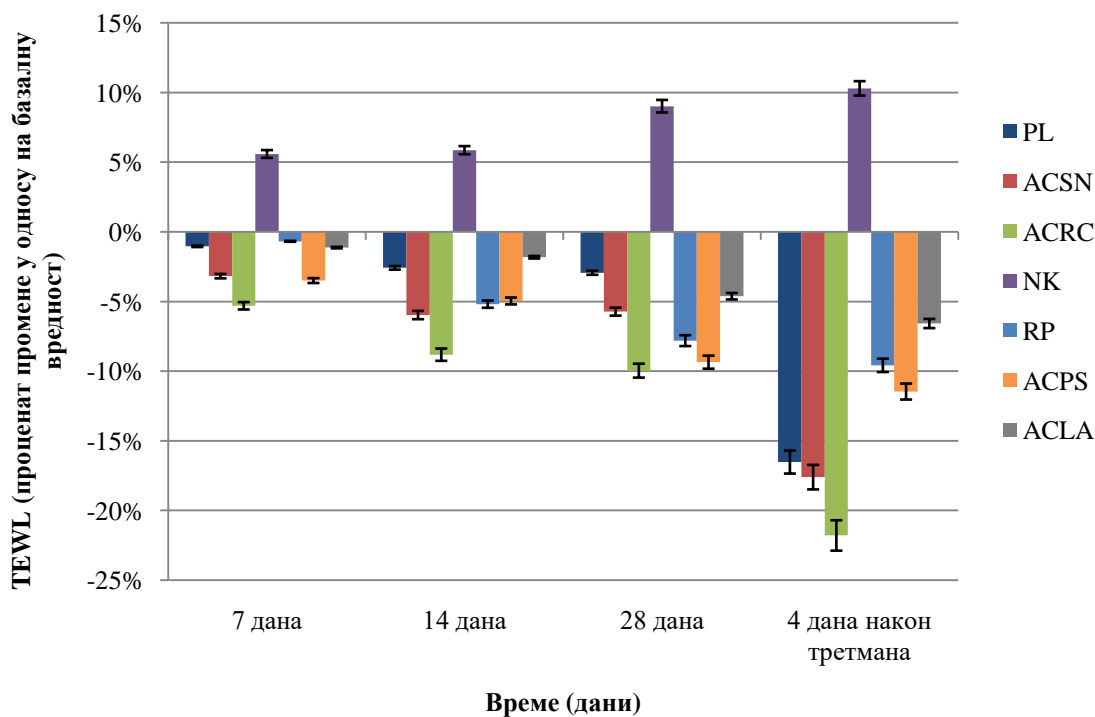
Литературни подаци указују да многи антиоксиданси биљног порекла испољавају антиинфламаторне ефекте на кожи, спречавају фотостарење коже и настанак меланома изазваних штетним деловањем UV зрачења и слободних радикала (пре свега ROS). То указује на могућност њихове примене у превенцији и лечењу различитих поремећаја функције коже (Ађађ и Mukhtar, 2006). Процена ефеката различитих формулација неинвазивним мерењем промена вредности параметара коже рађена је у бројним студијама (Arsiћ и сар., 2012; Curdy и сар., 2004; De Раере и сар., 2000; Fang и сар., 2003; Lukiћ и сар., 2012; Rasul и сар., 2012).

Испитивање ефикасности израђених формулација липофилних кремова рађено је праћењем вредности биофизичких параметара коже (SCH, TEWL, MI, EI, SSL и рН) здравих испитаника, током дуготрајне *in vivo* студије у трајању од 28 дана. Пратиле су се промене параметара пре, у току и након примене испитиваних липофилних кремова, које дају податке о промени стања коже и ефектима кремова. Утицај узорака кремова на биофизичке параметре коже приказан је на Графикаону 10. Мерења вредности

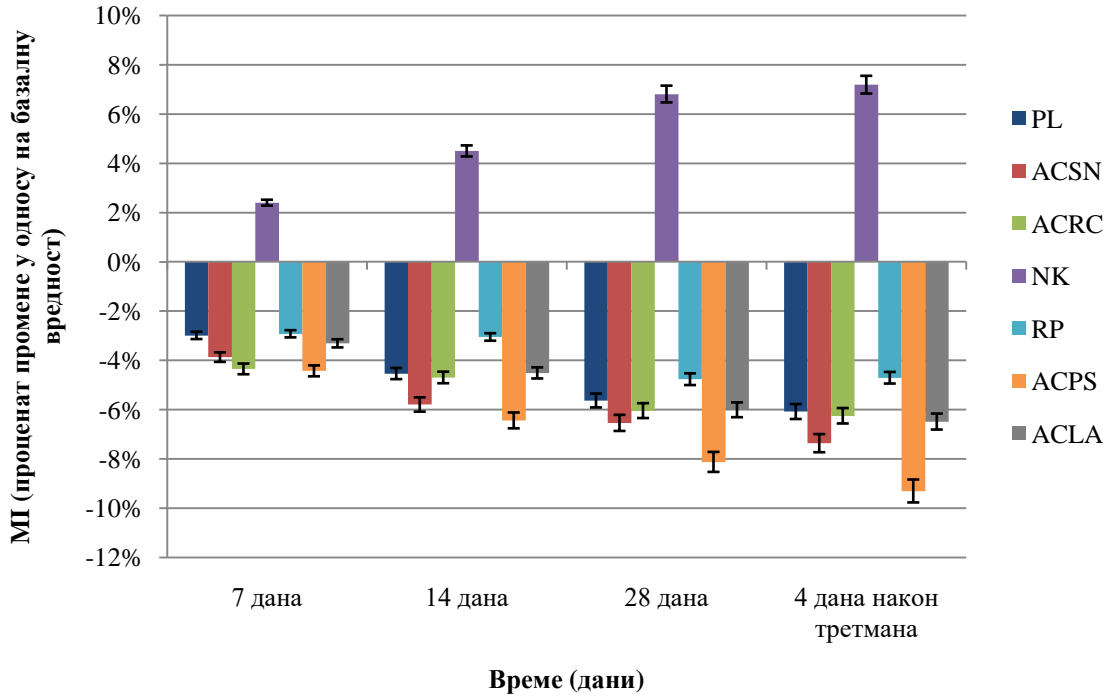
параметара коже спроведена су иницијално (одговарајуће базалне вредности), након 7, 14 и 28 дана апликације испитиваних узорака крема, као и 4 дана након престанка третмана.



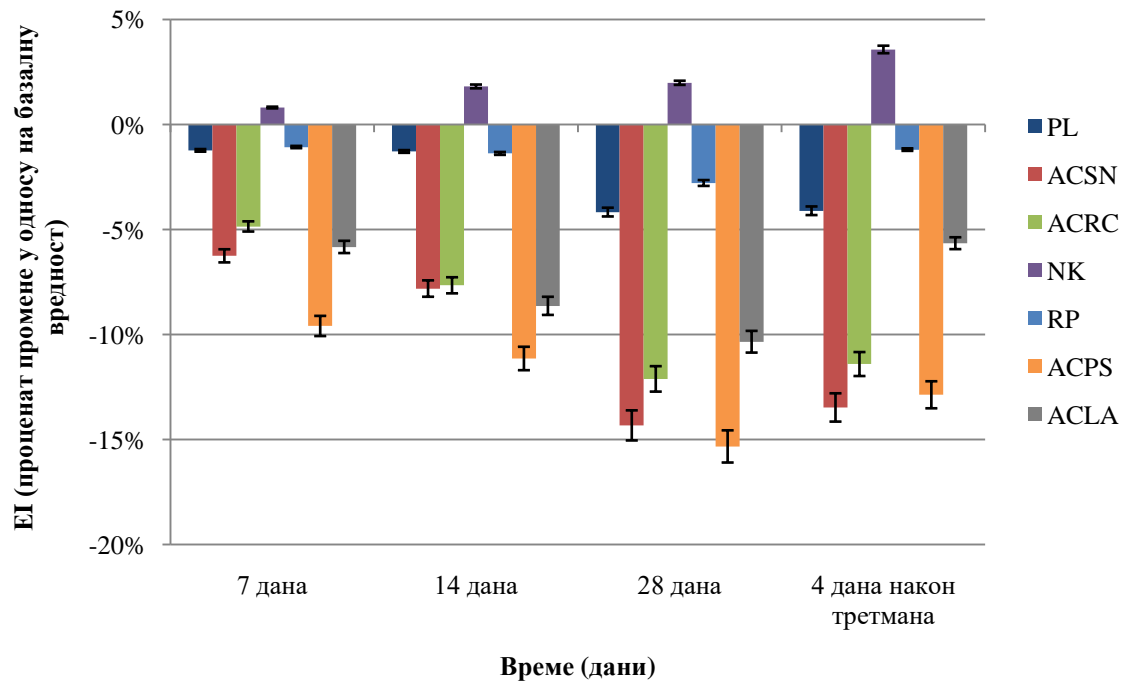
a)



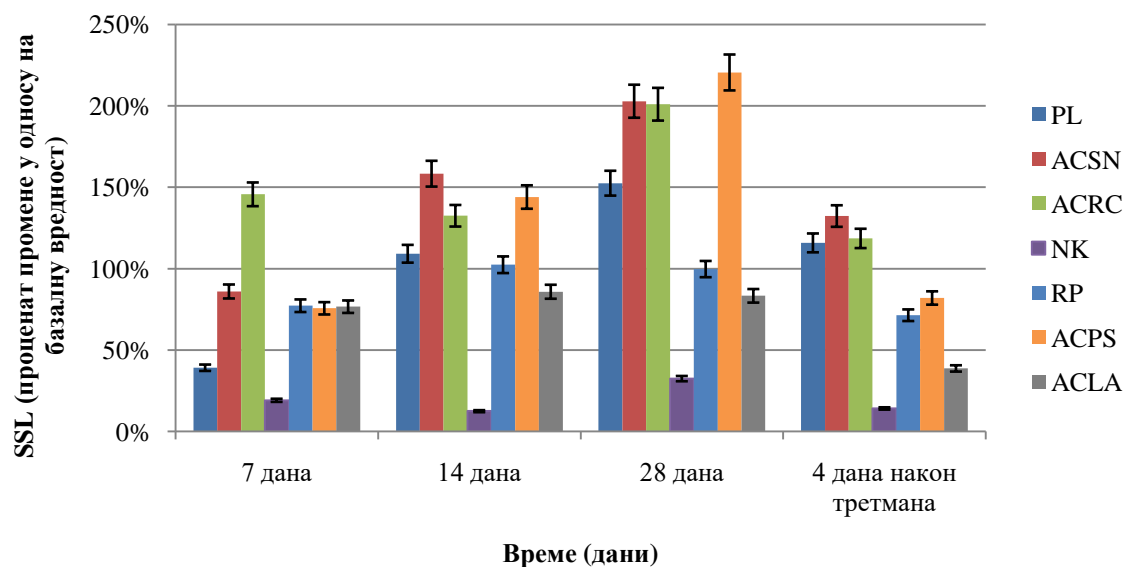
b)



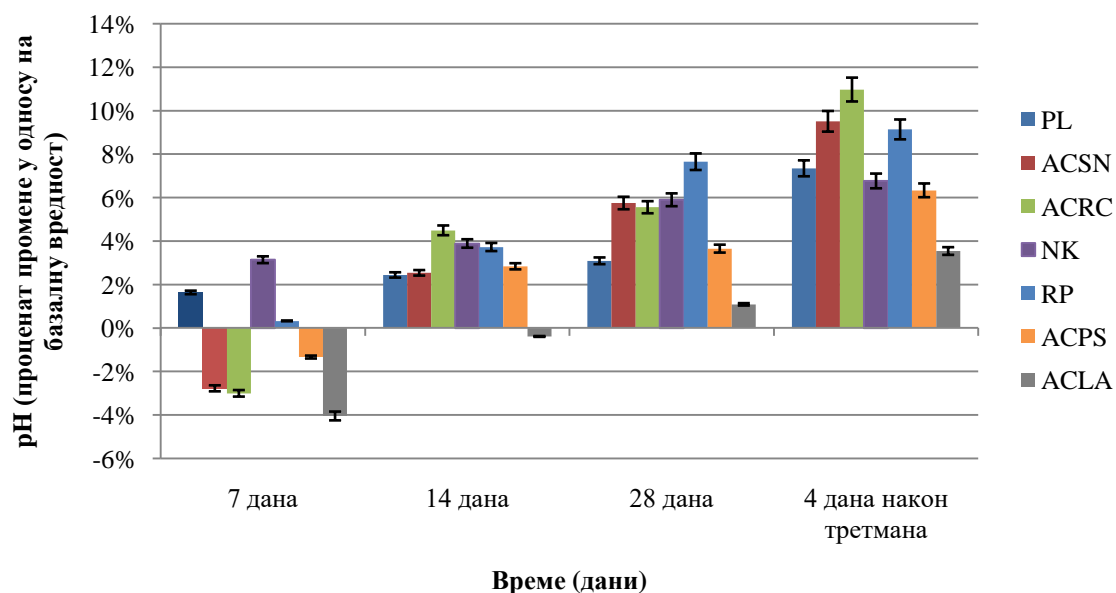
в)



г)



д)



ђ)

Графикон 10. *In vivo* ефикасност примене узорака липофилних крема. Резултати су приказани као проценат промене вредности параметара а) SCH, б) TEWL, в) MI, г) EI, д) SSL и њ) pH, у односу на одговарајуће базалне вредности, након апликације узорака током периода од 28 дана, као и 4 дана након престанка третмана. Приликом статистичке обраде података ефекти узорака крема међусобно као и у односу на одговарајућу контролу (NK), анализирани су једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен Tukey's или Dunnett's тест као *post hoc* тест, а ниво статистичке значајности био је $p < 0,05$. Статистичке разлике у вредностима измерених параметара за исти узорак у различитим временским тачкама проверене су Student's t-тестом.

Хидратација SC-а је од великог значаја за очување баријерне функције коже. Компоненте природног влажећег фактора (NMF) у корнеоцитима доприносе хидратацији коже и обухватају многа једињења, као што су органске киселине, шећери, пептиди, аминокиселине, уреа, глицерол, итд. (Lin и сар., 2018). Агенци за влажење коже могу да мењају количину воде у SC-у, али исто тако могу да утичу на локацију воде у њему. У зависности од тога да ли су хидрофилне или липофилне природе различито утичу на хидратацију коже као последица њихових различитих механизма деловања (Caussin и сар., 2007). Одабир фармацеутско-технолошког облика и компонената формулације (емулгатори, хумектанси, конзерванси, хелирајући агенси и др.), присуство липидних компоненти (есенцијалне масне киселине) и антиоксиданаса, као и физичко-хемијске карактеристике апликованог препарата утичу на његов хидратациони потенцијал (Lodén, 2005).

Електрична капацитивност коже, као одраз степена хидратације коже, процењена је мерењем вредности параметра SCH. Сви узорци активних кремова довели су до повећања хидратације након апликације (Графикон 10а), која је била израженија код узорака са природним активним супстанцама, у односу на нетретирано место и на плацебо узорак. Хидратациони (влажећи) потенцијал кремова са екстрактом и масним уљима плодова, био је већи (статистички значајно) у односу на НК након 28 дана апликације, као и 4 дана након престанка третмана. Узорци ACPS и ACSN су значајно утицали на хидратацију коже у односу на нетретирано место већ после 7 дана апликације. Код апликације ових узорака уочен је значајан пораст влажности коже након 7, 14 и 28 дана, као и 4 дана након престанка апликације, у односу на базалне вредности. Узорак ACPS испољио је најбоље хидратационе ефекте на површински слој коже, значајно веће у односу на плацебо (PL) и референтни препарат (RP), већ након 14 дана његове примене. Након престанка третмана узорцима ACSN, ACRC и ACPS, хидратација коже се благо смањила, али је и даље била статистички значајно већа него након примене узорка RP, као и у односу на нетретирано место. Сама формулација липофилног крема (плацебо узорак) садржи емолијентне састојке који повољно утичу на хидратисаност коже. Додатак биоактивних компонената у виду екстракта и масних уља плодова, значајно доприноси порасту влажећег потенцијала кремова, услед синергистичког дејства полифенолних једињења, органских киселина, витамина из екстракта и липидних компоненти (есенцијалних незасићених масних киселина) присутних у масним уљима. Липофилни крем са екстрактом шипурка и синтетском линолном киселином (ACLA) повољно утиче на хидратисаност коже, али у мањој

мери. Тек након дуже апликације узорка ACLA (након 28 дана) уочена је значајна хидратација коже у односу на контролу НК. Код формулисаних липофилних кремова, плацебо и активних узорака, уочено је значајно повећање вредности SCH у временским тачкама 7 дана vs. 28 дана, као и 14 дана vs. 28 дана, у односу на одговарајуће базалне вредности.

Сува кожа је у већини случајева повезана са нарушеном баријерном функцијом SC-а. Код атопијског дерматитиса и старењем коже, хидратација SC-а опада, а трансепидермални губитак воде расте. Због тога је у клиничкој пракси, мерење параметра TEWL важан индикатор процене интактности кожне баријере, тј. његово повећање указује на нарушавање баријерне функције коже. Препарати намењени влажењу коже смањују пруритис, побољшавају баријерну функцију коже и тиме смањују ризик од настанка атопијског дерматитиса (Lin и сар., 2018; Lodén, 2003). Добијени резултати показали су да је дошло до смањења вредности TEWL током трајања студије код свих узорака кремова (Графикон 10б). Код активних кремова ACSN, ACRC и ACPS постојала је статистички значајна разлика у вредностима TEWL у односу на нетретирану контролу већ након 7 дана примене и одржала се током целог периода примене узорака, као и 4 дана након престанка третмана. Апликација узорка RP је допринела значајном смањењу вредности TEWL у односу на НК након 14 дана апликације, док је код узорака кремова са ACLA и PL то постигнуто након 28 дана. Добијени резултати су показали да је дошло до значајног смањења вредности TEWL након апликације узорака ACRC и RP у односу на одговарајуће базалне вредности у свим временским тачкама (након 7 дана, након 14 дана, након 28 дана и 4 дана након престанка апликације). Код узорака ACPS, ACSN, ACLA и PL уочено је значајно смањење вредности TEWL у поређењу са базалним вредностима, 4 дана након престанка третмана (кремови са масним уљима семена зове и шипурка су показали значајну разлику у вредностима TEWL у поређењу са кремом који је садржао синтетску линолну киселину). Добијени резултати показују продужено повољно дејство свих липофилних кремова на баријерну функцију коже, које се примећује и након престанка апликације истих. Третман ниједним од испитиваних узорака кремова није довео до нарушавања баријерне функције коже, већ је утицао на њену репарацију и очување чак и након престанка њихове примене (код свих испитиваних узорака показано је значајно смањење вредности TEWL у односу на базалне вредности 4 дана након престанка примене).

Параметар МI је испитиван у циљу прелиминарне процене способности крема да утичу на боју коже, да доводе до избељивања коже или смањивања хиперпигментације коже. Проналазак нових, природних агенаса за избељивање коже и третман хиперпигментација добија на значају последњих година, због бројних нежељених дејстава и токсичности са којима се повезују поједине супстанце за избељивање (хидрохинон, коџик киселина и др.) (Ebanks и сар., 2009; Loizzo и сар., 2012). Сонда Mexameter[®] има широку примену у евалуацији поремећаја синтезе меланина у кожи, квантификује и врло мале промене у боји коже и даје прецизне податке који се могу користити у клиничким испитивањима као потврда дијагнозе поремећаја пигментације (Park и сар., 2006).

Током *in vivo* студије испитивања ефикасности липофилних крема дошло је до смањења вредности параметра МI након апликације узорака (Графикон 10в). Након првих 7 дана апликације узорака крема уочавају се статистички значајне разлике у вредностима параметра МI у поређењу са нетретираним местом. Активни кремови који су садржали комбинације екстракта шипурка и масних уља плодова, показали су већи утицај на смањење МI у односу на плацебо крем и референтни препарат. Овај тренд смањења вредности параметра МI се наставио до краја студије, чак и након престанка апликације крема, а најизраженији је био код узорка ACPS (код овог крема је показано статистички значајно смањење вредности МI у свим временским тачкама у односу на базалне вредности). Значајно смањење након другог (након 14 дана), трећег (након 28 дана) и четвртог (4 дана након третмана) мерења у односу на прво мерење (након 7 дана) уочено је након примене крема ACPS и ACLA. Након 14 дана примене, узорак ACPS доводи до значајног смањења вредности МI у односу на плацебо узорак и референтни препарат. Пад вредности параметра МI указује на промену боје коже, односно њено избељивање (посветљивање) након апликације крема. Није било статистички значајне разлике у вредностима параметра МI након престанка примене крема у односу на вредности измерене након 28 дана њихове примене.

Добијени резултати су у складу са *in vitro* испитивањем антитирозиназне активности (Stanković и сар., 2019б), у коме је потврђена активност екстракта шипурка (који је присутан у узорцима активних липофилних крема) у инхибицији ензима тирозиназе који учествује у синтези пигмента меланина. Такође, линолна киселина (чиста или у саставу масних уља) инхибира меланогенезу и активност тирозиназе и утиче на пигментацију коже тако што стимулише десквамацију епидермалног слоја

коже. Студије са линолном киселином су показале њен ефекат посветљивања хиперпигментација индукованих UV зрачењем (Ebanks и сар., 2009). Комбинација екстракта шипурка и масних уља плодова би потенцијално могла да се употреби у фармацеутским препаратима за третман хиперпигментација коже (индукованих UV зрачењем или оксидативним стресом) и других поремећаја повезаних са повећаном синтезом меланина.

Резултати студије су показали да апликација крема доводи до смањења вредности EI (Графикон 10г), параметра који је мерен у циљу процене настанка иритације коже након апликације узорака (иритација коже је повезана са повећаним вредностима овог параметра). Смањење вредности EI након третмана активним узорцима (ACSN, ACRC, ACPS и ACLA) је било статистички значајно у односу на нетретирано место, али и у односу на референтни крем, током 28 дана примене крема. Такође, статистички значајна разлика је примећена у вредностима EI након примене активних крема ACSN, ACRC, ACPS и ACLA у поређењу са одговарајућим базалним вредностима. Након 7 дана апликације крема уочено је значајно смањење вредности EI код узорка са масним уљем трњине у односу на узорак са синтетском линолном киселином. Пад вредности EI након примене плацебо узорка је, иако не статистички значајан у односу на одговарајуће базалне вредности, повезан са повољним карактеристикама самих састојака подлоге, емулзије В/У (емулгатора, коемулгатора и емолијенаса), као предложеног носача за активне компоненте добијене екстракцијом из плодова и семена. Смањење вредности параметра EI након третмана узорцима крема указује на задовољавајући безбедносни профил испитиваних липофилних крема, активних компоненти, као и састојака подлоге, што је потврђено у претходној студији процене иритационог потенцијала крема.

Интерцелуларни липидни матрикс, који се углавном састоји од церамида, слободних масних киселина и холестерола, утиче на пропустљивост кожне баријере и очување баријерне функције коже. Дужина ланаца и степен zasiћености масних киселина важни су за репарацију оштећења кожне баријере (Jia и сар., 2018; Lin и сар., 2018). Сува кожа код пацијената са атопијским дерматитисом је последица смањене хидратације SC-а и смањеног садржаја површинских липида коже (Sator и сар., 2003). Фармацеутски препарати који би се користили у третману ових стања коже треба да врате хидро-липидну равнотежу и омогуће очување хидро-липидног филма на кожи.

У прилог томе, након апликације свих узорака липофилних крема садржај површинских липида био је повећан (Графикон 10д). Узорак ACRC је већ након 7 дана

примене утицао на значајно увећање садржаја липида у односу на нетретирано место. Статистички значајно увећање вредности параметра SSL код свих апликованих узорак постигнуто је након 14 дана њихове апликације у односу на нетретирано место. Након 28 дана примене крема, узорци са масним уљима из плодова су се издвојили по способности да побољшају липидни статус површинског слоја коже у односу на нетретирану контролу, референтни препарат и узорак са синтетском линолном киселином. Вредности SSL код ових узорак биле су значајно веће након примене у трајању од 28 дана у поређењу са вредностима након примене током 14 дана.

Ово доприноси запажању да масна уља изолована из природних извора одговарајућим методама екстракције и стабилована природним антиоксидансима, инкорпорирана у оптималну подлогу, имају значајан потенцијал за примену у лечењу суве коже и симптома повезаних са сувом кожом. Након престанка апликације крема, садржај липида коже се незнатно смањило, али ипак је остао већи у односу на НК. Код узорак ACRC и ACPS вредности SSL након престанка третмана су биле статистички значајно веће у поређењу са базалним вредностима. Садржај себума на испитиваним местима унутрашњих страна подлактица је природно низак, тако да је позитиван утицај крема на стварање себума очигледан.

У оквиру *in vivo* студије испитивања ефикасности липофилних крема праћен је и параметар рН коже (Графикон 10ђ). Сматра се да рН коже утиче на стварање липида у кожи и на очување њене баријерне функције (Lodén, 2003). Добијени резултати показују да је након 7 дана дошло да смањења рН вредности у односу на базалне вредности након апликације формулисаних активних липофилних крема (без статистички значајних разлика у вредностима параметра између крема). Даљом апликацијом узорак активних крема, као и после престанка њихове апликације, рН вредност се повећава. Промене у рН вредностима коже могу се објаснити утицајем рН вредности самих узорак крема, али и рН вредностима активних компоненти. Након апликације крема са екстрактом шипурка, долази до ослобађања киселих супстанци (пре свега органских киселина) које иницијално доводе до смањења рН вредности коже. У складу са овим, иницијално смањење рН вредности коже није документовано након примене плацебо узорак и референтног препарата. Након две недеље апликације, постепено се активира пуферски капацитет самог епидермалног слоја коже, па самим тим долази до статистички значајног повећања рН вредности коже. Уочена је значајна промена рН вредности коже након 14 дана и након 28 дана апликације испитиваних

активних кремова (ACSN, ACRC, ACPS и ACLA) у поређењу са вредностима измерених након апликације од 7 дана.

Добијени резултати *in vivo* испитивања израђених липофилних кремова показали су њихову задовољавајућу безбедност и ефикасност, која се односи на добру хидратацију коже, побољшање стања кожне баријере (смањење трансепидермалног губитка воде из коже), побољшање липидног статуса SC-а, изостанак иритације на месту примене и ефекте избелјивања коже. Узорци активних кремова чије су формулације предложене у овој докторској дисертацији показали су бољу ефикасност у односу на референтни препарат регистрован на нашем тржишту. Такође, узорци са масним уљима природног порекла (изолованих екстракцијом из плодова, тачније семена одабраних биљних врста), услед синергистичког дејства компоненти масног уља и биоактивних компоненти из екстракта шипурка, обезбеђују боље ефекте на кожи у односу на узорак са комбинацијом екстракта и синтетске линолне киселине.

Липофилни кремови са комбинацијом екстракта и масног уља плодова јачају одбрамбени механизам коже у стањима иритације коже која могу бити узрокована оштећењем баријерне функције коже и трансепидермалним губитком воде и нормализују/побољшавају липидни статус коже. Доводе до повећане хидратације коже, тј. повећавају капацитет површинског слоја коже да везује воду. *In vitro* антитирозилазно деловање екстракта шипурка, као једне од активних компонената формулисаних кремова, потврђено смањењем меланин индекса у *in vivo* студији, отвара нову могућност примене формулисаних липофилних кремова у избелјивању коже, третману хиперпигментација и других поремећаја повезаних са повећаном синтезом меланина у кожи. Такође, услед присуства екстракта шипурка који поседује изражене антиоксидативне особине, кремови могу да се користе у заштити коже од UV зрачења и оксидативног стреса узрокованог слободним радикалима, који доводе до губитка виталности коже и превременог старења (фотостарења) коже.

5. ЗАКЉУЧАК

Применом концепта дизајна квалитета извршена је идентификација циљаног профила квалитета липофилног крема са екстрактима и масним уљима биљног порекла који се може користити у третману суве коже, промена на кожи у склопу атопијског дерматитиса, оксидативног оштећења коже и хиперпигментација коже. На основу дефинисаних критичних атрибута квалитета готовог производа, приступило се карактеризацији екстраката и масних уља плодова трњине, дивље руже, зове и јаребике у циљу стандардизације и одабира оптималне комбинације ових активних компонената које су инкорпориране у подлогу – крем В/У типа, а затим је испитана њихова стабилност, безбедност и ефикасност. Након завршеног експерименталног дела и обраде резултата дошло се до следећих закључака:

ПРВА ФАЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

1. Физичко-хемијске особине, квалитативни и квантитативни садржај полифенолних једињења, органских киселина и витамина, способност испољавања антиоксидативне и антитирозиназне активности и утицај на вијабилност ћелија екстраката плодова добијених ултразвучном екстракцијом применом различитих растварача (метанол, 70% етанол, 45% пропиленгликол и вода), разликовали су се у односу на примењени растварач за екстракцију.
2. Највећи приноси екстракције били су код екстраката плодова јаребике израђених са 45% пропиленгликолом као растварачем за екстракцију. Метанолни екстракти имали су највише рН вредности, док су екстракти са водом као екстрагентом били најкиселији. Највећа киселост је измерена за екстракте шипурка, док су код екстраката плодова зове измерене највише рН вредности. Растварач је утицао на вредности индекса рефракције и релативне густине, док врста плода није испољила статистички значајан утицај на ове параметре. Екстракти са 45% пропиленгликолом показали су највеће вредности индекса рефракције, као и највећу релативну густину, док су најмање вредности ових параметара измерене код метанолних екстраката плодова.
3. Као најбољи растварач за изоловање полифенолних једињења из плодова показала се вода, а затим 45% пропиленгликол и 70% етанол. У воденим екстрактима био је већи садржај флавоноида (2,07–14,14 mg RE/g) и проантоцијанидина (5,29–54,81

mg CE/g) у односу на друге раствараче. Као добар растварач за екстракцију антоцијана показао се 45% пропиленгликол (386,75–1993,03 mg CG/100 g), а 70% етанол за екстракцију фенола (4,62–112,34 mg GAE/g) и танина (0,27–2,73%). Екстракти шипурка су садржали највећу концентрацију танина (просечан садржај је био 1,97%) и проантоцијанидина (са просечним садржајем од 30,14 mg CE/g), док су екстракти зове имали највећи садржај фенола (просечни садржај од 82,95 mg GAE/g) и флавоноида (8,52 mg RE/g). Плодови зове и трњине су показали већи садржај антоцијана у односу на остале плодове (просечан садржај у екстрактима зове је био највећи и износио је 1279,99 mg CG/100 g).

4. Екстракти плодова зове и шипурка били су најбогатији полифенолним једињењима: SNPE (укупан садржај полифенолних једињења је био 2,77%), SNEE (2,36%), RCPE (1,94%) и RCWE (1,72%). Од анализираних полифенолних једињења, најзаступљенији су били пирогалол (од 128,24 mg/100 g до 864,55 mg/100 g), олеанолна киселина (од 63,64 mg/100 g до 857,61 mg/100 g) и гална киселина (од 16,69 mg/100 g до 296,02 mg/100 g). Хлорогенска киселина је била присутна у концентрацијама од 1,05 mg/100 g до 241,40 mg/100 g. У већим концентрацијама у појединим екстрактима налазиле су се урсолна, протокатехинска и сирингинска киселина. Катехин, неохлаорогенска и ферулна киселина били су присутни у свим екстрактима. Висок садржај различитих једињења из групе антоцијана (делфинидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-3-*O*-рутинозид и цијанидин-3-*O*-глукозид) био је у екстрактима плодова зове и трњине.
5. На квалитативни и квантитативни састав органских киселина у екстрактима утицали су врста плода и примењени растварач за екстракцију. Најбогатији органским киселинама били су екстракти RCPE (2,03%) и PSWE (1,97%), затим екстракти PSEE и RCWE са истим укупним садржајем од 1,70%. Лимунска, јабучна, оксална, L-аскорбинска и бадемова киселина су биле најзаступљеније у екстрактима шипурка. Екстракти плодова трњине су имали највећи садржај ћилибарне киселине, док су пирогрођана, млечна и хининска киселина у највећој количини биле присутне у екстрактима плодова зове. Екстракти шипурка и плодова трњине имали су сличан садржај винске киселине.
6. Екстракт SNPE је садржао највећу концентрацију тиамина (4,35 μ g/100 g). Рибофлавин је био заступљен у свим плодовима, са највећим садржајем у екстрактима са 45% пропиленгликолом и водом. Највише рибофлавина је нађено у екстрактима RCPE – 19,69 μ g/100 g и RCWE – 19,23 μ g/100 g. Метанол се показао

- као најселективнији растварач за изоловање α -токоферола из испитиваних плодова (код шипурка је најен висок садржај овог витамина и у екстрактима са 70% етанолом). Највећа концентрација α -токоферола била је у екстрактима шипурка.
7. Екстракти су испољили антиоксидантно деловање различитим механизмима: преко способности „хватања“ слободних радикала (DPPH, NO и \bullet OH радикалских врста), хелирања прооксидативних метала, инхибиције липидне пероксидације и редукције јона гвожђа. Екстракт SNWE је био најактивнији као „хватач“ слободних DPPH радикала, а пратили су га екстракти RCEE и RCWE. Екстракт RCWE се истицао по способности неутрализације NO и \bullet OH радикала (водени екстракти су генерално показали већи потенцијал за неутрализацију \bullet OH радикала), као и по способности редукције јона гвожђа у FRAP тесту. Просечна BCB активност код екстраката плодова зове је била највећа, а најбољу активност показали су екстракти овог плода са 70% етанолом и метанолом, као и метанолни екстракт шипурка, па се на основу тога може закључити да ови екстракти имају највеће концентрације хидрофобних (липофилних) антиоксиданаса.
 8. На основу анализе главних компоненти и корелационе анализе утврђено је да постоји корелација између садржаја полифенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката, што потврђује претпоставку да полифеноли имају важну улогу у антиоксидативној активности екстраката. Сви екстракти су показали одређени ниво антиоксидативне активности, док се екстракт RCWE показао као најефикаснији у неутрализацији NO и \bullet OH радикала и FRAP тесту, а испољио је и добру активност као „хватач“ DPPH радикала, што је повезано са високим садржајем полифенолних једињења (пре свега фенолних једињења, танина и проантоцијанидина), органских киселина и витамина у овом екстракту.
 9. На основу *in vitro* процене антитирозиназне активности, екстракти плодова са 45% пропиленгликолом показали су најбољу антитирозиназну активност, осим код шипурка где је посебно ефикасан био водени екстракт. Екстракт SNPE је показао највећи потенцијал у инхибицији ензима тирозиназе, а затим екстракти SAPE и SNME, што указује на то да се екстракти плодова могу користити у формулисању фармацеутских препарата за третман поремећаја повезаних са хиперпигментацијом коже и повећаном синтезом меланина у кожи.
 10. Експеримент на фибробластима L-929 ћелијске линије показао је да се екстракти шипурка и плодова трњине могу сматрати потенцијално безбедним за формулацију

фармацеутских препарата за примену на кожи. Након примене екстраката плодова зове у концентрацијама од 0,1 mg/ml, 0,4 mg/ml и 1,0 mg/ml измерене су прихватљиве вредности ћелијске вијабилности, док су екстракти са 45% пропиленгликолом били нецитотоксични у свим испитиваним концентрацијама. Екстракти плодова јаребике су показали најизраженији ефекат на вијабилност фибробласта, па су потенцијално безбедни за употребу само у нижим концентрацијама. Екстракти са 45% пропиленгликолом су показали најповољнији ефекат на вијабилност фибробласта, а његов утицај је био најизраженији код плодова зове, где су једино екстракти са овим растварачем били нецитотоксични у свим испитиваним концентрацијама. Водени екстракти плодова трњине и шипурка испољили су ефекат са високим процентом вијабилности ћелија.

11. На основу резултата прве фазе експерименталног рада, одабран је водени екстракт шипурка (RCWE) као активна компонента у формулацији липофилног крема, у оптималној концентрацији од 3,5% (на основу резултата његове антиоксидативне активности).

ДРУГА ФАЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

12. Приноси екстракције су већи (1,79 до 5,53 пута) применом наткритичне екстракције (НКЕ) у односу на Soxhlet екстракцију. Највећи принос уља након НКЕ је био код плодова зове (8,45%), затим код плодова трњине (6,89%), а мањи садржај уља је био у шипурку (2,10%) и плодовима јаребике (1,22%). Код свих испитиваних биљних врста након НКЕ принос масног уља из семена био је и до 4 пута већи од приноса уља из плодова (5,35% до 18,97%), на основу чега се може закључити да је масно уље присутно превасходно у семену.
13. У испитиваним уљима доминантне су биле незасићене масне киселине (пре свега линолна, олеинска и α -линолеинска киселина), а удео ових киселина је био већи у уљу добијеном из семена (90,5–93,2%). Линолна киселина је била присутна у уљима из плодова са уделом од 27,9% до 47,2%, а у масним уљима из семена њен садржај је био већи (36,4% до 65,0%).
14. На основу анализе резултата друге фазе експерименталног рада одабрана су масна уља из семена трњине, шипурка и зове, као активне компоненте у липофилним кремовема, за потенцијалну примену код стања суве коже, атопијског дерматитиса и у превенцији старења коже, што указује на то да се семе, као нуспроизвод који остаје након прераде плодова у индустрији хране, може ефикасно искористити као

сировина за продукцију неконвенционалних масних уља са јединственим садржајем масних киселина за примену у фармацеутској индустрији (стандардизована на садржај линолне киселине).

ТРЕЋА ФАЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

15. Органолептичке карактеристике формулисаних кремова са 4,5% емулгатора типа В/У (Abil[®] WE 09), 2,0% липофилног коемулгатора (Fluidanov[™] 20X), 3,0% пчелињег воска као фактора конзистенције, екстрактом RCWE (стандардизован на 1,7% полифенолних једињења и 1,7% органских киселина) и масним уљима из семена зове, шипурка и трњине у концентрацијама које одговарају садржају линолне киселине у крему од 0,815%, као и крема са 0,815% синтетске линолне киселине (редом PL, ACSN, ACRC, ACPS и ACLA) складиштених на собној температури (22 ± 1 °C) у периоду од годину дана, су остале непромењене (хомогеност, сјај, без знакова фазне сепарације, полуврста конзистенција).
16. Резултати процене физичко-хемијске стабилности формулисаних кремова у студији природног старења на собној температури (22 ± 1 °C), у трајању од годину дана, указују на задовољавајућу физичко-хемијску стабилност испитиваних узорака. Кремови са масним уљима природног порекла и синтетском линолном киселином оцењени су од стране панелиста као мање лепљиви (или да нису лепљиви), мање масни током и након апликације, као и да се лакше размазују (у односу на референтни препарат), а њихово упијање у кожу као умерено или брзо. Порекло линолне киселине (природно *vs.* синтетско) није имало утицај на испитиване сензорне атрибуте активних кремова.
17. Формулисани липофилни кремови са воденим екстрактом шипурка и масним уљима из семена трњине, шипурка и зове показали су повољан безбедносни профил током *in vivo* процене на здравој кожи добровољаца након једнократне апликације узорака и оклузије у трајању од 24 h.
18. Након дуготрајне апликације формулисаних кремова на кожу испитаника у трајању од 28 дана регистрована је статистички значајно већа ефикасност у погледу повећања хидратације коже (влажећег потенцијала) у односу на референтни препарат и плацебо узорак, потенцијала да избелјују (посветљавају) кожу и да смањују иритацију коже. Њихова већа ефикасност се огледала и у виду повољног деловања на репарацију и очување баријерне функције коже, као и потенцијала да побољшавају липидни статус површинског слоја коже.

19. Применом концепта дизајна квалитета формулисани су липофилни кремове дефинисаног квалитета стабилни у периоду од 12 месеци чувања на температури од 22 ± 1 °C, оптималних сензорних карактеристика, повољног безбедносног профила и доказаном ефикасношћу након примене на кожу.
20. Идентификовани су потенцијални критични атрибути квалитета биљних екстраката: оптималан садржај полифенолних једињења, органских киселина и витамина, оптимална антиоксидативна и антитирозиназна активност.
21. Идентификовани су потенцијални критични атрибути квалитета биљних уља: оптималан садржај линолне киселине.
22. Идентификовани су потенцијални критични атрибути квалитета готовог производа: садржај полифенолних једињења, органских киселина и масног уља стандардизованог на садржај линолне киселине.
23. Идентификовани су потенцијални критични процесни параметри: услови извођења наткритичне екстракције (температура од 40 °C и притисак од 30 МПа) при којима се ефикасно врши екстракција масног уља.
24. Показано је синергистичко дејство састојака екстракта (полифенолна једињења, органске киселине, витамини) и масног уља (есенцијалне, незасићене масне киселине), где природни антиоксиданси из екстракта доприносе стабилизацији масног уља и спречавају његову оксидативну деградацију.
25. **Липофилни крем ACPS, са комбинацијом воденог екстракта шипурка у концентрацији од 35 mg/g (стандардизованог на 1,7% полифенолних једињења и 1,7% органских киселина) и масног уља семена трњине у концентрацији од 22,4 mg/g (стандардизованог на 36,4% линолне киселине) показао је повољан безбедносни профил и најбољу ефикасност након примене на кожу, као и задовољавајућу стабилност у периоду чувања од 12 месеци (на собној температури), па се предлаже као потенцијални фармацеутски препарат за примену у третману суве коже, промена на кожи у склопу атопијског дерматитиса (пруритис, ксероза, екцем), у избељивању коже, третману хиперпигментација и других поремећаја повезаних са повећаном синтезом меланина у кожи, у заштити коже од UV зрачења и оксидативног стреса, који доводе до губитка виталности коже и превременог старења (фотостарења) коже.**

6. ЛИТЕРАТУРА

Aburjai T, Natsheh FM. Plants used in cosmetics. *Phytother Res* 2003; 17(9): 987–1000.

Adamczak A, Buchwald W, Zieliński J, Mielcarek S. Flavonoid and organic acid content in rose hips (*Rosa* L., sect. *Caninae* DC. EM. Christ.). *Acta Biol Cracov Ser Bot* 2012; 54(1): 105–112.

Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2007.

Afaq F, Mukhtar H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol* 2006; 15(9): 678–684.

Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Sci* 2005; 76(17): 1953–1964.

Akanda MJH, Sarker MZI, Ferdosh S, Manap MYA, Ab Rahman NNN, Ab Kadir MO. Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. *Molecules* 2012; 17(2): 1764–1794.

Akhtar N, Khan BA, Khan MS, Mahmood T, Khan HMS, Iqbal M, Bashir S. Formulation development and moisturising effects of a topical cream of *Aloe vera* extract. *Int J Med Health Biomed Bioeng Pharma Eng* 2011; 5(3): 128–136.

Aladedunye F, Matthäus B. Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. *Food Chem* 2014; 159: 273–281.

Almeida IF, Gaio AR, Bahia MF. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: comparison with other topical formulations. *J Sens Stud* 2008; 23(1): 92–113.

Al-Saikhhan MS, Howard LR, Miller JC. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). J Food Sci 1995; 60(2): 341–343.

Amasya G, Aksu B, Badilli U, Onay-Besikci A, Tarimci N. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. Int J Pharm 2019; 563: 110–121.

Anchisi C, Maccioni AM, Sinico C, Valenti D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. Farmaco 2001; 56(5–7): 427–431.

AOAC No. 41.1.27 Official Method 965.49. Fatty Acids in Oils and Fats. Preparation of Methyl Esters, Final action 1984. 16th edition, AOAC International, Gaithersburg, 1998.

AOAC Official Method 930.15. Official methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, Association of Official Analytical Chemists, AOAC International, Gaithersburg, 2005.

Arsić I, Tamburić S, Bulatović V, Homšek I, Vuleta G. Exploring moisturizing potential of naturals: the cases of St. johns wort, chamomile and blackthorn. Euro Cosmetics 2005; 3: 14–21.

Arsić I, Žugić A, Tadić V, Tasić-Kostov M, Mišić D, Primorac M, Runjaić-Antić D. Estimation of dermatological application of creams with St. John's Wort oil extracts. Molecules 2012; 17(1): 275–294.

Aruoma OI, Grootveld M, Halliwell B. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule. J Inorg Biochem 1987; 29(4): 289–299.

ASTM Committee E 1490-03. Standard practice for descriptive skinfeel of creams and lotions. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, PA, 2003.

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J Food Eng* 2013; 117(4): 426–436.

Bakonyi M, Berkó S, Kovács A, Budai-Szűcs M, Kis N, Erős G, Csóka I, Csányi E. Application of quality by design principles in the development and evaluation of semisolid drug carrier systems for the transdermal delivery of lidocaine. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018; 44: 136–145.

Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira ICFR. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem* 2010; 120(1): 247–254.

Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Exotic fruits as a source of important phytochemicals: Improving the traditional use of *Rosa canina* fruits in Portugal. *Food Res Int* 2011; 44(7): 2233–2236.

Bazin R, Fanchon C. Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(6): 453–460.

Belwal T, Ezzat SM, Rastrelli L, Bhatt ID, Daglia M, Baldi A, Devkota HP, Orhan IE, Patra JK, Das G, Anandharamakrishnan C, Gomez-Gomez L, Nabavi SF, Nabavi SM, Atanasov AG. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends Analyt Chem* 2018; 100: 82–102.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70–76.

Bhise K, Kashaw SK, Sau S, Iyer AK. Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach. *Int J Pharm* 2017; 526(1–2): 506–515.

Bošnjaković D, Ognjanov V, Ljubojević M, Barać G, Predojević M, Mladenović E, Cukanović J. Biodiversity of wild fruit species of Serbia. *Genetika* 2012; 44(1): 81–90.

Boulos S, Yan AC. Current concepts in the prevention of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2018; 36(5): 668–671.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 1995; 28(1): 25–30.

Caussin J, Groenink HWW, de Graaff AM, Gooris GS, Wiechers JW, van Aelst AC, Bouwstra JA. Lipophilic and hydrophilic moisturizers show different actions on human skin as revealed by cryo scanning electron microscopy. *Exp Dermatol* 2007; 16(11): 891–898.

Chiu A, Kimball AB. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *Br J Dermatol* 2003; 149(4): 681–691.

Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter[®], the DermaSpectrometer[®] and the Mexameter[®]. *Skin Res Technol* 2000; 6(4): 230–238.

Curdy C, Naik A, Kalia YN, Alberti I, Guy RH. Non-invasive assessment of the effect of formulation excipients on stratum corneum barrier function in vivo. *Int J Pharm* 2004; 271(1–2): 251–256.

Da Porto C, Porretto E, Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem* 2013; 20(4): 1076–1080.

da Silva RPF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends Analyt Chem* 2016; 76: 40–51.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15(10): 7313–7352.

Darsini DTP, Maheshu V, Vishnupriya M, Nishaa S, Sasikumar JM. Antioxidant potential and amino acid analysis of underutilized tropical fruit *Limonia acidissima* L. Free Rad Antiox 2013; 3(2s): S62–S69.

Dawidowicz AL, Wianowska D, Baraniak B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). LWT - Food Sci Technol 2006; 39(3): 308–315.

De Paepe K, Derde MP, Roseeuw D, Rogiers V. Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. Contact Dermatitis 2000; 42(4): 227–234.

Demir N, Yildiz O, Alpaslan M, Hayaloglu AA. Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey. LWT - Food Sci Technol 2014; 57(1): 126–133.

Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Nedelcheva P, Blazheva D, Toshkova R, Gardeva E, Yossifova L, Hyrsi P, Vojtek L. Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. Food Chem 2014; 157: 37–44.

Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch Biochem Biophys 1994; 315(1): 161–169.

Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. J Food Drug Anal 2014; 22(3): 296–302.

Dridi W, Essafi W, Gargouri M, Leal-Calderon F, Cansell M. Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions. Food Chem 2016; 202: 205–211.

du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. International guidelines for the *in vivo* assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. Skin Res Technol 2013; 19(3): 265–278.

Dulf FV, Oroian I, Vodnar DC, Socaciu C, Pinteau A. Lipid classes and fatty acid redistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus* species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules* 2013; 18(10): 11768–11782.

Duymuş HG, Göger F, Başer KHC. *In vitro* antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chem* 2014; 155: 112–119.

Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2): 160.

Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci* 2009; 10(9): 4066–4087.

Egea I, Sánchez-Bel P, Romojaro F, Pretel MT. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65(2): 121–129.

Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem* 2004; 84(1): 23–28.

Elmastaş M, Demir A, Genç N, Dölek Ü, Güneş M. Changes in flavonoid and phenolic acid contents in some *Rosa* species during ripening. *Food Chem* 2017; 235: 154–159.

Ercisli S, Orhan E, Esitken A. Fatty acid composition of *Rosa* species seeds in Turkey. *Chem Nat Compd* 2007; 43(5): 605–606.

Ercisli S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chem* 2007; 104(4): 1379–1384.

Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, García-Viguera C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J Agric Food Chem* 2000; 48(5): 1588–1592.

European Pharmacopoeia (9th ed). European Pharmacopoeia Commission. Council of Europe, Strasbourg, 2017.

Fang JY, Hwang TL, Fang CL, Chiu HC. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *Int J Pharm* 2003; 255(1–2): 153–166.

Fazio A, Plastina P, Meijerink J, Witkamp RF, Gabriele B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chem* 2013; 140(4): 817–824.

Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem Anal* 2009; 20(3): 177–190.

Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P. Assessment of 'dry skin': current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14(4): 183–195.

Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E. Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12(4): 193–198.

Fluhr JW, Cavallotti C, Berardesca E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. *Clin Dermatol* 2008; 26(4): 380–386.

Flynn TC, Petros J, Clark RE, Viehman GE. Dry skin and moisturizers. *Clin Dermatol* 2001; 19(4): 387–392.

Foster RH, Hardy G, Alany RG. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. *Nutrition* 2010(7–8); 26: 708–718.

Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Ricci D. Antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruit juice. *Ital J Food Sci* 2009; 21(3): 337–346.

Fu B, Li H, Wang X, Lee FS, Cui S. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J Agric Food Chem* 2005; 53(19): 7408–7414.

Fu R, Zhang Y, Guo Y, Chen F. Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. *S Afr J Bot* 2014; 93: 98–104.

Ganhão R, Estévez M, Kylli P, Heinonen M, Morcuende D. Characterization of selected wild Mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *J Agric Food Chem* 2010; 58(15): 8854–8861.

Gao X, Björk L, Trajkovski V, Uggla M. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agric* 2000; 80(14): 2021–2027.

Garcia-Alonso M, Rimbach G, Sasai M, Nakahara M, Matsugo S, Uchida Y, Rivas-Gonzalo JC, De Pascual-Teresa S. Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(12): 1112–1119.

Gegiu G, Branza AD, Bucur L, Grigorian M, Tache T, Badea V. Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L. *Farmacia* 2015; 63(2): 275–279.

Green BA, Yu RJ, Van Scott EJ. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin Dermatol* 2009; 27(5): 495–501.

Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem* 2013; 141(4): 3721–3730.

Guimarães R, Barros L, Calhella RC, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods Hum Nutr* 2014; 69(1): 37–42.

Gutierrez RMP, Ahuatzí DM. Investigating antioxidant properties of the diterpenes from seeds of *Phalaris canariensis*. *J Nutr Food Sci* 2015; 5(4): 376.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1): 215–219.

Hinneburg I, Damien Dorman HJ, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem* 2006; 97(1): 122–129.

Ho GTT, Kase ET, Wangensteen H, Barsett H. Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins, and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 2017; 65(13): 2677–2685.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1841–1856.

Hukkanen AT, Pölönen SS, Kärenlampi SO, Kokko HI. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *J Agric Food Chem* 2006; 54(1): 112–119.

Hussain Z, Thu HE, Shuid AN, Kesharwani P, Khan S, Hussain F. Phytotherapeutic potential of natural herbal medicines for the treatment of mild-to-severe atopic dermatitis: A review of human clinical studies. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 596–608.

Ilyasoğlu H. Characterization of rosehip (*Rosa canina* L.) seed and seed oil. *Int J Food Prop* 2014; 17(7): 1591–1598.

International Conference on Harmonisation Q10: Pharmaceutical Quality System, ICH Tripartite Guidelines. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2008.

International Conference on Harmonisation Q8 (R2): Pharmaceutical Development, ICH Harmonized Tripartite Guidelines, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

International Conference on Harmonisation Q9: Quality Risk Management. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

Jabłońska-Ryś E, Zalewska-Korona M, Kalbarczyk J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J Fruit Ornament Plant Res* 2009; 17(2): 115–120.

Jahongir H, Miansong Z, Amankeldi I, Yu Z, Changheng L. The influence of particle size on supercritical extraction of dog rose (*Rosa canina*) seed oil. *J King Saud Univer - Eng Sci* 2019; 31(2): 140–143.

Jia Y, Gan Y, He C, Chen Z, Zhou C. The mechanism of skin lipids influencing skin status. *J Dermatol Sci* 2018; 89(2): 112–119.

Jiang J, Mei Z, Xu J, Sun D. Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2013; 429: 82–90.

Jiménez S, Gascón S, Luquin A, Laguna M, Ancin-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on Caco-2 human colon cancer. *PLoS One* 2016; 11(7): e0159136.

Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sci* 2004; 74(8): 1013–1026.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; 47(10): 3954–3962.

Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MNH, Alam AHMK. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes* 2013; 6(1): 24.

Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem* 2010; 119(2): 851–858.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 2013; 18(2): 2328–2375.

Kim MB, Park JS, Lim SB. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. *Food Chem* 2010; 122(3): 546–552.

Klavins L, Kviesis J, Steinberga I, Klavina L, Klavins M. Gas chromatography–mass spectrometry study of lipids in northern berries. *Agronom Res* 2016; 14: 1328–1346.

Koleva II, van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 2002; 13(1): 8–17.

Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 2007; 55(4): 1612–1619.

Kovács A, Berkó Berko S, Csányi E, Csóka I. Development of nanostructured lipid carriers containing salicylic acid for dermal use based on the Quality by Design method. *Eur J Pharm Sci* 2017; 99: 246–257.

Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia* 2004; 75(1): 77–80.

Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimiä R, Westerlund-Wikström B, McDougall G, Stewart D, Heinonen M. Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities. *J Agric Food Chem* 2010; 58(22): 11985–11992.

Lalić J, Denić M, Sunarić S, Kocić G, Trutić N, Mitić S, Jovanović T. Assessment of thiamine content in some dairy products and rice milk. *CyTA – J Food* 2014; 12(3): 203–209.

Lattanzio F, Greco E, Carretta D, Cervellati R, Govoni P, Speroni E. *In vivo* anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *J Ethnopharmacol* 2011; 137(1): 880–885.

Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1): 70.

Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4(11): 771–788.

Lodén M. The clinical benefit of moisturizers. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(6): 672–688.

Loizzo MR, Tundis R, Menichini F. Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2012; 11(4): 378–398.

Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and *in vivo* skin performance. *Int J Cosmet Sci* 2012; 34(2): 140–149.

Lukić MŽ. Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene. *Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2014.*

Machmudah S, Kawahito Y, Sasaki M, Goto M. Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *J Supercrit Fluids* 2007; 41(3): 421–428.

Mahoney N, Molyneux RJ. Rapid analytical method for the determination of aflatoxins in plant-derived dietary supplement and cosmetic oils. *J Agric Food Chem* 2010; 58(7): 4065–4070.

Maisuthisakul P, Gordon MH. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chem* 2009; 117(2): 332–341.

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Jiménez-Moreno N, Ancín-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6): 1137.

Marzouki H, Piras A, Marongiu B, Rosa A, Dessì MA. Extraction and separation of volatile and fixed oils from berries of *Laurus nobilis* L. by supercritical CO₂. *Molecules* 2008; 13(8): 1702–1711.

Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci* 2010; 58(2): 85–90.

Masmoudi H, Dréau YL, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm* 2005; 289(1–2): 117–131.

Matthäus B, Özcan MM. Fatty acids and tocopherol contents of some *Prunus* spp. kernel oils. *J Food Lipids* 2009; 16(2): 187–199.

Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem* 2006; 54(19): 7193–7199.

Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J Food Sci* 2012; 77(10): C1064–C1070.

Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, Sircelj H. Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds. *J Food Sci* 2016a; 81(8): C1928–C1937.

Mikulic-Petkovsek M, Ivancic A, Schmitzer V, Veberic R, Stampar F. Comparison of major taste compounds and antioxidative properties of fruits and flowers of different *Sambucus* species and interspecific hybrids. *Food Chem* 2016; 200: 134–140.

Mikulic-Petkovsek M, Krska B, Kiproviski B, Veberic R. Bioactive components and antioxidant capacity of fruits from nine *Sorbus* genotypes. *J Food Sci* 2017; 82(3): 647–658.

Morales P, Ferreira ICFR, Carvalho AM, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Morales R, Tardío J. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 2013; 115(2): 176–185.

Nađpal JD, Lesjak MM, Šibul FS, Anačkov GT, Četojević-Simin DD, Mimica-Dukić NM, Beara IN. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food Chem* 2016; 192: 907–914.

Nile SH, Park SW. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 2014; 30(2): 134–144.

Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Krämer K, Applegate LA. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(12): 1293–1303.

Olszewska MA, Michel P. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Nat Prod Res* 2009; 23(16): 1507–1521.

Özcan M. Nutrient composition of rose (*Rosa canina* L.) seed and oils. *J Med Food* 2002; 5(3): 137–140.

Özcan T. Some vitamin and organic acid contents in the fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in-Turkey. *IUFS J Biol* 2008; 67(2): 105–114.

Park ES, Na JI, Kim SO, Huh CH, Youn SW, Park KC. Application of a pigment measuring device – Mexameter[®] – for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. *Skin Res Technol* 2006; 12(4): 298–302.

Parra JL, Paye M. EEMCO guidance for the *in vivo* assessment of skin surface pH. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16(3): 188–202.

Pinacho R, Cavero RY, Astiasarán I, Ansorena D, Calvo MI. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *J Funct Foods* 2015; 19(Part A): 49–62.

Polydoro M, de Souza KCB, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EES, Bassani VL, Moreira JCF. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci* 2004; 74(23): 2815–2826.

Pons-Guiraud A. Dry skin in dermatology: a complex physiopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21 (Suppl 2): 1–4.

Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1978; 26(5): 1214–1218.

Prieto C, Calvo L. Performance of the biocompatible surfactant Tween 80, for the formation of microemulsions suitable for new pharmaceutical processing. *J Appl Chem* 2013; 2013: 1–10.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53(10): 4290–4302.

Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol* 2018; 45(9): 1044–1052.

Raspé O, Findlay C, Jacquemart AL. *Sorbus aucuparia* L. *J Ecol* 2000; 88(5): 910–930.

Rasul A, Akhtar N, Khan BA, Mahmood T, Uz Zaman S, Khan HMS. Formulation development of a cream containing fennel extract: *in vivo* evaluation for anti-aging effects. *Pharmazie* 2012; 67(1): 54–58.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113(3): 189–207.

Rawlings AV. Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J Cosmet Sci* 2003; 25(1–2): 63–95.

Ruiz-Rodríguez BM, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Fernández-Ruiz V, de Cortes Sánchez-Mata M, Cámara M, Tardío J. Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* 2014; 69(1): 61–73.

Sator PG, Schmidt JB, Hönigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(3): 352–358.

Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone *in vitro/in vivo* permeation. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30(5): 441–450.

Savić S, Weber C, Savić MM, Müller-Goymann C. Natural surfactant-based topical vehicles for two model drugs: influence of different lipophilic excipients on *in vitro/in vivo* skin performance. *Int J Pharm* 2009; 381(2): 220–230.

Savic S, Lukic M, Jaksic I, Reichl S, Tamburic S, Müller-Goymann C. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: the influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. *J Colloid Interface Sci* 2011; 358(1): 182–191.

Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19(6): 296–302.

Sidor A, Gramza-Michałowska A. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *J Funct Foods* 2015; 18(Part B): 941–958.

Sikora E, Bieniek MI, Borczak B. Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Sci Pol, Technol Aliment* 2013; 12(4): 365–372.

Silva SM, Martinho A, Moreno I, Silvestre S, Granadeiro LB, Alves G, Duarte AP, Domingues F, Gallardo E. Effects of *Hypericum perforatum* extract and its main bioactive compounds on the cytotoxicity and expression of CYP1A2 and CYP2D6 in hepatic cells. *Life Sci* 2016; 144: 30–36.

Silverberg NB. Selected active naturals for atopic dermatitis: Atopic Dermatitis Part 1. *Clin Dermatol* 2017; 35(4): 383–386.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152–178.

Sreejayan, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49(1): 105–107.

Stanković M, Maksimović S, Tadić V, Arsić I. The oil content of wild fruits from different plant species obtained by conventional Soxhlet extraction technique. *Acta Fac Med Naiss* 2018; 35(3): 193–200.

Stanković MI, Savić VLj, Živković JV, Tadić VM, Arsić IA. Tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of wild *Prunus spinosa* L. fruit extracts as natural source of bioactive compounds. *Not Bot Horti Agrob* 2019a; 47(3): 651–657.

Stanković MI, Savić VLj, Živković JV, Stanojević LjP, Tadić VM, Arsić IA. Tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of wild *Rosa canina* L. and *Sorbus aucuparia* L. fruit extracts. *Acta Pol Pharm* 2019b; 76(3): 523–533.

Stefaniak AB, du Plessis J, John SM, Eloff F, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner MFC, Kudla I, Holness DL. International guidelines for the *in vivo* assessment of skin properties in non-clinical settings: part 1. pH. *Skin Res Technol* 2013; 19(2): 59–68.

Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002; 50(25): 7449–7454.

Sunarić S, Denić M, Kocić G. Evaluation of riboflavin content in dairy products and non-dairy substitutes. *Ital J Food Sci* 2012; 24(4): 352–357.

Sunarić S, Lalić J, Spasić A. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate in dairy products, plant milks and health supplements by using SPE and HPLC method. *Food Anal Methods* 2017; 10(12): 3886–3901.

Szajdek A, Borowska EJ. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 2008; 63(4): 147–156.

Szentmihályi K, Vinkler P, Lakatos B, Illés V, Then M. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Bioresour Technol* 2002; 82(2): 195–201.

Šavikin KP, Zdunić GM, Krstić-Milošević DB, Šircelj HJ, Stešević DD, Pljevljakušić DS. *Sorbus aucuparia* and *Sorbus aria* as a source of antioxidant phenolics, tocopherols, and pigments. *Chem Biodivers* 2017; 14(12): e1700329.

Tasić-Kostov M, Savić S, Lukić M, Tamburić S, Pavlović M, Vuleta G. Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *J Cosmet Dermatol* 2010; 9(1): 3–10.

Тасић-Костов МЖ. Дермокозметичке емулзије са ламеларном течном-кристалном фазом као носач за лактобионску киселину – испитивање колоидне структуре, ефикасности и безбедности. Докторска дисертација, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, 2013.

Temple NJ. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr Res* 2000; 20(3): 449–459.

Tian Y, Liimatainen J, Alanne AL, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, Kallio H, Yang B. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem* 2017; 220: 266–281.

Tobin DJ. Biochemistry of human skin – our brain on the outside. *Chem Soc Rev* 2006; 35(1): 52–67.

Trapp M. Is there room for improvement in the emollients for adjuvant therapy? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21 (Suppl 2): 14–18.

Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(1): 159–170.

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem* 2006; 99(4): 835–841.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44–84.

Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chem* 2009; 114(2): 511–515.

Velickovic JM, Ilic S, Mitic SS, Mitic MN, Kostic DA. Comparative analysis of phenolic and mineral composition of hawthorn and blackthorn from Southeast Serbia. *Oxid Commun* 2016; 39(3): 2280–2290.

Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6(2): 75–82.

Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci* 2008; 97(1): 46–59.

Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* 2001; 8(3): 303–313.

Vujanović M, Zengin G, Đurović S, Mašković P, Cvetanović A, Radojković M. Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. *S Afr J Bot* 2019; 120: 213–218.

Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. *Farmaceutska tehnologija I*, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012.

Wagemaker TAL, Maia Campos PMBG, Shimizu K, Kyotani D, Yoshida D. Antioxidant-based topical formulations influence on the inflammatory response of Japanese skin: A clinical study using non-invasive techniques. *Eur J Pharm Biopharm* 2017; 117: 195–202.

Wells DA (ed.). Solid-phase extraction: High throughput techniques. In: *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier, 2003, pp. 361–432.

Wohlrab J, Gebert A, Neubert RHH. 2018. Lipids in the skin and pH. *Curr Probl Dermatol* 2018; 54: 64–70.

Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 1998; 37(2): 99–105.

Xu DP, Zheng J, Zhou Y, Li Y, Li S, Li HB. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem* 2017; 217: 552–559.

Yang B, Ahotupa M, Määttä P, Kallio H. Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res Int* 2011; 44(7): 2009–2017.

Yang B, Kortensniemi M. Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Curr Opin Food Sci* 2015; 2: 36–42.

Yang R, Zhang L, Li P, Yu L, Mao J, Wang X, Zhang Q. A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. *Trends Food Sci Technol* 2018; 74: 26–32.

Yu LX, Korcha M. The future of pharmaceutical quality and the path to get there. *Int J Pharm* 2017; 528(1–2): 354–359.

Yu RJ, Van Scott EJ. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J Cosmet Dermatol* 2004; 3(2): 76–87.

Zeng X, Ruan D, Koehl L. Intelligent sensory evaluation: Concepts, implementations, and applications. *Math Comput Simulat* 2008; 77(5–6): 443–452.

Zocca F, Lomolino G, Lante A. Dog rose and pomegranate extracts as agents to control enzymatic browning. *Food Res Int* 2011; 44(4): 957–963.

7. Биографија аутора

Милица Станковић рођена је 16.11.1986. године у Алексинцу. Основну школу и природно-математички смер гимназије завршила је у Алексинцу као носилац Вукових диплома. Медицински факултет у Нишу – студијска група Фармација, уписала је школске 2005/2006. године. Дипломирала је фебруара 2011. године са просечном оценом 9,74 и оценом 10 на дипломском испиту. Током студија била је стипендиста Министарства просвете Републике Србије. Добитник је стипендије за суфинансирање учешћа истраживача на научним скуповима у иностранству 2015. године. Докторске академске студије, смер Фармацеутске науке, уписала је школске 2017/2018. године на Медицинском факултету у Нишу.

Након обављеног стажа положила је стручни испит за дипломираног фармацеута 2012. године. У току студија ангажована је у својству демонстратора на предметима Аналитичка хемија, Фармацеутска технологија са биофармацијом, Фармацеутска технологија 1 и Фармацеутска технологија 2.

Милица Станковић је у својству сарадника у настави – волонтера ангажована школске 2011/2012. године у извођењу практичне наставе на предметима Фармацеутска технологија 1, Фармацеутска технологија 2 и Биофармација. Од новембра 2012. године запослена је као сарадник у настави за УНО Фармација – Фармацеутска технологија и Биофармација на истим предметима, а од новембра 2014. године као асистент, на ИАС Фармације на Медицинском факултету у Нишу. Тренутно учествује у извођењу и организацији практичне наставе на предметима Фармацеутска технологија 1, Фармацеутска технологија 2 и Основи индустријске фармације. Милица Станковић је ментор, коментор и рецензент већег броја студентских радова.

Аутор је више научних и стручних радова и техничких решења. Ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ИИИ 45017). Учесник је Еурека пројекта Е! 12689 SCIMPLANT и интерног пројекта Медицинског факултета у Нишу. Учествовала је на билатералном пројекту између Србије и Црне Горе, бројним радионицама, конгресима, курсевима, семинарима и едукацијама. Одлично познаје енглески језик и рад на рачунару.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ПРИМЕНА КОНЦЕПТА ДИЗАЈНА КВАЛИТЕТА У РАЗВОЈУ ЛИПОФИЛНОГ КРЕМА СА БИЉНИМ ЕКСТРАКТИМА И МАСНИМ УЉИМА

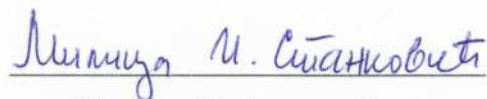
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Милица И. Станковић

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

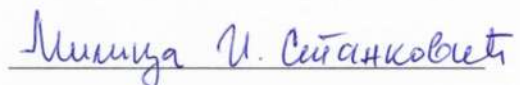
Наслов дисертације:

**ПРИМЕНА КОНЦЕПТА ДИЗАЈНА КВАЛИТЕТА У РАЗВОЈУ ЛИПОФИЛНОГ
КРЕМА СА БИЉНИМ ЕКСТРАКТИМА И МАСНИМ УЉИМА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Милица И. Станковић

Изјава 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ПРИМЕНА КОНЦЕПТА ДИЗАЈНА КВАЛИТЕТА У РАЗВОЈУ ЛИПОФИЛНОГ КРЕМА СА БИЉНИМ ЕКСТРАКТИМА И МАСНИМ УЉИМА

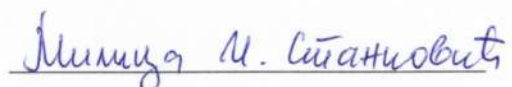
Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Милица И. Станковић