



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Vojkan M. Miljković

**Razvoj fitopreparata za dermatološku primenu  
na bazi ekstrakata ploda i lista biljnih vrsta  
roda *Morus* L. (Moraceae)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY



**Vojkan M. Miljković**

**The development of phytopreparations for  
dermatological application based on fruit and  
leaves extracts of plant species of the genus  
*Morus* L. (Moraceae)**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2017.

***Mentor:***

Prof. dr Goran Nikolić  
Univerzitet u Nišu  
Tehnološki fakultet, Leskovac

***Članovi komisije:***

Prof. dr Ljubiša Nikolić  
Univerzitet u Nišu  
Tehnološki fakultet, Leskovac

Dr Tatjana Mihajlov-Krstev, vanred. prof.  
Univerzitet u Nišu  
Prirodno-matematički fakultet, Niš

Dr Marija Tasić Kostov, docent  
Univerzitet u Nišu,  
Medicinski fakultet, Niš

***Datum odbrane.....***

<p><b>Naziv</b> <i>doktorske</i> <i>disertacije</i></p>	<p><b>RAZVOJ FITOPREPARATA ZA DERMATOLOŠKU PRIMENU NA BAZI EKSTRAKATA PLODA I LISTA BILJNIH VRSTA RODA MORUS L. (MORACEAE)</b></p>
<p><b>Rezime</b></p>	<p>Ekstrakti vrste roda <i>Morus</i> dobijeni su ekstrakcijom plodova <i>Morus nigra</i> i <i>Morus alba</i> korišćenjem metanola kao ekstragensa. Sadržaj makro- i mikroelemenata u ekstraktima ploda i lista koji su korišćeni kao biljne sirovine određen je primenom ICP-OES metode. Hemijski sastav ekstrakata je određen primenom UHPLC-DAD-MS metode. Identifikovano je 18 jedinjenja koja spadaju u: fenolne kiseline, antocijane i flavonoide. Sastav etarskih ulja lista <i>Morus alba</i> i <i>Morus nigra</i>, svežeg i nakon mesec dana sušenja, je određen primenom GC-MS analize. Identifikovan je 131 konstituent etarskog ulja 95,1 – 96,4% totalne površine GC pikova. Među njima, identifikovana je supstanca, bovolid, koja nije prisutna u svežem biljnom materijalu, pa se može koristiti za procenu svežine biljnog materijala. Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata ploda duda je dokazana primenom DPPH metode. Primenom mikrodilucione metode određena je MIC i MBC, u okviru serija od 12 duplih razblaženja ekstrakata. Antimikrobno dejstvo ekstrakata je testirano protiv 19 bakterijskih sojeva (9 Gram (+) i 10 Gram (-), od kojih su 7 uzročnici stvaranja akni, a ostali sojevi uzročnici raznih kožnih oboljenja. Korišćeni su bakterijski sojevi iz ATCC kolekcije kao i izolati briseva rana. Takođe, testirana je i antimikrobna aktivnost aglikona ekstrakata. Razvijene su nove formulacije fitopreparata za lokalnu primenu na koži u formi hidrogela i emulzija tipa U/V, koji sadrže biljni ekstrakt od 2%. Rezultati studije bezbednosti su pokazali da fitopreparati za lokalnu primenu na koži u formi hidrogela i emulzija tipa U/V sa ekstraktom ploda belog i crnog duda ne pokazuju potencijal za iritaciju kože. Takođe, sprovedena je <i>in vivo</i> studija radi određivanja efekata U/V emulzija koje su sadržale ekstrakt ploda duda nakon sedmodnevne aplikacije na veštački iritiranu kožu. Kao iritans korišćen je rastvor NaLS. Efekti u obe studije su izražavani kao promena odgovarajućih biofizičkih parametara merenih na koži zdravih humanih dobrovoljaca (eritema indeks, transepidermalni gubitak vode, pH, električna kapacitivnost kao mera stepena hidratisanosti). Sva testiranja su rađena u</p>

	<p>skladu sa Helskinškom deklaracijom uz odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu. Emulzije imaju dobre organoleptičke, reološke i fizičke osobine. Rezultati sedmodnevne studije efikasnosti pokazali su da formulisane emulzije nakon aplikacije na iritiranu kožu smanjuju iritaciju, obnavljaju zaštitnu barijeru, i pozitivno utiču na nivo hidratisanosti kože, u većem procentu u odnosu na sam emulzioni nosač.</p>
<b><i>Ključne reči</i></b>	<p><i>Morus spp.</i>, ekstrakti, etarsko ulje, fitopreparati, hidrogeli, emulzije, antimikrobna aktivnost, HPLC, GC-MS, kvantifikacija biofizičkih parametara kože</p>
<b><i>Naučna oblast</i></b>	<p>Tehnološko inženjerstvo</p>
<b><i>Uža naučna oblast</i></b>	<p>Hemija i hemijske tehnologije</p>
<b><i>UDK broj i klasifikaciona oznaka za datu naučnu disciplinu</i></b>	<p>612.7:615.454.1:582.632.2</p>

<b>Titl</b>	<b>THE DEVELOPMENT OF PHYTOPREPARATIONS FOR DERMATOLOGICAL APPLICATION BASED ON FRUIT AND LEAVES EXTRACTS OF PLANT SPECIES OF THE GENUS MORUS L. (MORACEAE)</b>
<b>Abstract</b>	<p>Extracts of the genus <i>Morus</i> were obtained by extraction of the fruit of <i>Morus alba</i> and <i>Morus nigra</i> using methanol as the extractant. The content of macro- and microelements in the fruit extracts and leaves that are used as plant material was determined using ICP-OES method. The chemical composition of the extracts was determined using UHPLC-DAD-MS method. It was identified 18 compounds which belongs to: phenolic acids, anthocyanins and flavonoids. The composition of the essential oils of leaves of <i>M. alba</i> and <i>M. nigra</i>, fresh and after a month of drying, was determined by GC-MS analysis. Identified 131 constituent of essential oils presents 95,1 – 96,4% of the total area of GC peaks. Among them, a substance which wasn't present in fresh plant material, bovolid, was identified and it can be used for the evaluation of the freshness of plant material. The antioxidant activity of methanol extracts of <i>Morus</i> species fruit has been proven using the DPPH method. By applying the method of microdilution MIC and MBC were determinated in the context of the series of 12 double dilution extracts. Antimicrobial activity of extracts was tested against 19 bacterial strains (9 Gram (+) and 10 Gram (-) of which 7 of them causes the acne, and other strains causes other skin disseases. Used bacterial strains were from ATCC sui collection and isolates of wound swabs. Also, the antimicrobial activity of the aglycones of extracts was tested. New formulations of phytopreparations for application on skin in form of hydrogels and emulsions type O/W, which as an active component contain tested herbal extract in concentration of 2% were developed. Results of safety profile studies showed that phytopreparation for topical application on the skin in the form of hydrogels and the O/W emulsions with the extract of the <i>M. alba</i> and <i>M. nigra</i> are not expected to cause irritation of the skin. Also, <i>in vivo</i> studies with aim to investigate the effects of the O/W emulsions containing the extract of mulberry after a seven-day application on experimentaly irritated skin have been done. Sodium lauryl sulfate was used as an irritant.</p>

	<p>Effects in both studies were expressed as the change of appropriate biophysical parameter measured in the skin of healthy human volunteers (erythema index, transepidermal water loss, pH, electrical capacitance as a measure of the hydration). All tests were performed in line with the Helsinki Declaration and the approval from the Ethics Committee of the Medical Faculty in Nis. Emulsions showed good organoleptical, rheological and physical properties. The results of a seven-day efficacy studies showed that formulated emulsions after application on irritated skin, reduce irritation, restore the protective barrier of the skin, and have more positive effect on skin hydration level compared with the emulsion carrier itself.</p>
<b>Key words</b>	<p><i>Morus spp.</i>, extracts, essential oil, phytopreparations, hydrogels, emulsions, antimicrobial activity, HPLC, GC-MS, quantification of biophysical parameters of the skin</p>
<b>Scientific field</b>	<p>Technological engineering</p>
<b>Scientific discipline</b>	<p>Chemistry and chemical technologies</p>
<b>UDC number</b>	<p>612.7:615.454.1:582.632.2</p>

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta TR 34012, čiji je rukovodilac prof. dr Ljubiša Nikolić, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu i Medicinskog fakulteta u Nišu, kao i u laboratorijama hemijske industrije DCP Hemigal d.o.o. u Leskovcu.

Na putu mojih doktorskih studija, koje su započele krajem 2012. godine, našao se određeni broj ljudi koji su mi svojom umnom snagom i energijom pomogli u realizaciji ideja, zbog čega osećam potrebu da se svima ovom prilikom zahvalim. Prvenstveno, mentoru prof. dr Goranu Nikoliću na pomoći u vođenju tokom doktorskih studija, na stručnim sugestijama i komentarima prilikom istraživanja i pisanja disertacije. Veliku zahvalnost dugujem i dr Jeleni Zvezdanović, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, koja mi je pomogla u razumevanju problematike i dobijanju eksperimentalnih rezultata iz oblasti hromatografskih analiza. Zahvaljujem dr Tatjani Mihajlov Krstev, vanrednom profesoru Departmana za biologiju PMF-a u Nišu, za pomoć u određivanju mikrobiološke aktivnosti biljnih ekstrakata. Za ICP/OES analizu uzoraka zahvaljujem se dr Aleksandri Pavlović, vanrednom profesoru sa Departmana za Hemiju PMF-a u Nišu. Najiskrenije se zahvaljujem dr Mariji Tasić Kostov, docentu sa katedre za farmaciju Medicinskog fakulteta u Nišu, na pomoći, sugestijama i predlozima prilikom izrade i testiranja dermokozmetičkih proizvoda. Redovnom profesoru dr Niku Raduloviću sa Departmana za hemiju PMF-a u Nišu se zahvaljujem na nesebičnom prenošenju znanja iz hemije. Zahvaljujem se dr Nebojši Cekiću, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na pomoći prilikom određivanja reoloških osobina dermokozmetičkih proizvoda. Dr Biljani Arsić, naučnom saradniku PMF-a u Nišu, se zahvaljujem na pruženoj nesebičnoj pomoći u radu. Zahvaljujem se dr Ljubiši Đorđeviću, vanrednom profesoru departmana za biologiju PMF-a u Nišu, na dobronamernim savetima. Posebnu zahvalnost upućujem profesorima Medicinskog fakulteta u Nišu, šefu Instituta za patofiziologiju prof. dr Vladmili Bojanić i prof. dr Zoranu Bojaniću sa katedre za farmakologiju.

Svojoj majci, prof. dr Mileni Miljković, koja mi je omogućila priliku da steknem obrazovanje na doktorskim studijama veliko hvala!



## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	6
2.1 Značaj i upotreba vrste roda <i>Morus</i> .....	6
2.1.1 Hemijski sastav i biološka aktivnost duda.....	8
2.1.2 Upotreba <i>Morus</i> vrste.....	9
2.1.3 Značaj antioksidanasa i antioksidativna aktivnost flavonoida.....	14
2.2 Patogeni mikroorganizmi i antimikrobni agensi .....	18
2.2.1 Osnovne karakteristike bakterijskih sojeva.....	18
2.2.2 Antimikrobna aktivnost ekstrakata <i>M. alba</i> i <i>M. nigra</i> .....	23
2.2.3 Test antibiotici .....	25
2.3 Fitopreparati za lokalnu primenu na koži.....	27
2.3.1 Hidrogeli kao nosači u dermokozmetičkim proizvodima.....	28
2.3.2 Emulzije kao nosači u dermokozmetičkim proizvodima.....	29
2.4 Metode analize.....	34
2.4.1 ICP-OES.....	34
2.4.2 DPPH metoda.....	34
2.4.3 HPLC.....	35
2.4.4 Kvantifikacija efekata dermokozmetičkih proizvoda merenjem biofizičkih parametara kože.....	35
2.4.5 Reološka svojstva proizvoda.....	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	42
3.1 Materijal.....	42
3.2 Metode.....	45
3.2.1 Ekstrakcija biljnog materijala – ploda vrsta roda <i>Morus</i> L.....	45
3.2.2 Određivanje sadržaja makro- i mikroelemenata u listu i ekstraktima.....	46
3.2.3 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata.....	47
3.2.4 HPLC-MS analiza ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus</i> L.....	47
3.2.5 Određivanje sastava etarskog ulja lišća vrsta roda <i>Morus</i> L.....	48
3.2.6 Antimikrobna aktivnost ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus</i> L.....	49
3.2.7 Antimikrobna aktivnost aglikona ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus</i> L.....	51
3.2.8 Izrada hidrogela.....	52
3.2.9 Izrada emulzija tipa U/V.....	53

3.2.10 Reološka merjenja.....	54
3.2.11 Fizička stabilnost formulacija.....	54
3.2.12 Efekat U/V emulzija na kožu ispitanika.....	54
3.2.13 Statistička obrada podataka.....	57
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	58
4.1 Analiza sadržaja makro- i mikroelemenata u listovima i ekstraktima ploda vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	58
4.2 Antioksidativna aktivnost ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	61
4.3 HPLC analiza ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	62
4.4 Masena spektrometrija ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	68
4.5 Sastav etarskog ulja lišća vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	69
4.6 Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	82
4.7 Antimikrobna aktivnost aglikona ekstrakata plodova vrsta roda <i>Morus L.</i> .....	86
4.8 Formulacije sa ekstraktima ploda <i>Morus</i> vrsta.....	88
4.8.1 Organoleptička svojstva.....	88
4.8.2 Reološka svojstva.....	88
4.8.3 Fizička stabilnost.....	91
4.8.4 Studija bezbednosti.....	92
4.8.5 Sedmodnevna studija efekata U/V emulzija na veštački iritiranoj koži.....	95
5. ZAKLJUČAK.....	104
6. LITERATURA.....	108
7. PRILOG.....	128
BIOGRAFIJA.....	137
BIBLIOGRAFIJA.....	138

## Skraćenice

A.	<i>alba</i>
ANOVA	analiza varijanse
C3G	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid
CCDs	karotenoid razdvajajuća dioksidgenaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC	električni kapacitet
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EI	eritema indeks
eng.	engleski
ESR	elektronspin rezonanca
EU	Evropska Unija
GMS	gliceril-mono-stearat
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
ICD	iritantni kontaktni dermatitis
iNOS	inducibilna NO sintaza
KAS	kozmetički aktivne supstance
<i>M.</i>	<i>Morus</i>
<i>m</i>	meta položaj
MA-1	uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svežeg lišća <i>M. alba</i>
MA-2	uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom lišća <i>M. alba</i> , koje je sušeno mesec dana pri sobnoj temperaturi
MAE	emulzija sa ekstraktom <i>M. alba</i>
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MDK	maksimalna dozvoljena koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MN-1	uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svežeg lišća <i>M. nigra</i>
MN-2	uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom lišća <i>M. nigra</i> , koje je sušeno mesec dana pri sobnoj temperaturi
MNE	emulzija sa ekstraktom <i>M. nigra</i>

N.	<i>nigra</i>
NaLS	natrijum laurilsulfat
NHκB	nuklearni faktor kapa-svetlosnog-lanca pojačivač aktiviranih B ćelija
npr.	na primer
P	placebo emulzija – podloga
<i>p</i>	para položaj
PAM	površinski aktivne materije
PDA	fotodiodni niz
PGE2	prostaglandin E2
Ph. EUR.	Pharmacopoeia Europea
Ph. Yug	Pharmacopoeia Jugoslavica
ppb	milijarditi deo
RDA	preporučeni dnevni unos
RI	retencioni indeks
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne vrste kiseonika
sar.	saradnici
SC	<i>stratum corneum</i>
sin.	sinonim
TEA	trietanolamin
TEWL	transepidermalni gubitak vode
tr.	u tragovima
U/V	ulje u vodi
UCO	netretirana kontrola pod okluzijom
UCW	kontrola pod okluzijom bez iritacije
UHPLC	tečna hromatografija ultra visokih performansi
UV	ultra ljubičasto
V/U	voda u ulju
UV-VIS	ultraviolet vidljivo
WHO	Svetska Zdravstvena Organizacija



## 1. UVOD

Biljne vrste roda *Morus* L. (dud) su cenjene zbog ploda i lista koji poseduju. Plod se može konzumirati svež, u vidu soka ili džema, a mladi listovi i peteljke u svežem stanju ili kao čaj u medicinske svrhe (Miljković i sar., 2014). Pored nutritivne vrednosti, plod ima brojna lekovita svojstva. Tradicionalno se koristi u medicinske svrhe jer hrani kožu, čisti krv, koristi se kod bolesti jetre i bubrega, za lečenje urinarnih infekcija, vrtoglavice, zatvora, anemije, za lečenje bola u grlu, groznice i depresije (Darias-Martin i sar., 2003). Plod dudu, koji se može sušiti i čuvati kao prah, bogat je antocijanima, koji predstavljaju osnovni izvor antioksidativne aktivnosti ili se koriste kao prirodne boje u prehrambenoj industriji (Singhal i sar., 2009). Kod različitih vrsta dudu, kao aktivni biomolekuli, identifikovani su: kvanoni i njihovi derivati, mulberofurani, morusin, mulberozidi, oksiresveratrol, izokvercitrin i moracin. Ovi molekuli imaju razna lekovita svojstva, kao što su adstringentno, antimutageno (anti-HIV), antiinflamatorno, antidiuretiko, purgativno itd. (Asano i sar., 1994; Du i sar., 2003; Chen i sar., 2006; Zhang i sar., 2011).

Tek u novije vreme, vrste roda *Morus* L. bile su ozbiljan predmet naučnih istraživanja, bilo da se radi o fitohemijskih istraživanjima, biološkim, biohemijskim, fiziološkim i ekološkim studijama, a sve u cilju njihove bliže karakterizacije i iskorišćenja u medicinske ili prehrambene svrhe. Fitohemijska istraživanja su ukazala na prisustvo različitih jedinjenja u vrstama roda *Morus* L., od kojih su najviše ispitani i istraženi polifenoli prisutni u plodu (Fang i sar., 2002). Međutim, treba imati u vidu da su za biološku aktivnost i terapijske efekte značajne i druge klase poznatih sekundarnih biomolekula. Iako su pojedine vrste dudu veoma poznate u Srbiji, sa aspekta tradicionalne medicine i ishrane, postoji veoma malo podataka u literaturi o fitohemijskom sastavu vrsta roda *Morus* L. sa teritorije Srbije, koje su i predmet ove doktorske disertacije. Obzirom na to, evidentna je potreba za daljom detaljnom karakterizacijom hemijskog sastava vrsta roda *Morus* L. u cilju izrade fitopreparata za dermatološku primenu.

Generalno, istraživanja dudu su pokazala da plod sadrži veliki broj jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji: ugljeni hidrati, polifenoli, masne kiseline i vitamini. Pojedina istraživanja su pokazala da su u plodu prisutne masti (do 1,11%), proteini (do 1,73%) i dijetetska vlakna (do 11,75%) (Imran i sar., 2010). U plodu su prisutni vitamin C, E i B2 (Yang i sar., 2010). Takođe, potvrđeno je prisustvo velike količine antocijana i drugih polifenolnih komponenata (Ozgen i sar., 2009). U zavisnosti od vrste dudu, podneblja i klimatskih uslova gajenja, od fenolnih kiselina najzastupljenije su: hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska i hlorogenska kiselina (Ercisli i Orhan, 2008). Biološka

istraživanja vrsta roda *Morus* L. pokazala su da plodovi, a posebno razni ekstrakti ili izolovane komponente, pokazuju brojne biološke aktivnosti, što potvrđuje i široku primenu vrsta roda *Morus* L. u tradicionalnoj istočnjačkoj medicini (Sun i sar., 2011). Tako se npr. od ploda pravi nakiseo sirup, koji se koristi u narodnoj medicini za lečenje grozničavih stanja, lezija u ustima, kao lek protiv dizenterije, laksativ, antihelminetik, ekspektorans, hipoglikemik i emetik (Ercisli i Orhan, 2008). Brojne studije fitopreparata na bazi ekstrakata različitih vrsta duda pokazale su njihova dobra analgetička, diuretička, antiseptička, antidijabetična, sedativna, hipoglikemična, kao i antiinflamatorna i hipotenzivna svojstva. Pored toga, delimično je istraženo i delovanje nekih ekstrakata ploda duda na razne bolesti kože, gde je potvrđena antimikrobna, antioksidativna, antiinflamatorna pa čak i antitumorna aktivnost (Butt i sar., 2008). Ovi eksperimenti su otvorili novo polje istraživanja, sa idejom realizacije nekih fitopreparata na bazi ekstrakata ploda biljnih vrsta roda *Morus* L. (*Moraceae*), što je i predmet rada ove disertacije.

Imajući u vidu navedene činjenice, u skladu sa eksperimentalnim planom ove disertacije, postavljeni su sledeći ciljevi:

- izbor optimalne tehnike ekstrakcije ploda biljnih vrsta roda *Morus* L. (*Morus alba* L., *Morus nigra* L.) u cilju dobijanja aktivnih supstanci za dalju primenu;
- karakterizacija ekstrakata dobijenih iz plodova biljnih vrsta roda *Morus* L.;
- izolovanje i karakterizacija etarskih ulja iz lista biljnih vrsta roda *Morus* L.;
- određivanje mikro- i makroelemenata prisutnih u plodu i listu biljnih vrsta roda *Morus* L.;
- testiranje antimikrobne aktivnosti ekstrakata ploda vrsta roda *Morus* L. protiv patogenih bakterija kože i drugih patogenih sojeva u poređenju sa referentnim antibioticima;
- određivanje područja primene svakog ekstrakta na osnovu dokazane biološke aktivnosti i razrada odgovarajuće formulacije preparata za lokalnu primenu na koži;
- razvoj postupka izrade proizvoda na bazi ekstrakta u formi emulzije ili hidrogela za lokalnu primenu na koži;
- testiranje formulacija preparata tehnikama kvantifikacije biofizičkih parametara kože i utvrđivanje efekata formulacija na kožu zdravih ispitanika.

Eksperimentalni deo disertacije, nakon izrade i standardizacije metanolnih ekstrakata određenog biljnog materijala, odnosio se najpre na utvrđivanje njihove antioksidativne i antimikrobne aktivnosti. U tom smislu, testirana je antimikrobna aktivnost dobijenih ekstrakata ploda, protiv patogenih bakterijskih sojeva koji izazivaju infekcije kože, kao i

protiv sojeva odgovornih za nastajanje akni (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus pyogenes*), kao i protiv sojeva odgovornih za infekcije rana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* i *Enterococcus faecalis*). U ove svrhe su testirani sojevi iz ATCC kolekcije, kao i sojevi izolovani iz briseva rana ispitanika. Istraživanje sinergije ekstrakata ploda biljnih vrsta roda *Morus* L. i nekih komercijalnih antibiotika protiv bakterija koje izazivaju kožna oboljenja može pomoći kod razvoja novih dermokozmetičkih formulacija, sa ciljem smanjenja koncentracije aktivnih komponenti, povećanjem efikasnosti lečenja, a samim tim i smanjenog rizika upotrebe antibiotika.

Na osnovu pregleda objavljenih naučnih radova, kao i naših saznanja, istraživanja antimikrobne aktivnosti aglikona ekstrakata ploda duda nisu dosad rađena. Zbog toga su, u okviru ove disertacije, urađene studije antimikrobne aktivnosti aglikonskih komponenti metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra*.

Poslednjih nekoliko godina, sve je veći akcenat na proizvodnji dermokozmetičkih proizvoda za negu koji u sebi sadrže aktivnu supstancu biljnog porekla, tj. fitopreparata za lokalnu primenu na koži. Ta potreba se i sama nameće zbog učestalosti pojave alergija, iritacija kože i drugih komplikacija koje mogu nastajati zbog upotrebe sintetičkih kozmetički aktivnih supstanci koje često pokazuju visok potencijal za iritaciju kože (Lindee, 2000). Takođe, bitan je i pravilan izbor nosača – podloge fitopreparata za lokalnu primenu na koži. Pravilan izbor nosača aktivne supstance predstavlja jedan od najbitnijih koraka u formulaciji proizvoda za lokalnu primenu na kožu (Tasić-Kostov i sar., 2014). Obzirom da se kao najčešći nosači u formulaciji fitopreparata za primenu na kožu koriste emulzioni sistemi tipa ulje u vodi (U/V), kao i hidrogeli, u ovoj disertaciji je posebna pažnja posvećena izboru optimalnog sistema. Pravilan izbor nosača može u mnogome uticati na efekte aktivne supstance, kao i samog fitopreparata u celini (Tasić-Kostov i sar., 2014).

Prema kozmetičkoj direktivi 76/768/EEC i Uredbi EU o kozmetičkim proizvodima – Regulation (EC) No 1223/2009, a koji predstavljaju važeće propise na teritoriji EU, kozmetički proizvod se definiše kao “bilo koja supstanca ili preparat namenjen kontaktu sa različitim spoljašnjim delovima ljudskog tela (epidermis, kosa, nokti, usne i spoljašnji genitalni organi), ili sa zubima i sluzokožom usne duplje, sa ciljem da ih štite, parfimišu, menjaju njihov izgled i/ili koriguju mirise tela i/ili štite, odnosno održavaju ih u dobrom stanju”. Zakonski propisi iz ove oblasti u Italiji daju definiciju kozmetičkog proizvoda kao “bilo koje supstance ili preparata, pod uslovom da nije lek ili medicinsko sredstvo,



namenjeno kontaktu...” (Morganti i Paglialunga, 2008). U Sjedinjenim Američkim Državama, Administracija za hranu i lekove definiše kozmetičke proizvode kao “proizvode namenjene utrljavanju, izlivanju, posipanju ili raspršivanju na i/ili u ljudsko telo/delove ljudskog tela sa ciljem da: čiste, ulepšavaju, popravljaju i/ili menjaju izgled, ili kao supstance koje se primenjuju kao sastojci bilo kog kozmetičkog preparata, sa izuzetkom sapuna” (FDA,1938).

Klasa proizvoda koji se nalaze na granici kozmetičkog proizvoda i dermatološkog leka, nije zvanično regulisana ni klasifikovana od strane nekog zakonodavnog tela u svetu (Gendler, 2005). U Evropi se za ove proizvode koristi termin dermokozmetički proizvodi ili medicinska kozmetika. Kod nas se nazivaju preparatima funkcionalne kozmetike. Engleska reč *cosmeceuticals*, odnosno kozmeceutici na srpskom jeziku, predstavlja semantičku mešavinu termina kozmetika (eng. *cosmetics*) i lek (eng. *pharmaceutics*). Ovaj termin je prvi put upotrebljen 1984. godine od strane američkog dermatologa Alberta Kligmana (Kligman, 2005).

Dermokozmetički proizvodi, kao nova grupa preparata za lokalnu primenu na koži, koji su “manje od leka ali više od kozmetičkog proizvoda” zavređuju globalnu pažnju. U Japanu se ova klasa proizvoda već godinama naziva kvazi-lekovima (eng. *quasi drugs*) (Kligman, 2005). Kozmetička industrija je sektor koji se bavi proizvodnjom i stavljanjem u promet proizvoda koji odgovaraju definiciji dermokozmetičkih proizvoda. Prema nekim podacima, čak 90% kozmetičkih proizvoda na svetskom tržištu ustvari odgovara definiciji dermokozmetičkih proizvoda (Choi i Berson, 2006).

Prema 6. Amandmanu kozmetičke direktive Evropske Unije (EU), obavezna je procena stvarnih efekata proizvoda, ako je moguće, sprovođenjem humanih *in vivo* studija na dobrovoljnim ispitanicima (Regulation EC No 1223/2009). Na taj način, proizvođači ne mogu da predstavljaju neke efekte proizvoda koji zapravo ne postoje. Iz ovih razloga je neophodna naučna potvrda o efektima (eng. *claim substantiation*), koji se pripisuju dermokozmetičkom proizvodu, bez obzira na namenu (Vasiljević i sar., 2007). Ovi podaci moraju biti rezultat stručne, objektivne, validirane i verifikovane procene svih deklariranih, odnosno reklamiranih efekata dermokozmetičkih proizvoda. Najčešće se ti efekti dokazuju neinvazivnim metodama (tzv. kvantifikacijom biofizičkih parametara kože), a koje se baziraju na merenju biofizičkih svojstava kože (električne karakteristike vode u koži, mehanička svojstva kože). Na osnovu biofizičkih svojstava kože mogu se odrediti parametri kao što su: sadržaj vlage u koži, pH vrednost, procena boje kože, procena iritacije kože, transepidermalni gubitak vlage (Vasiljević i sar., 2007).

Merenjem i analizom navedenih parametara kože, pre i posle aplikacije formulisanih fitopreparata na bazi ekstrakata ploda duda, došlo se do ključnih zaključaka na osnovu kojih se mogu, pored bezbednosti, definisati i druga svojstva i efekti na kožu istraživanih formulacija fitopreparata u ovoj disertaciji. Aplikovanjem formulisanih dermokožmetičkih fitopreparata sa ekstraktima ploda biljnih vrsta roda *Morus* L. na kožu ispitanika, dobijena je potvrda o njihovom dejstvu *in vivo*. Nakon svih izvršenih operacija u procesu pripreme ekstrakta i fitopreparata u formi emulzija, definisana je nova formulacija fitopreparata za lokalnu primenu na kožu.

Dobijeni rezultati imaju originalni naučni doprinos u razvoju tehnoloških postupaka i procesa izrade fitopreparata na bazi bioaktivnih principa, primene prirodnih bioaktivnih proizvoda za tretman raznih stanja kože, kao i potvrde efikasnosti proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1 Značaj i upotreba vrste roda *Morus*

Dud pripada rodu *Morus*, familiji Moraceae. Zbog postojanja velikog broja vrsta i podvrsta roda *Morus* taksonomija duda je vrlo složena. Rod *Morus* sadrži više od 150 objavljenih vrsta. Samo 10-16 njih je opšte prihvaćeno i citirano od strane priznatih biologa (Economic Division, 2012). U Tabeli 1. je prikazana naučna klasifikacija duda.

**Tabela 1. Naučna klasifikacija duda**

Carstvo	<i>Plantae</i> – Biljke
Podcarstvo	Tracheobionta – Vaskularne biljke
Razdeo	Magnoliophyta – Skrivenosemenice
Klasa	Magnoliopsida – Dikotiledone biljke
Podklasa	Hamamelididae
Red	Rosales
Familija	Moraceae – Porodica duda
Rod	<i>Morus</i> L. – Dud
Vrsta	<i>Morus alba</i> L. (Beli dud), <i>Morus nigra</i> L. (Crni dud)

Rod *Morus* buhvata 10 do 16 listopadnih drveta. Vrste koje su opšte prihvaćene su:

- *Morus australis* Poir. – eng. *chinese mulberry*
- *Morus celtidifolia* Kunth.
- *Morus insignis*
- *Morus mesozygia* Staph. – eng. *african mulberry*
- *Morus microphylla* – eng. *Texas mulberry*
- *Morus nigra* L. – eng. *black mulberry*
- *Morus alba* L. – eng. *white mulberry*

Vrste roda *Morus* nalaze se u različitim klimatskim zonama, od umerenih do subtropskih na severnoj hemisferi i tropskih na južnoj, a mogu i da rastu u širokom intervalu klimatskih i topografskih uslova, kao i na različitim tipovima zemljišta. Vrste koje rastu u Srbiji i koje su predmet istraživanja ove doktorske disertacije su: *Morus alba* L. (beli dud) i *Morus nigra* L. (crni dud) iz jugoistočne Srbije (Donji Barbeš).

Beli dud (*Morus alba* L.) je drvo do 20 m visoko, sa okruglastom krošnjom, duboko ispucale kore. Mladi izdanci su goli, sadrže mlečni sok, kao i lisne peteljke. Listovi su naizmenični, širokojajasti, jednostavni ili ređe sa 2-3 nepotpuno razvijena režnja, obično goli, nazubljenog oboda. Muški cvetovi su u cilindričnim resama, četvoročlani i sa 4 prašnika, ženski u sličnim cvastima. Plod je složen, dudinja, beo, sladak i jestiv (Sarić, 1989). Dudinje su 2-8,5 cm dugačke, cilindričnog ili ovalnog oblika (Slika 1.). Pupaljci su jajoliki, oko 6 mm veliki, smeđe-sivi. Listovi su naizmenični od 4 do 14 cm dugi i od 4 do 10 cm široki. Uzgaja se u drvodredima, živim ogradama, parkovima i baštama. U prve dve godine raste veoma sporo, a kasnije znatno brže. Ima razvijen koren, pa je pogodan za vezivanje erozivnih zemljišta (Katsube i sar., 2006).



**Slika 1. Plod belog i crnog duda, *Morus Nigra* L.**

(<https://www.pinterest.com/pin/562035228474139103/>, [http://www.mi-aime-a-ou.com/Morus\\_nigra.php](http://www.mi-aime-a-ou.com/Morus_nigra.php),

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Illustration\\_Morus\\_nigra0.jpg/220px-Illustration\\_Morus\\_nigra0.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Illustration_Morus_nigra0.jpg/220px-Illustration_Morus_nigra0.jpg))

Crni dud (*Morus nigra* L.) je drvo preko 20 m visoko, sa gustom krošnjom. Kora stabla je višebojna, od zelene, narandžaste do tamno sive. Izdanci su dlakavi, a listovi debeli, široko jajasti, nazubljenog oboda ili nepravilno režnjeviti, sa naličja hrapavi, oštrodlakavi. Muški i ženski cvetovu su skupljeni u savijene rese. Cvetni omotač i žigovi su dlakavi. Plod je složen – dudinja, crno-ljubičasta do crna, gotovo dvostruko veća od onih kod belog duda (Sarić, 1989).

Za dud je karakteristična i anizofilija, tako da listovi mogu biti i nepravilno podeljeni na 2-3 režnja. Cvetovi su bele boje, jednopolni, raspoređeni u klasove u pazusima listova. Ženski cvetovi su grupisani u uspravne, valjkaste, kratke klasove, sa cvetnim omotačem koji ima 4 listića perijanta i 2 karpel, koji su prekriveni dugim, mekim dlakama. Muški cvetovi su u cvastima nalik na rese dužine 1,5-3 cm, cvetni omotač takođe ima 4 listića perijanta spojenih pri bazi i 4 prašnika (Chevallier, 1996). Složen plod je cvast srasla u jedno plodište, dudinju, slatkog ukusa, koja je sočna, bez izražene arome, tamnoljubičaste ili crne boje, sa mnogo semenki (Slika 1.). Kada se cvetovi opraše, plod počinje da bubri, sve dok na kraju ne postane skroz promenjen u teksturi i boji, sočan i pun soka (Lee i sar., 2008).

Dud se sadi duž puteva, po parkovima, ivicama parcela, oko vinograda, po dvorištima. Drvo dudu živi i do 250 godina. Voli toplo, dobro isušeno zemljište i ilovaču, a crni dud je pogotovo vredan gajenja, zbog raskošnog lišća i živopisnog oblika (Chevallier, 1996). Prema narodnom verovanju, "Dud nije dobro držati kraj kuće, jer ako žila od njega pod kuću dođe, cela će kuća izumreti". Takođe, dud, pored ostalih, se ubraja u srećna drva (Čajkanović, 1994). U dvorištu Patrijaršije u Peći nalazi se staro živo stablo crnog dudu koje se razvilo iz mladice, donesene iz današnje Sirije, zasađeno po predanju između 1203. i 1272. godine (Sarić, 1989). *M. alba* je otporan na sušu, zagađenja i korozivno zemljište. *M. nigra* je osetljiviji, posebno u hladnim klimatskim područjima i tamo gde su vlažna leta.

### **2.1.1 Hemijski sastav i biološka aktivnost dudu**

Vrste roda *Morus* su privukle pažnju brojnih istraživača. Istraživanja su rađena sa ciljem određivanja fitohemijskog sastava, bioloških, biohemijskih i fizioloških karakteristika, a sve u cilju korišćenja saznanja radi potvrde postojećih ili pronalaženja novih saznanja o primeni i lekovitosti ove biljne vrste. Najviše su istraživani polifenoli prisutni u plodu dudu, ali su značajni i karotenoidi, mikro-, makro- i toksični elementi, kao i masne kiseline.

Fitohemijskim istraživanjima, u vrstama roda *Morus* su identifikovani alkaloidi, flavonoidi, flavoni, flavanoni, stilbeni, benzofenoni, kumarinski derivati i terpenoidi (Chen i sar., 2013). Ove komponente su odgovorne za biološku aktivnost. Pored toga, stilbeni, oksiresveratrol i resveratrol, koji su identifikovani, imaju i antioksidativno dejstvo (Jin i sar., 2002).

Dud je izvor askorbinske kiseline, od koje je preko 90% prisutno u redukovanom obliku, i takođe sadrži karotene, vitamin B1, folnu kiselinu, izokvercetin, kvercetin, tanine, flavonoide i saponine, koji se ponašaju kao dobri prirodni antioksidansi. Mnoge biološki aktivne komponente kao što su moranolin, albufuran, albanol, morusin, kuvanol, kalistegin i

hidroksimoracin su izolovane iz duda i imaju važnu ulogu u farmaceutskoj industriji (Bose i sar., 1989).

Plodovi duda su bogati flavonoidima i imaju svojstven osvežavajući ukus (Kutlu i sar., 2011). Pokazano je da osušeni plodovi duda poseduju antioksidativna, antimikrobna i antiinflamatorna svojstva (Butt i sar., 2008). Dud sadrži bioaktivne komponente, kao što su alkaloidi, antocijani i flavonoidi (Hassimotto, Genovese i Lajolo, 2007).

Resveratrol (*trans*-3, 4', 5-trihidroksistilben) i oksiresveratrol (*trans*-2,3',4,5'-tetrahidroksistilben) su hidroksistilbeni nađeni u brojnim biljnim vrstama, kao što je grožđe, kikiriki, i dud (Golkar i sar., 2007). Resveratrol ima i neuroprotektivno dejstvo (Wangi sar., 2002; Bastianetto i sar., 2000), a pokazuje i kardioprotektivno dejstvo (Bradamante i sar., 2004). Oksiresveratrol inhibira proizvodnju azot(II)-oksida (NO), ekspresiju inducibilne NO sintaze (iNOS), produkciju prostaglandina E2 (PGE2), i aktivaciju nuklearnog faktora kapa-svetlosnog-lanca pojačivača aktiviranih B ćelija (NHκB) u makrofagima; takođe, konzistentno smanjuje edem indukovano karagenanom (supstanca ekstrahovana iz crvene i ljubičaste morske trave) kod eksperimentalnih miševa (Chung i sar., 2003).

Predmet istraživanja duda najčešće je bio plod, dok list zauzima centar pažnje tek u novije vreme. List sadrži sastojke kao što su minerali, vitamini, aminokiseline, steroli, flavonoidi, alkaloidi, polisaharidi i mikroelementi (Ouyang i sar., 2005), askorbinska i folna kiselina, β-karoten, vitamini D i B1 (Arabshahi-Delouee i sar., 2007). Listovi *M. alba* sadrže rutin, kvercetin i apigenin kao bioaktivne sastojke (Doi i sar., 2001). Jedan od glavnih sastojaka *M. alba* je 1-deoksinojirimicin (Nuengchamnong i sar., 2007). Otkriveno je da ekstrakt lista *M. alba* u makrofagama stvara azotnu kiselinu, prostaglandin E2 i citokine (Ouyang i sar., 2005). Za lekovito dejstvo lista duda je bitno prisustvo fenola, odnosno fenolnih kiselina i flavonoida: rutina, kvercetina i izokvercetina. Detektovano je prisustvo sledećih fenolnih kiselina: protokatehinske, vanilinske, siringinske, para (*p*)- i meta (*m*)-kumarinske i hlorogenske kiseline. Izolovana su i jedinjenja drugih klasa kao što su antocijani (Memon i sar., 2010).

### **2.1.2 Upotreba *Morus* vrste**

Globalno, dud se koristi prvenstveno za hranjenje svilenih buba na plantažama u proizvodnji svile. Danas je Turska lider po organizovanom uzgajanju duda, gde se najviše uzgaja *M. alba* (95%), zatim *M. rubra* (3%) i najmanje *M. nigra* (2%) (Ercisli i Orhan, 2007). Različiti delovi *Morus* vrsta, kao što su lišće, plod, grane, kora, koren, se koriste kao hrana i u tradicionalnoj kineskoj medicini više od 1900 godina (Singab i sar., 2005). Koriste se kao

narodni lek u lečenju bolesti zuba, dijabetesa, hipertenzije, artritisa i anemije (Sass-Kiss i sar., 2005). U tradicionalnoj kineskoj medicini plod duda se koristi za lečenje vrtoglavice i zamagljenog vida (Du i sar., 2008). Takođe, poseduje i antimikrobno i antivirusno dejstvo (Li i sar., 2004; Parrotta i sar., 2001).

Kada su plodovi duda zreli, vrlo slatki, beli, aromatično nakiselo-slatki, tamnoljubičaste ili potpuno crne boje, jedu se sveži, prerađeni ili osušeni. Osušeni plodovi duda mogu da zamene šećer i zbog toga se melju i dodaju testu pri izradi slatkiša. Od ploda duda se izrađuju sokovi, kompoti, slatka, želei, sirupi i dr. Od iscedenog soka uparavanjem dobija se sirup koji podseća na med (i sadrži u koncentrovanom obliku hranljive sastojke svežeg soka ploda duda). U narodnoj medicini sveži, nedozreli plodovi duda se daju protiv proliva, a zreli kao blag laksans. Sok ploda duda se daje i za lakše iskašljavanje, znojenje i mokrenje, za ispiranje kod zapaljenja grla i usta, naročito sok ploda *M. nigra*, koji deluje i antiseptično.

U korejskoj tradicionalnoj medicini od lisnih pupoljaka duda koje se sakupljaju preko zime i suše, spravljaja se čaj protiv gojaznosti i oboljenja kardio-vaskularnog sistema. Prašak od kore stabla duda upotrebljava se spolja u obliku melema za brže zarašćivanje rana, a čaj od kore se pije kod povišenog krvnog pritiska. U Kini je kora duda sastojak biljnih smeša za lečenje šećerne bolesti. U zapadnoj Evropi i na Balkanu u iste svrhe koriste osušeno dudovo lišće koje se ponegde kao prašak posipa po hrani (npr. varivu). Antidijabetično delovanje se delimično pripisuje prisustvu vitamina B2 i ima značaj kao dopunska terapija. U Japanu se iz cvetova duda izrađuje dermokozmetički krem za odstranjivanje pega i drugih nečistoća na koži. Od fermentisanih zrelih plodova duda u narodu se peče rakija dudovača. Mladi, zdravi i potpuno razvijeni listovi beru se tokom leta i suše u tankom sloju na promaji u hladu. Još od vremena Dioskorida preporučuje se gorka kora korena duda kao lek protiv crevnih parazita (naročito protiv *tenie* odnosno trakavice – pantljičare) (Sarić, 1989).

Uloga lista *M. alba* u srpskoj medicini se ogleda u tome da se koristi za spremanje čaja protiv žutice (Tanović, 1927). List duda se koristi i za ublažavanje nesanice, a to se objašnjava efektom koji ostvaruje melatonin, supstanca koja je uključena u regulaciju cirkadijalnog ritma i poremećaju spavanja. Značajne količine ove supstance u listovima duda ukazuju da su dobar izvor iste (Pothinuch i sar., 2011). Takođe, list duda se u narodnoj medicini najčešće primenjuje u lečenju šećerne bolesti, oboljenja urinarnog trakta i kože (Butt i sar., 2008).

Blagotvorno dejstvo voća i povrća na zdravlje pripisano je visokom sadržaju raznovrsnih fitohemijskih jedinjenja, od kojih su najzastupljenija fenolna jedinjenja

(Henionen i sar., 1998). Fenolna jedinjenja imaju jako izraženu antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sar., 1995), i zbog toga im se pripisuju mnoga terapijska delovanja: antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (Harborne i Williams, 2000; Havsteen, 1983; Pathak i sar., 1991). Fenolna jedinjenja su dosta zastupljena u obojenom voću (voće roda *Vaccinium*, *Ribes*, *Rubus*, *Fragaria* i *Morus*) pa zbog toga ovo voće služi kao jedan od najvažnijih izvora fenola (Kähkönen i sar., 2001; Williner i sar., 2003).

Prema literaturnim navodima, lišće duda može da se koristi u medicinske svrhe, sveže ili osušeno (Bown. 1995). Lišće duda, kao i drugi biljni čajevi ili biljke koje se koriste u medicini, se često koristi kao suva droga za skladištenje ili u svrhu potrošnje.

Mnogi elementi utiču i na sekundarni metabolizam biljaka pa samim tim i na produkciju biološki aktivnih jedinjenja biljne vrste u kojoj se stvaraju (Sykorova i sar., 2009; Ozcan, 2004). Za normalno funkcionisanje ljudskog organizma, čoveku su u toku jednog dana potrebne količine pojedinih sastojaka koje se kreću u opsegu reda veličina od grama do pikograma. Makrosastojci (proteini, ugljeni hidrati i lipidi) ulaze u sastav strukturnih i funkcionalnih komponenti ćelija (gradivna funkcija) i izvor su energije. Mikro sastojci (vitamini i minerali) su komponente enzima i kofaktora koji su neophodni za metaboličke procese. Minerali su neophodni u ishrani za normalno odvijanje metaboličkih funkcija, transmisiju nervnih impulsa, pravilno formiranje koštanog tkiva, regulaciju balansa vode i soli (Kalac i Svoboda, 2000).

U ljudskom organizmu se nalazi veliki broj različitih jona metala, koji se mogu svrstati u dve grupe. Metali koji se javljaju u relativno visokim količinama i koje dnevno treba unositi oko 100 mg i više, nazivaju se makroelementi ili makrominerali. U ovu grupu se ubrajaju kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum. Metali koji se javljaju u malim količinama i čija dnevna doza je oko par miligrama ili manje, nazivaju se mikroelementi ili mikrominerali odnosno elementi u tragovima. U ovu grupu metala spadaju gvožđe, cink, bakar, mangan, selen, kobalt, nikl, hrom, bor i dr.

Mikroelementi ili mikronutrijenti – (elementi u tragovima, esencijalni elementi), su esencijalni sastojci hrane neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. Mikroelementi ili mikronutrijenti – (elementi u tragu, esencijalni elementi), su esencijalni sastojci hrane neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. World Health Organization - WHO) (WHO, 1996) elementi u tragovima se na osnovu hranljivog značaja koji imaju za ljudski organizam dele u tri grupe:



- 1) esencijalni elementi (Zn, Fe, Se, Cu, Mo i Cr);
- 2) elementi koji su najverovatnije esencijalni (Mn, Si, Ni, Co, B i V);
- 3) potencijalno toksični elementi koji nemaju nikakvu esencijalnu funkciju (Pb, Cd, Hg, As, Al, Li, Sr, Ba, Sb i Sn).

Esencijalni mikroelementi su neophodni organizmu kako za rast, tako i za održavanje života i zdravlja. Deficit nekog od esencijalnih elemenata dovodi do funkcionalnih poremećaja. Ako dođe do smanjenja koncentracije nekog elementa dolazi do izmenjene biološke funkcije (javlja se deficit tog elementa), a ako se poveća iznad određene koncentracije isti element može imati toksično dejstvo.

Gotovo svi makro- i mikroelementi koji se mogu naći u delovima duda (plodu i listu) su potrebni za normalno funkcionisanje bioloških sistema i pozitivno deluju na opšte zdravstveno stanje. Utvrđeno je prisustvo 10 elemenata od kojih je kalijum dominantan, a zatim slede azot, fosfor, kalcijum, magnezijum, natrijum, gvožđe, mangan, cink i bakar (Ercisli i Orhan, 2007; Lin i Lai, 2009; Imran i sar., 2010; Yang i sar., 2010). Visok nivo gvožđa u *M. nigra* je od velikog nutritivnog značaja, naročito u onim delovima sveta gde su anemija i nedostatak gvožđa relativno česte pojave (Imran i sar., 2010).

Nekoliko različitih autora je u svojim radovima predstavilo rezultate koji se odnose na sadržaj makro- i mikroelemenata u različitim vrstama duda (Ercisli i Orhan, 2007; Ercisli i sar., 2010; Dimitrijević, 2014). Istraživanja su pokazala da voće duda sadrži bitne makroelemente, kao što su kalijum (K), natrijum (Na) i kalcijum (Ca), kao i mikroelemente, kao što su gvođe (Fe), cink (Zn) i nikel (Ni) (Tabela 2.).

**Tabela 2. Sadržaj makro- i mikroelemenata u plodovima *M. alba* i *M. nigra* sa različitih geografskih područja u (mg/100 g)**

	<i>Morus alba</i> L.	<i>Morus alba</i> L.	<i>Morus alba</i> L.	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus nigra</i> L.
	Turska	Pakistan	Jugoistočna Srbija	Turska	Pakistan	Jugoistočna Srbija
N	75	/	/	800	/	/
P	247	/	/	289	/	/
K	1668	1731	/	1005	1270	/
Ca	152	574	/	137	470	/
Mg	106	240	/	108	240	/
Na	60	280	/	58	272	/

**Tabela 2. –nastavak–**

Fe	4,2	73	23,06±1,02	5	77,6	42,13±7,17
Cu	0,5	/	0,86±0,05	/	/	1,07±0,14
Mn	3,8	/	2,32±0,31	7	/	0,81±0,09
Cd	/	/	2,45±0,23			1,77±0,13
Ni	/	2,2	0,36±0,01	/	1,6	0,27±0,00
Zn	2,8	50,2	2,23±0,17	3	59,2	3,40±0,05
Pb	/	/	0,09±0,01			0,14±0,01
Literatura	Ercisli i Orhan, 2007	Imran i sar., 2011	Dimitrijević, 2014	Ercisli i sar., 2010	Imran i sar., 2010	Dimitrijević 2014

Značajne koncentracije makro- (kalijum, natrijum, kalcijum i magnezijum) i mikroelemenata (gvožđe, cink i nikl) su pronađene u svim vrstama dudu. Sadržaj kalcijuma se kreće od 137 mg/100 g do 574 mg/100 g svežeg voća. Sadržaj magnezijuma se kreće od 106 mg/100 g do 240 mg/100 g voća dok se sadržaj natrijuma kreće od 58 mg/100 g do 280 mg/100 g. Kalijum je najdominantniji i njegova koncentracija se kreće u rasponu od 1005 mg/100 g do 1731 mg/100 g svežeg voća (Ercisli i sar., 2007; Imran i sar., 2010).

U Republici Srbiji su definisane preporučene dnevne doze pojedinih nutrijenata u cilju preventive i što bolje zdravstvene zaštite ljudi (Tabela 3.). Podaci o pojedinim makro- i mikronutrijentima regulisani su Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica kojim su propisane preporučeni dnevni unos (RDA) vrednosti za vitamine i mineralne materije koje su usklađene sa evropskim vrednostima, bez oznake na koju populacionu grupu se odnosi (Pravilnik o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica, 2004). Preporučeni dnevni unos (RDA) pojedinih elemenata dat je u Tabeli 3.

**Tabela 3. Preporučeni dnevni unos pojedinih metala u RS za odrasle osobe**

Element	Preporučeni dnevni unos
Kalijum	2000 mg
Kalcijum	800 mg
Magnezijum	375 mg
Gvožđe	14 mg
Cink	10 mg
Bakar	1 mg
Mangan	2 mg

**Tabela 3. –nastavak–**

Selen	55 µg
Hrom	40 µg
Molibden	50 µg

U savremenoj farmaceutskoj industriji dud nalazi svoje mesto u pripremi sirupa koji se koristi za bojenje lekova prirodnom bojom (Singhal i sar., 2009).

Ako dermokozmetički proizvodi sadrže teške metale, onda oni mogu da izazovu oštećenje epitela kao i crvenilo kože. S obzirom na kumulativni efekat teških metala i štetne efekte po ljudski organizam koji iz toga mogu da proisteknu, važno je obratiti pažnju na ovu tematiku. Naime, teški metali se mogu absorbovati kroz kožu pa čak i da stignu do telesnih tečnosti. Putem telesnih tečnosti, ovi toksini mogu stići do vitalnih organa (Velimirović, 2016). Studije su pokazale da dermokozmetički proizvodi mogu biti način na koji toksični metali dospevaju u ljudsko telo (Bocca i sar., 2014; Marinovich i sar., 2014). Ovaj put unosa toksičnih metala je značajan zbog direktnog kontakta sa kožom dermokozmetičkog proizvoda koji ih možda sadrži (Sainio i sar., 2000).

Zbog navedenih razloga, postoje zakonske regulative kojima je regulisan maksimalni dozvoljeni sadržaj pojedinih elemenata u proizvodima koji dolaze u kontakt sa kožom. Ova oblast je u Republici Srbiji regulisana Pravilnikom o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavlјati u promet.

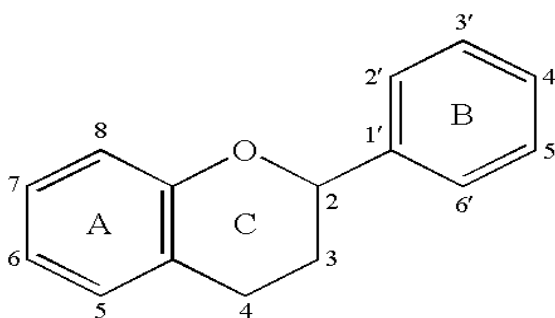
### **2.1.3 Značaj antioksidanasa i antioksidativna aktivnost flavonoida**

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanasa jeste ona prema kojoj su antioksidansi “supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata” (Halliwell, 1990).

Redukcija atmosferskog kiseonika je jedan od načina formiranja slobodnih radikala (superoksidni anjon, peroksi radikal, alkoksi radikal, itd.). Slobodni radikali su visoko reaktivne oksidativne vrste, koje su sposobne da hemijski reaguju sa velikim brojem organskih jedinjenja u biološkim i hemijskim sistemima. Slobodno radikalske reakcije se navode u etiologiji mnogih bolesti, kao i u samom procesu starenja. Pored nekoliko “dobrih” slobodno radikalskih reakcija kao što su fotosinteza, redukcija nukleozida i fagocitoza, većina slobodno radikalskih reakcija su povezane sa patološkim stanjima, koja dovode do oštećenja ćelije i pojačanja mutagenih i kancerogenih procesa.

Kako hemijske reakcije koje uključuju slobodne radikale mogu uticati na fizičke, hemijske i biološke osobine hrane, dermokozmetičkih i drugih proizvoda, istraživanja mogućnosti njihove inhibicije su od visoke važnosti. Danas je poznata činjenica da mnogi prirodni proizvodi, čija se struktura karakteriše postojanjem fenolnih ili kateholnih grupa, pokazuju aktivnost u oksidativnim procesima sa kiseonikom iz vazduha, koji im daje antioksidativnu sposobnost. Sposobnost inaktivacije vazdušnog kiseonika takođe, poseduju i enzimski sistemi, tokoferol, askorbinska kiselina, flavonoidi, karotenoidi i mnoga druga prirodna jedinjenja.

Antioksidativna jedinjenja, pored sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, mogu i da eliminišu singletni kiseonik, redukuju jedinjenja kreatina, završavaju propagacionu fazu u kojoj se formiraju hidro-peroksi lipidi i efikasno štite važne biomolekule (lipide, proteine, nukleinske kiseline) od oksidacije (Harborne i Williams, 2000; Cody i sar., 1988). Pokazano je da su strukturne osobine veoma važne za visoku antioksidativnu aktivnost flavonoida. Dobijeni rezultati pokazali su da sposobnost hvatanja radikala zavisi od strukture i supstituenta na heterocikličnom prstenu B. Poznato je i da orto supstituenti na prstenu B, posebno oni sa elektron-donorskim osobinama, redukuju redoks potencijal molekula i povećavaju sposobnost gašenja slobodnih radikala. Među glavnim zahtevima za dobru antioksidativnu aktivnost je prisustvo karbonilne grupe u C4 položaju flavonoida, dvostruke veze između C2 i C3 koja je konjugovana sa 4-okso grupom i koja omogućava veću delokalizaciju elektrona, kao i prisustvo C3 hidrosilne grupe.



**Slika 2. Osnovna struktura flavonoida**

Uočeno je da glikozidacija hidrosilne grupe, posebno C3 položaja, usled sternih efekata, znatno redukuje antioksidativni kapacitet određenih klasa flavonoida. Antioksidativna aktivnost flavonoida, pored direktne reakcije sa radikalom (hvatanja), uključuje i kopigmentaciju i helatirajuće reakcije sa metalnim jonima (Fiorani i sar., 2002;

Fernandez i sar., 2002). Ove reakcije igraju važne i višestruke uloge u biološkim sistemima. Formiranjem flavonoid-DNK kopigmentacionog kompleksa sprečava se oksidativno oštećenje DNK molekula. Poznato je i da flavonoid-askorbinska kiselina kopigmentacioni kompleks sprečava oksidativnu degradaciju askorbata. Veliki broj flavonoida može efikasno graditi helate sa jonima metala u tragovima kao što su: Fe(II), Fe(III), Cu(II) ili Zn(II). Helatiranjem metalnih jona flavonoidi sprečavaju generisanje slobodnih radikala koje je katalizovano metalima (Fernandez i sar., 2002; Fiorani i sar., 2002).

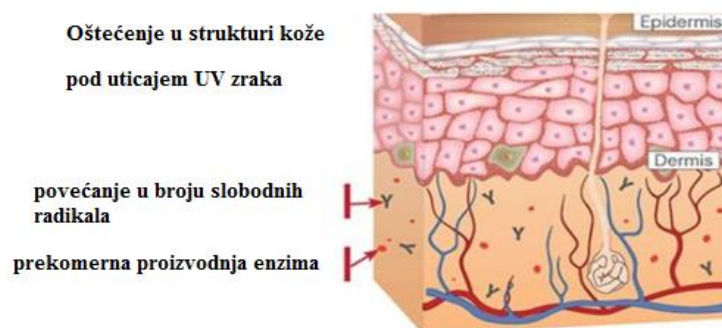
Naime, smatra se da su slobodni radikali uzrok pojave mnogih patoloških stanja organizma. Utvrđeno je da je veliki broj različitih bolesti posledica poremećaja ćelijskih funkcija, odnosno oštećenja same ćelije koje je uzrokovano delovanjem slobodnih radikala kiseonika (Halliwell, 1994). Utvrđeno je da ove polifenolne komponente poseduju značajan spektar bioloških aktivnosti: jako antiinflamatorno, antioksidativno, antimutageno i antikancerogeno, i sposobnost da modifikuju aktivnost enzima (Kong i sar., 2003). Cijanidin-3-*O*-glukozid (C3G), koji se svakodnevno unosi u organizam hranom, verovatno je najpoznatiji i najistraživaniji antocijanin. Nekoliko *in vivo* i *in vitro* istraživanja pokazuju da C3G i njegovi derivati poseduju razna biološka svojstva i mogu povoljno delovati prilikom patoloških stanja ljudskog organizma (Galvano i sar., 2004).

Reakcije slobodnih radikala u koži su jedna od značajnijih tema zato što su deo mehanizma različitih kožnih bolesti i promena, uključujući tumor kože, stvaranja bora na koži i starenje kože (Darr i sar., 1994). Slobodni radikali i reaktivne vrste kiseonika (ROS) imaju važnu ulogu u stvaranju lipidnih radikala (L•) koji su odgovorni za destrukciju ćelijske membrane i konačno ćelije (Ananthaswamy i sar., 1990; Ogura i sar., 1991). Generisani slobodni radikali/ROS kao što su hidroksi radikal (•OH), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) i lipidni radikal (L•) postoje kratko (Herrling i sar., 2002). Mnogobrojni sistemi kože su evoluirali, sa ciljem da zaštite kožu od oksidativnog stresa, i to uključuje prevenciju, presretanje slobodnih radikala i „popravku“ oštećenih delova kože. Primarni odbrambeni mehanizmi treba da spreče oksidativno oštećenje štiteći kožu ultra ljubičastim (UV) filterima protiv štetnog dejstva sunčevih zraka. Sekundarni mehanizmi odbrane se aktiviraju usled prisustva reaktivnih vrsta kiseonika, kao što je proces lipidne peroksidacije. Pored upotrebe hemijskih supstanci i/ili fizičkih blokatora sunčeve svetlosti sa ciljem smanjenja intenziteta UV zračenja koje dospeva do kože, suplementacija kože antioksidansima, i time jačanje njenog potencijala, bitan je pristup u kontrolisanju oštećenja kože reaktivnim vrstama kiseonika koje nastaju usled UV zračenja (Fuchs i sar., 1989; Shindo i sar., 1993).

Dobro je poznata činjenica da oksidativni stres, najčešće izazvan hroničnoj izloženosti UV zračenju, dovodi do prevremenog starenja kože, koje se naziva foto-aging (foto starenje) (Yaar, 2006). Osim toga, kliničke i epidemiološke studije jasno pokazuju da je oksidativno oštećenje takođe, odgovorno za stvaranje raka i kožnih autoimunih bolesti (Kaur i sar., 2007). Samim tim, prevencija navedenog je esencijalna za zdravlje ljudi. Karakterizacija i predstavljanje izvesnih antioksidanasa kao efikasnih dermokozmetičkih sastojaka je dobila značajnu pažnju poslednjih godina, imajući u obzir da topikalna aplikacija antioksidanasa predstavlja uspešnu strategiju u zaštiti kože od oksidativnog stresa (Saija i sar., 2000).

Pokazano je da reaktivni oblici kiseonika mogu dalje da pogoršaju iritantni kontaktni dermatitis, ako je on prethodno prisutan (Krutmann i Yarosh D, 2006). Saznanje da je lipidna peroksidacija posredovana slobodnim radikalima uključena u patogenezu raznih bolesti je opšte prihvaćeno (Young i sar., 2001). Lipidna peroksidacija indukuje oštećenje ćelijske membrane i stvara razne produkte koji su citotoksični, karcinogeni i sposobni da modifikuju biološki esencijalne molekule (Slika 3.) (Blokhina i sar., 2000). Uvek treba imati u vidu da iritanti indukuju oslobađanje ROS kože čak i pri netoksičnim koncentracijama (Mehrota i sar., 2005).

Savremeni dermokozmetički proizvodi, u svom sastavu mogu posedovati kao aktivnu komponentu antioksidans prirodnog porekla (Bleckmen i Kropke, 2006). Unos antioksidanasa svakodnevnom ishranom ili lokalni tretman kože proizvodima koji u svom sastavu sadrže antioksidanse može biti uspešna strategija u prevenciji oštećenja kože. Antocijanini predstavljaju jednu od najvažnijih i najinteresantnijih klasa flavonoida. Oni su široko rasprostranjeni u obojenom voću i imaju važnu ulogu u sprečavanju bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom (Want i sar., 1997).



**Slika 3. Struktura kože i prikaz uticaja slobodnih radikala na njeno oštećenje**  
(<https://www.complexi-light.com/wp-content/uploads/2016/01/photoaging-300x185@2x.jpg>)

## 2.2 Patogeni mikroorganizmi i antimikrobni agensi

Mnogi mikroorganizmi (najčešće bakterije) su česti uzročnici raznih bolesti i kvarenja proizvoda, tako da je njihovo prisustvo jedan od najvećih problema koji se susreće u praksi (Gram i sar., 2002).

Bakterije su jednoćelijski organizmi prokariotske građe koji se mogu videti svetlosnim mikroskopom. Bakterije nastanjuju zemljište i vodu, kao i organizme biljaka, ljudi i životinja (Duraković, 1996). Na osnovu razlika u bojenju po Gram-u, bakterije delimo na Gram (+) i Gram (-). Razlike nakon bojenja posledica su različite građe ćelijskog zida među bakterijama koje pripadaju ovim grupama.

Ćelijski zid Gram (+) bakterija je relativno debeo (15-80 nm) i najvećim delom sastavljen od peptidoglikana sa oko 30 listova glikanskih lanaca međusobno povezanih u polimerni molekul. Uprkos svojoj debljini, peptidoglikan je potpuno permeabilan za mnoge supstance uključujući šećere, aminokiseline i jone. Pored toga, značajne komponente ćelijskog zida Gram (+) bakterija su teihoična i teihuronska kiselina, polisaharidi i proteini. Sa druge strane, ćelijski zid Gram (-) bakterija je tanji (10-15 nm), manje kompaktan, ali znatno kompleksnijeg hemijskog sastava. Sadrži tanak sloj peptidoglikana iznad koga se nalaze tri komponente: lipoprotein, spoljašnja membrana i lipopolisaharid.

Veliki molekuli antibiotika sporo prodiru kroz spoljnu membranu pa odatle, jednim delom, potiče relativno veća otpornost Gram (-) bakterija na antibiotike. Propustljivost spoljne membrane se razlikuje od jedne do druge vrste, pa je tako kod *Pseudomonas aeruginosa*, na primer, spoljna membrana oko 100 puta manje propustljiva od membrane *Escherichia coli*.

### 2.2.1 Osnovne karakteristike bakterijskih sojeva

***Staphylococcus aureus***. Rod *Staphylococcus* pripada grupi Gram (+) aerobnih koka. Vrste ovog roda mogu biti patogene, uslovno patogene i nepatogene. Kod čoveka se najčešće nalaze u nazofarinksu i na koži i prisutne su u oko 30% populacije. Takođe, mogu se naći u vazduhu slaboprovetrenih prostorija, u prašini, i drugim proizvodima. *Staphylococcus aureus* je veoma rasprostranjen u ljudskoj populaciji, a medicinska značajnost se ogleda u njegovoj rezistenciji prema penicilinu i drugim antibioticima. *Staphylococcus aureus*, kao i ostale stafilokoke, spada u vrlo otporne bakterije. Većina uginu na temperaturi od 60 °C tek posle jednog sata, a neki sojevi mogu duže živeti i na temperaturi od 80 °C. Vrlo su otporne i prema sušenju, kao i prema sadržaju NaCl i šećera (Karakašević, 1987).

***Staphylococcus epidermidis***. Bakterija je iz roda stafilokoka. Boji se pozitivno po Gramu, fakultativno je anaerobna. Živi uglavnom na koži i sluzokoži čoveka, gde pripada normalnoj bakterijskoj flori. Iako ova bakterija pripada normalnoj flori, kod ljudi sa oslabljenim imunitetom može izazvati infekcije, čest je uzročnik bolničkih infekcija, što je svrstava u grupu oportunističkih. Često se zadržava i izaziva infekcije na mestu u organizmu gde se nalazi neko strano telo, npr. kateter, endoproteze, metalni implantati, veštački zalisci srca i tome slično. Znojne žlezde luče lizozim (muramidazu), enzim koju vrši lizu *Staphylococcus epidermidis*-a i drugih Gram (+) bakterija. Lojne žlezde sekretuju kompleks lipida koji može delimično biti razgrađen od strane enzima koji luči *Propionibacterium acnes*. Ova bakterija može da promeni sekretovane lipide tako da oni postanu nezasićene masne kiseline, kao što je oleinska kiselina, koje imaju jaku antimikrobnu aktivnost protiv Gram (-) bakterija i nekih gljivica. Neke od ovih masnih kiselina su isparljive i povezuju se sa jakim mirisom. Imajući ovo u vidu, mnogi dezodoransi sadrže antibakterijsku supstancu koja deluje selektivno protiv Gram (+) bakterija, kako bi smanjili nastajanje isparljivih nezasićenih masnih kiselina i miris tela. Zbog toga, dezodoransi mogu da preokrenu floru mikroorganizama tako da dominantne postanu Gram (-) bakterije, i može nastati infekcija izazvana njima (Lansing i sar., 1999).

***Streptococcus pyogenes***. *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolitički streptokok serološke grupe A) pripada grupi Gram (+) aerobnih koka. Pojedinačne bakterije su okruglog ili ovalnog oblika (prečnika 0,8 do 1,0  $\mu\text{m}$ ), međusobno povezane u lance različite dužine. Streptokoke su nepokretne, u svim mladim kulturama okružene su vidljivom kapsulom, ne stvaraju spore i poseduju fimbrije (pili). Grupa A streptokoka u toku rasta proizvodi oko 20 različitih egzoprodukata. Biološke supstance koje proizvodi biološki streptokok su podeljene na toksine i enzime. Većina vrši depolimerizaciju supstrata i omogućava lakše širenje streptokoka u okolna tkiva. Toksini oštećuju organe i tkiva za koje se vežu izazivajući direktan toksični efekat. Zahvaljujući brojnim egzoproduktima piogeni streptokok je tipičan predstavnik bakterija sa toksičnim i agresivnim osobinama. *Streptococcus pyogenes* izaziva oboljenja koja se mogu podeliti u tri grupe: invazivna (zapaljensko-gnojne prirode); toksemična (lokalne infekcije sa znacima opšte intoksikacije); i post streptokokne sekvele (komplikacije prethodne dve infekcije). U zavisnosti od endogenih i egzogenih faktora sekvele se manifestuju u dva oblika: reumatska groznica i glomerulonefritis (Berger-Jekić, 1987).



***Enterococcus faecalis***. *Enterococcus faecalis* je Gram (+) bakterija, u obliku diplokoka ili kratkih lanaca, koja je po ranijoj klasifikaciji pripadala serološkoj grupi D streptokoka. Vrlo je otporan na alkalnu sredinu (pH 9,6), kao i na delovanje žučnih soli, deterdženata, teških metala, etanola i isušivanja. Preživljava temperaturu od 60 °C u trajanju od 30 minuta (Stuart i sar., 2006). Nastanjuje gastrointestinalni trakt ljudi i drugih sisara (Ryan i Ray, 2004). Poput drugih vrsta iz roda *Enterococcus*, i *E. faecalis* može da izazove po zdravlje opasne infekcije kod ljudi kao što su: endokarditis, bakterijemija, infekcije urinarnog trakta i meningitis, posebno u bolničkim uslovima gde je izražena rezistencija ove bakterije (Murray, 1990; Hidron i sar. 2008). U Sjedinjenim Američkim Državama se *E. faecalis* povezuje sa bolničkim infekcijama uključujući infekcije urinarnog trakta, sepsu i infekcije operativnih rana. Postoji nekoliko faktora virulencije kod *E. faecalis* koji doprinose širenju infekcije. Plazmid hemolizin, poznat i kao citolizin, koji je važan za patogenezu infekcija kod životinja, u kombinaciji sa visokom rezistentnošću na gentamicin povezan je sa petostruko većim rizikom od smrti kod pacijenata koji imaju bakterijemiju (Ike i sar., 1984; Huycke i sar., 1991; Chow i sar., 1993).

***Propionibacterium acnes***. Najdominantnija bakterija na žlezdama kože je ova Gram (+), anaerobna bakterija. Ona je uglavnom bezopasna; međutim povezana je sa stanjem kože poznatim kao *acne vulgaris*. One se uglavnom javljaju u adolescentnom dobu kada je endokrini sistem veoma aktivan. Velike količine sebuma se akumuliraju na žlezdama kože i obezbeđuju idealno mikrokruženje za ovu bakteriju. *Propionibacterium acnes* produkuje lipazu koja hidrolizuje trigliceride sebuma do slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline su posebno iritirajuće zato što mogu da dospeju do dermisa i pokrenu inflamatorni odgovor. Zbog osetljivosti *P. acnes* na tetracikline, ovaj antibiotik se koristi u tretmanu akni (Lansing M. P. i sar., 1999).

***Escherichia coli***. Pripada porodici *Enterobacteriaceae*. To su Gram (-) asporogeni bacilli dužine od 1 do 3 µm, a debljine 4 do 7 µm. Pokretni su, poseduju bičeve, a veliki procenat poseduje i fimbrije (pili), a neki sojevi poseduju i kapsulu. Ne preživljava na temperaturi od 60 °C u trajanju od 15 minuta, a niske temperature dobro podnosi. U kontaminiranim proizvodima se brzo razmnožava. Osetljiva je na hlor i preparate koji imaju hlor u svom sastavu. Toksičnost sojeva *E. coli* se bazira na njenom lučenju raznih enterotoksina, adhezina ili faktora kolonizacije, hemolizina i endotoksina. Patogenost za čoveka se ispoljava u sposobnosti ove bakterije da izazove dve vrste oboljenja (Berger-Jekić,

1997). U prvu grupu spadaju *E. coli* izazivači piogenih infekcija (cistitis, pijelitis, pijelonefritis, infekcije žučne kese, meningitis, sepsa). U drugu grupu spadaju *E. coli* izazivači dijarejnih oboljenja (Karaklašević, 1987).

***Pseudomonas aeruginosa.*** *Pseudomonas aeruginosa* zajedno sa *P. putida* i *P. fluorescens* pripada tzv. “fluorescentnoj grupi” bakterija zato što sve ove bakterije proizvode fluorescentni pigment. *Pseudomonas aeruginosa* je mali, obično prav, ređe nešto savijen Gram (-) štapić, dužine od 1,5 do 3 µm i širine od 0,5 do 0,8 µm. Ima jednu flagelu (ponekad i 3) na jednom od polova, pomoću koje se brzo kreće. Takođe poseduje i fimbrije. Ne proizvode spore i nema kapsulu. Temperatura od 60 °C je ubije u roku od pola sata. Prema dezinficijensima je otpornija od većine bakterija. *Pseudomonas aeruginosa* izaziva čitav niz raznih infektivnih oboljenja kod ljudi, poznatih kao “pseudomonijaze”. Česte su infekcije kod novorođenčadi u kombinaciji sa drugim Gram (-) asporogenim anaerobnim bakterijama. Takođe, česte su infekcije ovom bakterijom kod imunodeficientnih osoba. Pseudomonijaze su sve češće usled povećane rezistentnosti bakterije na antibiotike. Česti su multirezistentni sojevi koji su otporni i na 5-6 antibiotika. U porastu su intrahospitalne infekcije, pa čak i epidemije izazvane ovom bakterijom. *Pseudomonas aeruginosa* je izazivač teških infekcija opekotina, enteritisa, meningitisa, endokarditisa, kao i infekcija respiratornog i urogenitalnog trakta, koje nastaju i u sadejstvu sa drugim piogenim bakterijama. Iz svih tih žarišta, *P. aeruginosa* može prodrati u krvi i izazvati tešku septikemiju (Karaklašević, 1987).

***Acinetobacter sp.*** Većina autora je ranije smatrala da rod *Acinetobacter* ima samo jednu vrstu – *A. calcoaceticus*. Danas se u ovaj rod svrstava tzv. ACB kompleks (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus* i *Acinetobacter* genomski vrsta 13TU) (O'Shea, 2012; Gerner-Smidt, 1992). Morfološki su to Gram (-) štapići dužine 1,5 do 2,5 µm i širine od 0,9 do 1,6 µm, koji u statičnoj fazi dobijaju sferični oblik. Ne stvaraju spore. Javljaju se pojedinačno i u parovima. Neki sojevi poseduju kapsulu koja stvara mukoidnu prevlaku. Otporne su na spoljašnje uticaje, kao i na većinu dezinficijensa. Bakterije ovog roda su ubikvitarne. Relativno često se nalaze na koži osoblja u bolnicama. Najčešće napadaju hospitalizovane bolesnike, bolesnike u intenzivnoj nezi, kao i sve osobe sa oslabljenim imunitetom. Često napada i bolesnike koji se leče antibioticima. Učestali su slučajevi pneumonije, meningitisa, septikemije, infekcija rana i urogenitalnog trakta koje su izazvane ovom bakterijom (Karaklašević, 1987).

***Proteus mirabilis***. *Proteus mirabilis* pripada rodu *Proteus* u koji su pored njega svrstani još *P. vulgaris* i *P. myxofaciens*. Ovo su Gram (-) kokobacili, a ponekad poprimaju nitaste oblike. Dužina im varira od 1 do 3 µm, a širina od 0,4 do 0,6 µm. Javljaju se pojedinačno, u parovima i u kratkim lancima. Brzo se kreću pomoću peritrihijalno raspoređenih bičeva. Nemaju kapsule ni spore. Ponekad poseduju fimbrije. Vrste ovog roda su relativno otporne prema uticajima spoljne sredine. Letalna temperatura je 55 °C u roku od jednog časa. Osetljive su na najčešće korišćene dezinficijense. Međutim, sojevi koji se nalaze u bolničkim ustanovama otporni su na znatne količine dezinficijensa. *Proteus mirabilis* i *P. vulgaris* izazivaju razne septičke infekcije, često udružene sa drugim bakterijama. Često izazivaju infekcije rana, naročito kod opekotina. Mogu izazvati sepsu i meningitis. Često su uzročnici alimentarnih toksoinfekcija, kao i infekcija urogenitalnog trakta koje nastaju posle kateterizacije, cistoskopije i drugih intervencija na urogenitalnom traktu (u bolničkim uslovima) (Karkašević, 1987).

***Klebsiella sp.*** Rodu *Klebsiella* pripadaju sledeće 4 vrste bakterija: *K. pneumoniae*, *K. oxytoxa*, *K. terrigena* i *K. planticola*. To su Gram (-), kapsulirane bakterije koje se karakterišu sluzavim rastom. Po zdravlje čoveka najopasnija je *K. pneumoniae* koja poseduje sledeće podvrste: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Ostale vrste retko ugrožavaju zdravlje čoveka. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* je Gram (-) zaobljeni kokobacil, u preseku dug 1 µm, a širok 0,5 do 0,8 µm. Javlja se pojedinačno i u parovima, nepokretan je i ne stvara spore. Propada na temperaturi od 55 °C za pola sata, ali je prilično otporna na standardne dezinficijense (Weisglass, 1989). Ova bakterija može svojim endotoksinom i nekrotičnom supstancom da izazove teška oštećenja skoro svih delova čovečijeg organizma. Ta oboljenja nastaju naročito usled oslabljenog imuniteta organizma, pogotovo kod hroničnih bolesti. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* najčešće izaziva oboljenja respiratornih puteva kao što su faringitisi, nazofaringitisi, rinitisi, lobarna pneumonija i bronhopneumonija. Često izaziva enteritise i enterokolitise kod dece, vrlo su česte infekcije mokraćnih puteva, a ponekad se javljaju meningitisi i septikemije ovom bakterijom. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* je uzročnik rinoskleroma, hroničnog oboljenja sluznice i kože, naročito nosa, pri čemu nastaju tumorozne mase. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* je karakteristična po izazivanju hroničnog, atrofičnog oboljenja ozaena ili *Rhinitis strophicans*.

### 2.2.2 Antimikrobna aktivnost ekstrakata *M. alba* i *M. nigra*

Uprkos brzom razvoju antibiotika, humane infekcije bakterijskog, gljivičnog ili virusnog porekla, i dalje predstavljaju značajan medicinski problem. Rezistencija velikog broja mikroorganizama nastala je i neracionalnom primenom klasičnih, odnosno sintetskih antibiotika (Cowan, 1999)

Intrahospitalne (nozokomijalne) infekcije javljaju se kod oko 10% bolesnika i najčešće su lokalizovane na koži, u urinarnom i respiratornom traktu. Većina izolovanih sojeva bakterija, koji izazivaju navedene infekcije, pokazuje izrazitu rezistenciju na veći broj antibiotika. Piogene infekcije kože i potkožnog tkiva (impetigo, folikulitis, furunkuli, karbunkuli i celulitis) pretežno izazivaju stafilokoke i streptokoke, a osnovna karakteristika navedenih infekcija je pojava supuracije, nekroza tkiva i formiranje apscesa. Poslednjih godina, kao uzročnici bolničkih infekcija sve češće se izoluju bakterije koje predstavljaju normalnu mikrofloru kože, vrste roda *Staphylococcus* i *Acinetobacter sp.* (Brooks i sar., 2004). Nekomplikovane kožne infekcije (koje se često nazivaju i infekcije kože i mekog tkiva), su druga najčešće dijagnostifikovana bolest kože (Elston, 2008). Sa druge strane, kod primene uobičajeno korišćenih topikalnih antibiotika, pored pojave rezistencije, veoma su česti slučajevi alergijskog kontaktnog dermatitisa (Gisby i Bryant, 2000). Činjenica je da je sve veći broj istraživanja u svetu usmeren ka pronalaženju novih prirodnih sirovina sa antimikrobnim delovanjem. Lekovite biljke su naročito potentan izvor biološki aktivnih jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem. Ovi sastojci su relativno lako dostupni, ispoljavaju minimum neželjenih efekata i uglavnom nisu toksični (Cowan, 1999).

Antimikrobna aktivnost jedinjenja izolovanih iz ploda i lista *M. alba* i (*M. nigra*) prikazana je u Tabeli 4.

**Tabela 4. Antimikrobna aktivnost jedinjenja izolovanih iz lista i ploda *M. alba* i *M. nigra***  
(MIC=minimalna inhibitorna koncentracija u  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )

Biljna vrsta	Jedinjenje	Deo biljke	Bakterijski soj	MIC $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	Referenca
<i>Morus alba</i> L.	Halkomoracin	List	<i>Micrococcus luteus</i>	1,56	Sohn i sar., 2004
			<i>Bacillus subtilis</i>	3,13	
			<i>Escherichia coli</i>	>100	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	

**Tabela 4. –nastavak–**

<i>Morus nigra</i> L.	Ukupni ekstrakt	Voćni sok	<i>Bacillus spizizenii</i>	19,68	Khalid, 2011
			<i>Bacillus subtilis</i>	18,46	
			<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	15,57	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	16,03	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	17,37	
			<i>Escherichia coli</i>	9,98	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,87	
			<i>Salmonella typhimurium</i>	11,73	

Oksiresveratrol, arilbenzofuran moracin M2, ciklomorusin, morusin, kuanon C5, kuanon C6, betulinska kiselina,  $\alpha$ -amirini acetat i  $\beta$  sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukozid su izolovani iz stabljike *M. nigra* iz Bocvane (Mazimba i sar., 2011). Oksiresveratrol i arilbenzofuran moracin M2 pokazali su baktericidnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* (minimalna baktericidna koncentracija (MBC) = 125 i 62,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , respektivno); arilbenzofuran moracin M2 je takođe pokazao baktericidno dejstvo protiv *Streptococcus faecalis* (MBC = 500 i 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , respektivno) (Mazimba i sar., 2011). Antibakterijsko delovanje je testirano protiv različitih mikroorganizama, kao što su: *Staphylococcus mutant* ATCC 25175, poznat kao oralni patogen, *Streptococcus sanguis* ATCC 35105, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351, *Staphylococcus aureus* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 10231, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 4646 i *Porphyromonas gingivalis* W50. Antibakterijska aktivnost kuanona G je testirana u smislu minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u poređenju sa nekim komercijalno dostupnim sredstvima koja se koriste za prevenciju karijesa. MIC kuanona G protiv bakterija roda *Streptococcus* bila je 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  što je manje u odnosu na 32  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  sanguinarina, 125  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  karvakrola i 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  timola i eukaliptola koji su komercijalni agensi sa antibakterijskom aktivnošću. Ovo ukazuje da kuanon G ima mnogo jaču antibakterijsku aktivnost u odnosu na komercijalne agense. Antibakterijska aktivnost kuanona se može uporediti sa antibioticima kao što su vankomicin i hlorheksidin koji, međutim, poseduju lošu stranu tako što dovode do promene boje zuba, povraćanja, dijareje i pada imuniteta (Park i sar., 2003).

### 2.2.3 Test antibiotici

U ovom istraživanju kao referentni antibiotici korišćeni su: gentamicin, doksiciklin, ciprofloksacin i metronidazol.

**Gentamicin.** Izolovan je iz jedne vrste aktinomiceta (*Mikromonospora purpurea*). Pripada grupi aminoglikozidnih antibiotika, i čini osnovu terapije infekcija izazvanih Gram (-) bakterijama. Svoje antimikrobno dejstvo ostvaruje ireverzibilnom inhibicijom sinteze proteina. Početni događaj u delovanju je prodiranje kroz zid ili membranu bakterijske ćelije. To se dešava delimično aktivnim transportom, a delimično pasivnom difuzijom. Pošto aktivni proces zavisi od prisustva kiseonika, aminoglikozidi su relativno neefikasni protiv striktnih anaeroba. Po ulasku u ćeliju, aminoglikozidi se vezuju za receptor na 30S podjedinici bakterijskih ribozoma. Aminoglikozidi inhibišu sintezu proteina u ribozomima bar na tri načina: 1. ometaju "početni kompleks" formiranja peptida, 2. prouzrokuju pogrešno očitavanje šifre na iRNK, što pokazuje uvođenje pogrešnih aminokiselina u peptide, i 3. uzrokuju raspadanje polizoma u nefunkcionalne monozome. On deluje kako protiv Gram (+) tako i protiv Gram (-) mikroorganizama. Gentamicin je neaktivan posle oralne primene i stoga se aplikuje parenteralno. Posle intramuskularne injekcije maksimalni nivo u krvi se postiže u toku 60 do 90 minuta i proporcionalan je primenjenoj dozi. Aktivna koncentracija se održava šest do osam časova. Najveći deo gentamicina se izlučuje u mokraću glomerularnom filtracijom, pri čemu se u mokraći postiže vrlo visoka koncentracija aktivnog antibiotika. Primenjuje se kada su izazivači infekcija: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Klebsiella* i *Acinetobacter*. Toksično dejstvo gentamicina ispoljava se oštećenjem vestibularnog aparata (kod 1% pacijenata). Velike doze gentamicina mogu oštetiti bubrege i dovesti do proteinurije i azotemije. Primena gentamicina je kontraindikovana u trudnoći (Varagić, 2008).

**Doksiciklin.** Doksiciklin je antibiotik iz grupe tetraciklina. Ima vrlo širok spektar antimikrobnog dejstva. Spektar obuhvata ne samo Gram (+) i Gram (-) bakterije već i rikecije, mikoplazme, hlamidije, spirohete, leptospire i amebe. U terapijskim koncentracijama doksiciklin deluje bakteriostatski. On se vezuje za 30S ribozomsku podjedinicu i tako blokira dejstvo transportne RNK. Na ovaj način ometa se sinteza peptida i proteina u bakterijskoj ćeliji. Selektivnost toksičnog delovanja doksiciklina na bakterije potiče od toga što one poseduju transportni mehanizam koji omogućuje nakupljanje doksiciklina u bakterijskoj ćeliji. Ćelije čoveka nemaju takav transportni mehanizam. Posle oralne primene doksiciklin se resorbuje u dovoljnoj količini, ali ne u potpunosti. Znatan deo se zadržava u crevu i

eliminira stolicom. Razlog nepotpune resorpcije je slaba rastvorljivost tetraciklina u alkalnoj sredini i stvaranje nerastvorljivih helata sa dvovalentnim katjonima. Mleko, koje sadrži dosta kalcijuma, antacidi i preparati gvožđa otežavaju resorpciju tetraciklina i smanjuju njihovu aktivnost. Tetraciklini su lekovi izbora u terapiji infekcija izazvanih od strane *Mycoplasma pneumoniae*, hlamidija, rikecija i nekih spiroheta. Može se primenjivati u terapiji raznih infekcija izazvanih Gram (+) i Gram (-) bakterijama, uključujući i one čiji je izazivač *Vibrio*. Primenom tetraciklina modifikuje se normalna flora digestivnog trakta. Oni suprimiraju normalno prisutne i osetljive koliformne bakterije, ali time omogućuju prekomerno rastenje i razmnožavanje *Pseudomonas-a*, *Proteus-a*, stafilokoka, rezistentnih koliformnih bacila, klostridija i *Candida-e albicans*. Tetraciklini se selektivno nakupljaju u kostima i zubima dece i mogu prouzrokovati žutu obojenost zuba, displaziju gleđi, deformitete i zastoj u rastenju. Stoga, primena je kontraindikovana kod dece mlađe od osam godina i u trudnoći. Za vreme upotrebe antibiotika iz ove grupe, treba izbegavati intenzivno sunčanje. Na izloženim delovima kože ponekad nastaju eritemi i edemi koji se sporo povlače i katkad ostavljaju pigmentovana mesta (fotosenzibilizacija) (Varagić, 2008).

**Ciprofloksacin.** Ciprofloksacin pripada grupi fluorohinolona. Inhibicija DNK-giraze je osnovni mehanizam antibakterijskog delovanja fluorohinolona. Eukariotske ćelije ne sadrže DNK-girazu, ali sadrže jedan sličan tip enzima – DNK-topo-izomerazu. To je dovoljno da fluorohinoloni slabije deluju na eukariotske nego na bakterijske ćelije. Deluju protiv većeg broja Gram (+) i Gram (-) bakterija i koriste se u terapiji sistemskih infekcija. Za inhibiciju su dovoljne koncentracije od nekoliko  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Anaerobi su uglavnom rezistentni prema fluorohinolonima. Posle oralne primene dobro se resorbuju, a zatim i dobro raspodeljuju po telesnim tečnostima i tkivima. Oralnu resorpciju fluorohinolona ometaju dvovalentni katjoni, uključujući one koji se nalaze u antacidima. Koncentracija fluorohinolona u prostati, bubrezima, neutrofilima i makrofagima su veće od onih u serumu. Izlučuju se preko bubrega. Najčešći neželjeni efekti su nauzeja, povraćanje i dijareja. Mogu oštetiti zglobnu hrskavicu i prouzrokovati arteropatiju koja je reverzibilna. Fluorohinoloni se izlučuju mlekom, pa se ne primenjuju kod dojilja. Njihovu primenu treba izbegavati za vreme graviditeta. Poseban značaj se pridaje njihovoj sposobnosti da produže QT interval u EKG-u (Varagić, 2008).

**Metronidazol.** Metronidazol je sintetički lek iz klase nitroimidazola, efektivan protiv anaerobnih bakterija i protozoa. Deluje kao antibiotik, amebicid i antiprotozoik. Nejonizovani

metronidazol se putem difuzije selektivno apsorbuje od strane anaerobnih bakterija i osetljivih protozoa. U anaerobnim ćelijama se neenzimski redukuje, reakcijom sa redukovanim feredoksinom. Produkti ove redukcije (hidroksilaminski ili amino derivati sa imidazolnim prstenom) su toksični za anaerobne ćelije i omogućuju selektivnu akumulaciju u anaerobima, gde narušavaju helikoidnu strukturu njihove DNK, inhibiraju sintezu bakterijskih nukleinskih kiselina i izazivaju njihovu smrt. Ova reakcija se javlja samo kada je metronidazol redukovan, što se dešava samo u anaerobnim ćelijama, tako da lek ima relativno slab uticaj na ljudske ćelije i aerobne bakterije. Nije aktivan ni protiv virusa i gljivica. Nakon oralne administracije, metronidazol se brzo i gotovo potpuno (biodostupnost je skoro 100%) apsorbuje gastrointestinalim traktom. Maksimalna serumska koncentracija se dostiže nakon 1-2 h, a nakon 24 h je detektovan samo u tragovima. Metronidazol se metaboliše u jetri, a eliminiše se putem bubrega. Deluje na: bakterije – anaerobne Gram (-) bacile (većinu *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Veillonella spp.*); anaerobne Gram (+) bacile (uključujući *Clostridium spp.*, osetljive sojeve *Eubacterium spp.*); anaerobne Gram (+) koke (*Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*); protozoe (*Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*); takođe, metronidazol deluje na fakultativnog anaeroba *Gardnerella vaginalis*, na neke sojeve *Campylobacter spp.*, kao i na *Helicobacter pylori*. Najčešći štetni efekti kod sistemske primene su mučnina, dijareja i metalni ukus u ustima (Miljković i sar., 2014).

### **2.3 Fitopreparati za lokalnu primenu na koži**

Savremeni proizvodi za negu kože, obzirom na zahteve u pogledu kvaliteta i efikasnosti, ne predstavljaju jednostavne formulacije u kojima su kozmetički aktivne supstance (KAS) inkorporirane u određenu podlogu. Uredba EU 1223/2009 (Regulation EC 1223/2009) o kozmetičkim proizvodima definiše zahteve koji se moraju ispuniti. S obzirom da se dermokozmetički, isto kao i kozmetički proizvodi primenjuju na koži različitih delova tela, neophodno je da su otporni na uticaj temperature i stabilni tokom dužeg perioda, odnosno moraju imati obeležen rok upotrebe ili period nakon otvaranja ako su proizvodi sa rokom upotrebe od preko 30 meseci. Stoga se, prilikom formulisanja i razvoja novog dermokozmetičkog proizvoda, mora ispitati stabilnost i fizičko-hemijske osobine bazne/osnovne formulacije (Saraf i sar., 2012). Potvrda stabilnosti, otvara mogućnost daljeg testiranja formulacije koji obuhvataju procenu njene efikasnosti i daju informacije bitne za dalji razvoj formulacije i proizvodnju gotovog dermokozmetičkog proizvoda. Testovi efikasnosti obuhvataju sledeće eksperimentalne pristupe i njihove kombinacije: 1) senzorni



pristup (vid, dodir, miris) od strane potrošača ili eksperata; 2) instrumentalni pristup koji favorizuje merenje specifičnih parametara korišćenjem *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* pristupa koji ne reprodukuju normalne uslove tokom korišćenja proizvoda, ali omogućavaju objektivnu analizu pod kontrolisanim uslovima (COLIPA Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products, 2008).

Radi očuvanja stabilnosti KAS i/ili povećanja njihove sposobnosti da penetriraju u kožu, koriste se sofisticirani nosači aktivnih supstanci. Na taj način postiže se dvostruki efekat: stabilizacija aktivne komponente i mogućnost njenog kontrolisanog oslobađanja i/ili usmerenog transporta kroz kožu (Vasiljević i sar., 2009). Kao konvencionalni nosači, najčešće se koriste hidrogeli i emulzioni sistemi (Epstein, 2009; Epstein, 2014).

### **2.3.1 Hidrogeli kao nosači u dermokozmetičkim proizvodima**

Hidrogeli se definišu kao struktuirani koloidni sistemi koji sadrže najmanje dve komponente (čvrstu i tečnu) i poseduju osobine i čvrstih i tečnih tela. Čvrsta komponenta gradi koherentan trodimenzionalan skelet (mrežu), u koju se uklapa tečna faza procesima liosorpcije, mehaničkog uklapanja ili kapilarnog uklapanja (Vuleta, 1991).

Hidrogeli se često upotrebljavaju kao podloge – nosači bioaktivnih supstanci namenjenih za lokalnu aplikaciju na kožu. Za izradu gela potrebni su sredstvo za geliranje, tečna komponenta i pomoćni sastojci i to prvenstveno konzervansi i humektansi (Vasiljević i sar., 2007).

Sredstva za geliranje mogu biti supstance prirodnog, polusintetskog i sintetskog porekla. U farmaciji i kozmetologiji se najviše koriste polusintetska i sintetska gelirajuća sredstva. Ultrez 10 Polimer (Carbopol® Ultrez) je supstanca oficinalna po Ph. Yug V, slično ostalim karbomerima, stabilizuje preparat dajući mu određenu konzistenciju gela (Jugoslovenska farmakopeja 2000). To je lako dispergujući polimer akrilne kiseline (Vuleta, 2004). Za dispergovanje karbopola Ultrez 10 (Centrohem, Srbija) temperatura ne treba da prelazi 60 °C, jer se iznad ove temperature postiže suprotan efekat. Naime, tada dolazi do narušavanja strukture gelske mreže usled smanjenja termodinamičke stabilnosti (Vasiljević i sar., 2007).

Pre neutralizacije, pH vrednost karbomera nalazi se u opsegu 2,5-3,5 i pKa iznosi  $6\pm 0,5$ . Karboksilne grupe karbomera delimično disosuju u vodi i rezultat toga je fleksibilna struktura lanca polimera (Lubrizol Advanced Materials, 2013). Lanac karbomera u vodenom rastvoru je u vidu spirale. Nakon neutralizacije karboksilnih grupa bazom, lanac karbomera se odmotava (Milanović, 2016). Kao sredstva za neutralizaciju mogu da se koriste baze

rastvorljive u vodi kao što su trietanolamin ili natrijum-hidroksid. Važno je omogućiti proces hidratacije gelirajućeg sredstva u celokupnoj količini tečne faze (Vasiljević i sar., 2007).

Tečna komponenta hidrogela je voda. Voda je delimično vezana za makromolekule gelirajućeg sredstva, a delimično je slobodna. Ona ispunjava šupljine unutar prostorne gelske mreže i predstavlja slobodni rastvarač (Vasiljević i sar., 2007). Jedan od nedostataka hidrogela se ogleda u tome što ako se primenjuju duže vremena, mogu da dovedu do isušivanja kože (Vuleta i sar., 2012).

Dobre osobine hidrogela su da se lako primenjuju na intaktnu i ozleđenu kožu i sluzokožu, pogotovu su zgodni za vlasište s obzirom da se lako spiraju sa kože. Prilikom njihove primene nije uočena iritacija kože (Vuleta, 2004).

Hidrogeli se smatraju ekonomičnim sistemima iz tog razloga što u njihov sastav ulazi do 99% tečne faze (vode). Hidrosolubilna lekovita supstanca se može rastvoriti u delu ili celokupnoj količini vode. (Vasiljević i sar., 2007). Hidrogeli su laki za proizvodnju, generalno su priznati kao bezbedni i široko su prihvaćene podloge u koje se inkorporiraju ekstrakti. Važno je da su ekstrakti rastvorni, stabilni i kompatibilni sa podlogom. Tehnologija izrade je najčešće takva da se u svež izrađen hidrogel inkorporiraju ekstrakti. Tako, za tretman celulita se izrađuje hidrogel sa ekstraktom divljeg kestena, u anti-age preparatima se koristi ekstrakt aloja vere, za piling kože se dodaje ekstrakt lišajeva (Lindee, 2000).

Za formulacije nosača neophodno je poznavanje biohemijskih procesa u koži i karakterizacija aktivnih komponenti (Glišić i sar., 2013).

Dobro prijanjanje na kožu, mogućnost zadržavanja kozmetički aktivne supstance i neometano disanje kože su prednosti koje imaju hidrogeli kao nosači. Kako se sastoje od vode, sredstva za geliranje, sredstva za neutralizaciju i konzervansa, mogućnosti za interakcije sa kozmetički aktivnom supstancom su mnogo manje u odnosu na nosače koji u svom sastavu sadrže više sastojaka (Vuleta i sar., 2012).

### **2.3.2 Emulzije kao nosači u dermokozmetičkim proizvodima**

Emulzije spadaju u klasu disperznih sistema sačinjenih od najmanje dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju (Epstein, 2014). Kapi jedne tečnosti (disperzna faza) su dispergovane u tečnom medijumu (kontinualna faza) (Pal, 2011; Tadros, 2013). Da bi se dispergovale dve tečnosti koje se ne mešaju potrebna je i treća komponenta, emulgator (Pal, 2011; Tadros, 2013). Emulgator ima dve osnovne funkcije: 1) da smanji međupovršinski napon između dve faze i 2) da stabilizuje dispergovanu fazu sprečavajući koalescenciju (Vuleta sar., 2012).

Među kozmetičkim/dermokokozmetičkim emulzijama najzastupljenije su emulzije tipa U/V ili V/U. One se razlikuju po tehnološkom postupku izrade kao i po nameni (Epstein, 2014). U V/U emulzijama voda je dispergovana faza, a masna faza je disperzno sredstvo; u U/V emulzijama masna faza je dispergovana, a vodena faza je disperzno sredstvo. Kozmetičke U/V emulzije mogu biti tečne ili polučvrste konzistencije. Ovaj tip emulzija pogodan je za negu masne i normalne kože tokom dana. Često se koriste i kao nosači za lekovite supstance (antibiotike, antimikotike, kortikosteroide...) u dermofarmaceuticima. Mogu se formulisati uz različite emulgatore: konvencionalne anjonske ili nejonske, mešane emulgatore, polimerne emulgatore, mešane emulgatore koji grade tečno-kristalne gelske faze, itd.

Polazne sirovine za izradu dermokokozmetičkih emulzija treba da budu farmakopejskog kvaliteta, s obzirom na činjenicu da ove proizvode široko koriste različite kategorije potrošača (mladi, stari, zdravi, bolesni) kao i zbog moguće dugotrajne upotrebe (Vasiljević i sar., 2009).

Dermokokozmetičke emulzije čine masna i vodena faza. Emulgatori, kozmetički aktivne supstance, (konzervansi, antioksidansi, helatni agensi, mirisi, boje, pigmenti) su sastojci koji ulaze u njihov sastav (Vasiljević i sar., 2009).

Emulzije tipa U/V nalaze mnogo veću primenu u odnosu na emulzije V/U tipa (Lodén, 2005). Emulzioni U/V sistemi uglavnom imaju izrazit hidratišući efekat i na koži mogu i ne moraju ostavljati manje ili više mastan ili lepljiv film. Emulzije tipa U/V, za razliku od tipa V/U, uglavnom su jednostavnije za izradu/proizvodnju (Epstein, 2009).

Voda u spoljašnjoj fazi emulzije može da služi kao rastvarač za KAS koje su rastvorne u vodi (Epstein, 2014) kao što je ekstrakt duda (Li i sar., 2004).

Dobre formulacije za primenu na kožu bi trebalo da predstavljaju kombinaciju tri koncepta (Lodén i sar., 2013; Harding i sar., 2013; Moncrieff i sar., 2013):

- primena okluzivnih, masnih sastojaka koji smanjuju transepidermalni gubitak vode (TEWL – transepidermal water loss) i time indirektno hidratišu SC (vazelin, tečni parafin, beli pčelinj vosak, propilenglikol, lanolin);

- primena higroskopnih, humektantnih kozmetičkih aktivnih sastojaka koji direktno vlaže kožu (propilenglikol);

- korišćenje emolijenasa koji kožu omekšavaju, poboljšavaju njenu strukturu i stvaraju jednu vrstu filma na njenoj površini. Veliki broj emolijenasa deluju i kao emolijensi i kao humektansi (Moncrieff, 2013).

Vazelin se smatra jednom od najboljih supstanci za hidrataciju i definiše se kao zlatni standard sa kojim se porede drugi okluzivi. Masni i lepljiv osećaj koji nastaja i ostaje tokom nanošenja, predstavljaju smetnju većoj upotrebi vazelina (Iwai i sar., 2012; Schweiger i sar., 2013).

Tečni parafin i beli pčelinj vosak se često koriste kao sastojci za postizanje okluzivnog efekta i za regulisnje konzistencije dermokozmetičkih formulacija (Baumann, 2011).

Propilenglikol se dodaje formulacijama sa ciljem da zadrži vlagu (humektans) u koncentracijama 10-20%. Takođe, može ispoljiti efekat pojačane penetracije kroz kožu, a koristi se i kao korastvarač (Vecchio, 2008).

Polisorbat 60 se koristi kao solubilizator i sredstvo za stabilizaciju u dermokozmetičkim proizvodima tipa emulzija (Coors i sar., 2005).

Cetostearil alkohol se uglavnom koristi kao jedna od komponenata emulgatora. Koristi se kao emulgator za nastajanje emulzija tipa U/V. Mešani emulgatori (recimo kombinacija Polisorbata 60 i cetostearil alkohola) omogućavaju izradu stabilnih U/V emulzija sa visokim sadržajem vode (Đekić i sar., 2013). Stabilizacija emulzionih sistema pomoću mešanih emulgatora se objašnjava teorijom gelske mreže. Veća efikasnost u stabilizaciji emulzija primenom mešanih emulgatora postiže se usled visoke gustine pakovanja pojedinačnih komponenti ovog emulgatora, koji na međupovršini stvaraju prilično gustu gel strukturu i stabilnu emulziju (Lukić i sar., 2016).

Kao što je već rečeno, u trendu su dermokozmetičke emulzije koje u sebi sadrže antioksidans kao aktivnu supstancu (Bleckmen i Kropke, 2006). Zbog toga postoji povećano interesovanje za antioksidanse prirodnog porekla, pre svega iz biljnih sirovina. Mnogi antioksidansi su aktivne komponente koje su izolovane iz biljnog materijala (ekstrakti) i koriste se u kozmetičkoj industriji (Akhtar i sar., 2011).

**Sastojci masne faze emulzija.** Kada se koriste emulzioni proizvodi (pre svega za negu kože), jedan od prvih očekivanih efekata je vlaženje kože i izazivanje osećaja glatkoće i mekoće na njenoj površini. Efekti zavise od formulacije proizvoda kao celine, ali je od izuzetnog značaja pravilan izbor sastojaka masne faze. Emolijensi (emolijenti) su supstance ili proizvodi koji, nakon aplikacije, kožu čine mekom i glatkom. Oni povećavaju vlažnost i plastičnost kože stupanjem u direktnu interakciju sa SC (npr. ceramidi), ili posredno, zahvaljujući okluzivnom efektu i smanjenju transepidermalnog gubitka vode (TEWL). Pri formulaciji emulzija za negu kože, izbor emolijenasa je od velikog značaja, pošto je

emolijentni efekat krema na koži određen fizičko-hemijskim osobinama masne faze tog krema (Vasiljević i sar., 2009).

Uloge emolijenasa su brojne:

- zamenjuju prirodne lipide kože (ili bar neke od njih);
- štite kožu (zahvaljujući moći razmazivanja i okluzivnom efektu);
- utiču na mekoću/glatkoću i teksturu kože;
- poboljšavaju lubrikantni efekat preparata koji se nanosi na kožu;
- zadržavaju vlagu u koži;
- solubilizuju i rastvaraju aktivne komponente u kozmetičkom/dermokozmetičkom proizvodu;
- utiču na viskozitet/konzistenciju i senzorne karakteristike emulzija (sjaj, gustina, lepljivost, kohezivnost, mazivost, punoća, osećaj masnoće na koži, moć upijanja, količina krema koji zaostaje na koži nakon primene).

Emolijensi obuhvataju širok opseg jedinjenja: od vazelina i odgovarajućih mineralnih ulja (parafinsko ulje) do relativno nemasnih estara, kao što su izopropilpalmitat ili izopropilmiristat. Između njih, nalazi se veliki broj masti, ulja i voskova, uključujući lanolin, masne kiseline, više alkohole, trigliceridne estre, voskove i estre polihidroksilnih alkohola.

Izbor najpogodnijeg emolijensa ili njihove kombinacije zavisi od namene proizvoda, mesta aplikacije i uslova primene, kao i potrebe da se postigne zadovoljavajuća fizička stabilnost i estetske karakteristike proizvoda (Vasiljević i sar., 2009).

**Sastojci vodene faze emulzija.** U dermokozmetičkim formulacijama koristi se voda dobijena postupkom demineralizacije ili destilacije. U sastav vodene faze kremova ulaze i svi ostali sastojci, koji se sa vodom mešaju ili u njoj rastvaraju, kao što su:

- hidrosolubilni emulgatori;
- ugušćivači (metilceluloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropil metilceluloza, ksantan guma, karbomeri itd.);
- humektansi (propilenglikol, glicerol, butilenglikol, tečni polietilenglikoli);
- sredstva za saponifikaciju i korekciju pH vrednosti kremova (NaOH, KOH, trietanolamin (TEA), boraks, limunska i mlečna kiselina);
- helatna sredstva (dinatrijumova i tetranatrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA));
- konzervansi (metilparaben, mešavine metil-, etil-, propil- i butilparabena, rastvori parabena u propilenglikolu ili u fenoksietanolu, imidazolidinil urea itd.);

- soli, kao stabilizatori V/U emulzija (magnezijum sulfat heptahidrat, natrijum hlorid);
- aktivne supstance (pantenol, derivati vitamina C, pseudokolageni biljnog i ribljeg porekla, aminokiseline, aloe vera ekstrakt/gel, propilenglikolni biljni ekstrakti,  $\alpha$ -hidroksikiseline, urea, natrijum- i amonijum laktat itd.) (Vasiljević i sar., 2009).

**Izbor emulgatora za dermokozmetičke emulzije.** U formulacijama kremova i losiona, pored masne i vodene faze, neophodno je prisustvo i jednog ili više emulgatora. Izbor emulgatora će zavistiti, pre svega od tipa emulzije koja se formuliše (U/V, V/U, mešoviti tip), konzistencije proizvoda, kao i namene proizvoda. Od izbora emulgatora, ali i ostalih sastojaka formulacije zavisiće i postupak izrade. Danas je na raspolaganju veliki broj emulgatora, koemulgatora i stabilizatora različitog tipa. Kozmetičke emulzije se stabilišu različitim PAM, najčešće nejonskog (npr. sorbitanski estri i polisorbati, holesterol, makrogolni etri i estri), ili anjonskog tipa (npr. sapuni i/ili njihove kombinacije sa masnim alkoholima) (Vasiljević i sar., 2009).

Na temperaturi emulgovanja, kada vodena i masna faza dođu u kontakt, usled površinske aktivnosti emulgatora i primene energije mešanja unutrašnja faza emulzije se disperguje u obliku kapi. Pri tom, na granici dve faze, u prisustvu koemulgatora (masnih alkohola) oko dispergovanih kapi dolazi do gustog pakovanja jednog broja molekula PAM i molekula masnih alkohola prisutnih u višku u mono- ili višemolekularne filmove (Vasiljević i sar., 2009). Kao koemulgatori za stabilizaciju U/V emulzija, koriste se gliceril-mono-stearat (GMS), masni alkoholi (npr. cetil-, stearil-, cetostearilalkohol). Za kostabilizaciju U/V emulzija upotrebljavaju se različiti ugušćivači (reološki modifikatori), kao što su: derivati celuloze (metilceluloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropil metilceluloza itd.), ksantan guma, karbomeri itd. (Vasiljević i sar., 2009).

**Konzervisanje dermokozmetičkih emulzija.** Konzervansi se dodaju dermokozmetičkim proizvodima sa ciljem da spreče rast i razvoj mikroorganizama. Zadatak konzervanasa je da osiguraju trajnost proizvoda pa ih kremovi i losioni, kako U/V tako i V/U tipa, obavezno moraju sadržati. Najčešće korišćeni konzervansi za kremove i losione su parabeni (metil-, etil-, propil-, butil-, izobutil-) obično rastvoreni u fenoksietanolu ili u propilenglikolu (zbog slabe rastvorljivosti u vodi) koji je i sam dobar konzervans, imidazolidinil urea, diazolidinil urea, fenoksietanol itd (Vasiljević i sar., 2009).

**Vidovi nestabilnosti emulzija.** Svi emulzioni sistemi su termodinamički nestabilni sistemi u kojima masna i vodena faza imaju težnju da se razdvoje. Nakon izrade, odnosno u periodu čuvanja (skladištenja emulzija), mogu se desiti različiti procesi, tj. vidovi nestabilnosti emulzija, kao što su raslojavanje, flokulacija, koalescencija, separacija faza. Razdvajanje vodene i masne faze predstavlja krajnju posledicu nestabilnosti emulzija, separaciju – koja je ireverzibilna pojava (Vasiljević i sar., 2009).

Za određivanje tipa emulzije postoji više različitih metoda, a najpouzdanija je konduktometrijska metoda – merenjem električne provodljivosti. Postupak je jednostavan, a određivanje se izvodi uranjanjem elektrode konduktometra u uzorak. Na osnovu dobijenih vrednosti električne provodljivosti (izraženih u  $\mu\text{S/cm}$ ) može se odrediti tip emulzije. Ako je električna provodljivost manja od  $1 \mu\text{S/cm}$  emulzija je tipa V/U, emulzije mešovitog tipa imaju vrednosti do  $50 \mu\text{S/cm}$ , a emulzije tipa U/V preko  $50 \mu\text{S/cm}$  (Vuleta, 2004).

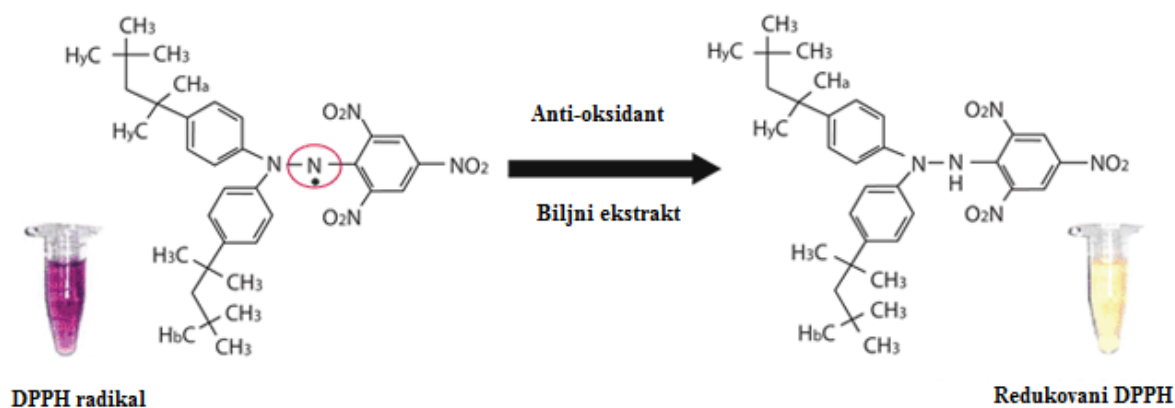
## 2.4 Metode analize

### 2.4.1 ICP-OES

AAS-Atomska apsorpciona spektrofotometrija se uglavnom koristi za određivanje metala, kako u proizvodima, tako i u biljnom materijalu. Zbog svoje visoke pouzdanosti i tačnosti poslednjih godina sve veću primenu u ovoj oblasti nalaze nove metode zasnovane na X-zracima (X-Ray fluorescence methods), kao i neutron aktivaciona analiza i indukovana kuplovana plazma (ICP) (Bhat, 2010). Optička emisiona spektrometrija sa indukovano kuplovanom plazmom (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) je primenjena za određivanje sadržaja elemenata u listu i ekstraktu plodova *M. alba* i *M. nigra*. Ova metoda omogućava brzo i precizno analiziranje 75 elemenata periodnog sistema.

### 2.4.2 DPPH metoda

Određivanje „scavenging“ antioksidansnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalu zasniva se na redukciji ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH $\cdot$ ) odgovarajućim antioksidansima do bledo-žutog hidrazina. Antioksidativna aktivnost se određuje u organskom sistemu praćenjem promene apsorpcije na 515 do 528 nm, sve dok apsorpcija ne postane konstantna (Slika 4.); ili ESR-om (elektronspin rezonancom) (Brand-Williams i sar., 1995; Fuhrman i sar., 2001; Lachman i sar., 2007).



**Slika 4. Neutralisanje slobodnog radikala DPPH radikalom**

### 2.4.3 HPLC

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima vrsta *Morus* određen je HPLC tehnikom, koja je jedna od najkorišćenijih metoda za analizu. Fenolne materije se obično analiziraju korišćenjem različitih vrsta detektora kao što su: ultraviolet-vidljiva (UV-VIS) detektori sa fotodiodnim nizom (PDA), diode array detektor (DAD), kao i UV fluorescentni detektori. Primena DAD detektora obezbeđuje skeniranje celog UV-VIS područja od 210-650 nm (Živković, 2009). Ova metoda je korišćena i od strane drugih autora koji su vršili HPLC analizu (Radojković, 2012; Pawlowska, 2008; Ercisli i Orhan, 2007; Gundogdu i sar., 2011; Memon i sar., 2010; Yang i sar., 2010., Zhishen i sar., 1999; Sohn i sar., 2004; Katsube i sar., 2006).

### 2.4.4 Kvantifikacija efekata dermokozmetičkih proizvoda merenjem biofizičkih parametara kože

Stupanjem na snagu 6. amandmana na kozmetičku uredbu EU 1223/2009 (Regulation EC 1223/2009), proizvođači koji svoje proizvode plasiraju na tržište EU stekli su obavezu da vrše procenu efekata koji su i deklarirani za taj proizvod, ako je moguće, sprovođenjem *in vivo* studija na dobrovoljcima. Na taj način bi trebalo smanjiti mogućnost dovođenja potrošača u zabunu.

Neophodno je da proizvođač ima dokaz, odnosno potvrdu o efektima (engl. *claim substantiation*), koji se pripisuju kozmetičkom/dermokozmetičkom proizvodu, bez obzira na namenu. Ovi podaci moraju biti rezultat stručne, objektivne, validirane i verifikovane procene svih deklariranih, odnosno reklamiranih efekata dermokozmetičkih proizvoda (Lodén, 2005).



Najčešće se ti efekti dokazuju pomoću aparata koji koriste neinvazivne tehnike, merenjem biofizičkih parametara kože (električne karakteristike kože, mehanička svojstva kože, pH vrednost, napon vodene pare na površini kože). Na osnovu biofizičkih svojstava kože mogu se odrediti parametri kao što su: sadržaj vlage u koži, pH vrednost, procena boje kože (posredno i procena iritacije kože), transepidermalni gubitak vlage. Merenjem parametara pre i posle aplikacije proizvoda dolazi se do zaključaka na osnovu kojih se mogu, pored delimične procene bezbednosti, definisati i drugi efekti proizvoda (Lodén, 2005).

Primena dermokozmetičkih proizvoda na koži može proizvesti različite pozitivne efekte, kao što su poboljšanje stanja vlažnosti (tj. stepena hidratacije), poboljšanje barijerne funkcije kože (tj. smanjenje transepidermalnog gubitka vode kroz kožu), glatkiji mikroreljef (bore, neravnine) kože, revitalizaciju mehaničkih svojstava kože (čvrstina, mekoća, gipkost, elastičnost), smanjenje perutanja kože, uticaj na sadržaj lipida na površini kože, korekciju pH kože, promenu boje kože i druge. Karakteristični parametri biofizičkih svojstava kože se, uobičajeno tokom istraživanja uticaja i efekata raznih proizvoda za primenu na kožu, mogu meriti na intaktnoj koži nadlaktice zdravih dobrovoljaca (Pavlović i sar., 2013). Za optimalno sprovođenje svih *in vivo* tehnika kvantifikacije biofizičkih parametara kože definisani su opšti zahtevi. To je neophodno kako zbog ponovljivosti eksperimenta i od strane drugih istraživača, tako i zbog smanjenja uticaja efekata sredine (vlažnost, temperatura, strujanje vazduha itd.) koji mogu da utiču na rezultate istraživanja. U skladu sa tim zahtevima, sva testiranja treba izvoditi u laboratorijama sa konstantnom sobnom temperaturom (20-23 °C) i relativnom vlažnošću od 40-60%. Svi ispitanici bi trebalo da se prilagode na ove uslove pre pristupanja merenjima u toku 30-tak minuta boravka, u prostoriji gde se merenje obavlja. Ispitanici bi trebalo da budu psihološki i fiziološki uravnoteženi. Pri eksperimentalnim istraživanjima poželjno je da osoba koja vrši merenje i procenjuje rezultate poseduje iskustvo (Pavlović i sar., 2013).

Treba imati u vidu da je vlažnost kože jedan od najrelevantnijih parametara za merenje kojim se karakteriše stanje kože u smislu hidratacije *stratum corneum*-a - (SC). Voda deluje kao plastizer za kožu i bitan je deo visoko-organizovane lipidne barijere SC-a (tečno-kristalna ili gel faza). Kako voda isparava kontinuirano sa površine kože, biofizičkim merenjima može se kvantifikovati parametar TEWL kao mera funkcionalnosti barijere SC-a. Zavisno od relativne vlage i temperature, koža može postati suva, gruba, deskvamirana, ili se čak mogu pojaviti i fisure. U tom smislu, u dermokozmetičkim proizvodima za vlaženje kože bi trebalo da se kombinuju komponente humektantnog tipa (prirodni vlažeći faktor) i

lipide/emolijense koji imaju semi-okluzivan efekat na površini kože i mogu smanjiti TEWL (Vasiljević i sar., 2009).

Procena hidratacije kože može se vršiti metodama kvantifikacije relativnih biofizičkih parametara kože. Međutim, pri tome treba imati u vidu da se apsolutni sadržaj vode u koži ne može meriti, već se može vršiti merenje električnih svojstava kože, procena topografije površine kože, određivanje mehaničkih osobina kože, procena deskvamacije površine kože. Veoma korišćena i popularna metoda u cilju procene hidratacije kože je metoda merenja električnih svojstava kože, tj. merenje neke od sledećih veličina: impedance kože ( $Z$ ), ukupni otpor proticanju jednosmerne struje kroz kožu ( $R$ ) i kapacitivnost kože ( $C$ ) (Vasiljević i sar., 2009).

Corneometer CM-825 (Courage & Khazaka, Nemačka) meri kapacitivnost kože, osetljiv je na relativnu dielektričnu konstantu vode, a meri i sadržaj vlage na dubini 60 – 100  $\mu\text{m}$ . Promene u totalnoj kapacitivnosti kože se izražavaju u ACU (arbitrarnim jedinicama). Uređaj je selektivan kod suve kože, ali ne i kod jako hidratizane kože (Tasić-Kostov, 2013).

Barijerna funkcija kože ogleda se u njenoj sposobnosti da ograniči difuziju vode kroz epidermis u spoljnu sredinu, kao i u limitiranju penetracije u kožu za supstance aplikovane spolja. Barijera je određena integritetom SC-a, koji se sastoji od nekoliko slojeva korneocita uronjenih u lipidni matriks (uglavnom sastavljen iz ceramida, holesterola i slobodnih masnih kiselina – fiziološki lipidi) (Tasić-Kostov, 2013).

Zdrava koža u dobrom stanju ima dobru barijernu funkciju, koja se karakteriše niskim vrednostima TEWL-a. Međutim, kod hemijski ili fizički oštećene kože, kao i kod nekih patoloških stanja, barijerna funkcija je narušena, tako da TEWL raste. Barijerna funkcija se procenjuje merenjem količine vode koja prolazi kroz SC barijeru i napušta kožu kao vodena para, te se tako obezbeđuje informacija o integritetu epidermisa i efektima koje lokalno primenjeni dermokozmetički proizvodi imaju na epidermalnu barijeru (Tasić-Kostov, 2013).

Veliki je izazov razviti proizvod koji sadrži lipidnu kompoziciju takvu da može da popravi barijernu funkciju kože, a time posredno i nivo tj. stepen njene hidratisanosti. Naime, jačanje integriteta barijere SC je jedan od mehanizama održavanja optimalnog stanja hidratisanosti kože, mada ovi parametri ne moraju biti direktno povezani. Visok TEWL i niska hidratisanost mogu koegzistirati npr. kod suve (kserotične kože), ali kod oštećene kože i TEWL i hidratisanost mogu biti visoki. Primeri kada je indikovano merenje TEWL-a su procena oštećenja SC-a primenom proizvoda za pranje (koji sadrže iritabilne, agresivne surfaktante), procena reparirajućeg efekta kremova koji sadrže određene lipidne frakcije

(fiziološke i nefiziološke), kao i procena prevencije oštećenja koja mogu uzrokovati različiti hemijski ili fizički agensi (preventivan tretman lipidnim kremovima) (Vasiljević i sar., 2009).

Za procenu barijerne funkcije kože koristi se TEWA-meter (Courage-Khazaka) otvorenog tipa. Meri se napon pare sondom, koja se smešta upravno na površinu kože. Sonda sadrži otvoren cilindar sa dva higro-senzora i dva termo-senzora, smeštena na različitim rastojanjima od površine kože. Na obe tačke mere se lokalna relativna vlaga i temperatura, a računa se odgovarajući napon pare. Razlika između napona pare na obe tačke duž gradijenta direktno je povezana sa brzinom gubitka vode sa određenog dela kože (Vuleta, 2004).

Još jedan od biofizičkih parametara koji se može meriti u cilju procene efekata lokalno aplikovanih preparata na kožu je i pH kože. Do narušavanja fiziološkog pH kože može doći u slučaju pranja alkalnim sapunima, agresivnim sredstvima za pranje, sindetima, aplikacijom anti-perspirantnih i deo-preparatima, preparatima za epilaciju itd. Promena pH kože se registruje pH-metrom (Vuleta, 2004).

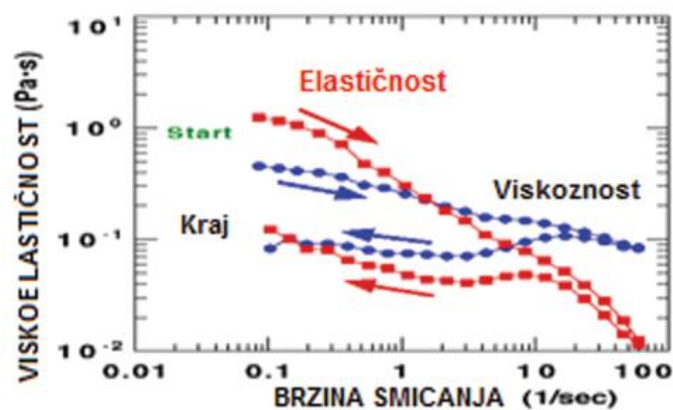
Kvantifikacija navedenih biofizičkih parametara kože korišćena je u studijama procene efekata emulzija za lokalnu primenu na kožu sa ekstraktom duda. U tim studijama, pokazano je da emulzije sa ekstraktom duda povećavaju vlažnost kože ali bez statistički značajne razlike (za  $p > 0,05$ ). Što se tiče smanjenja eritema indeksa, došlo je do njegovog smanjenja sa statistički značajnom razlikom (Akhtar i sar., 2012; Akhtar i sar., 2012).

#### **2.4.5 Reološka svojstva proizvoda**

Vrednost relativnog viskoziteta polučvrstih preparata za lokalnu primenu na koži se određuje pomoću rotacionog viskozimetra, najranije 24 – 48 sati nakon izrade. Princip kontinualnih reoloških merenja je da se na uzorak deluje određenom silom smicanja i prati ponašanje sistema pod uticajem te sile. Merenja na rotacionom viskozimetru izvode se tako da su dva različita tela, od kojih jedno rotira, u vezi preko sloja ispitivanog uzorka. U zavisnosti od otpora koji pruža uzorak, izvesni obrtni momenat se prenosi sa površine jednog tela na površinu drugog. U zavisnosti od konstrukcije instrumenta mogu se menjati brzine smicanja, a registrovati naponi smicanja ili obrnuto. Na taj način se dobijaju krive tečenja ili reogrami, kod kojih se na apscisu nanosi brzina smicanja, a na ordinatu napon smicanja. Brzina i napon smicanja su u vezi preko koeficijenta viskoziteta ( $\eta = \tau/D$ ), koji predstavlja otpor tečenju, odnosno otpor viskoznoj deformaciji. Na osnovu ovakvih merenja moguće je proceniti tip tečenja, graničnu vrednost sistema (napon smicanja na kome sistem počinje da teče) i viskozitet na željenom naponu, odnosno brzini smicanja. Ako se uzorak podvrgne rastućim brzinama ili naponima smicanja (uzlazna kriva tečenja), nakon čega sledi postepeno

zmanjenje brzine, odnosno napona smicanja (silazna kriva tečenja), vrednost brzine odnosno napona smicanja će kod tiksotropnih uzoraka biti manja na silaznoj krivoj nego na uzlaznoj.

Površina između uzlazne i silazne krive tečenja naziva se tiksotropna petlja (Slika 5.). U praksi je prihvaćeno da je postojanje tiksotropne petlje dokaz, a njena površina merilo tiksotropije. Dakle, tiksotropija je reverzibilno, vremenski zavisno opadanje viskoziteta pri konstantnoj brzini smicanja. Tiksotropija je poželjna osobina za topikalne proizvode jer omogućava lakšu primenu i razmazivost proizvoda. Merenja na rotacionom viskozimetru Rheotest rađena su uz primenu sistema kupa/ploča K1 i sistema koaksijalnih cilindara S1. Promenom brzine smicanja za sistem K1 u intervalu 11,1-180 s<sup>-1</sup> i za sistem S1 u intervalu 3-145,8 s<sup>-1</sup>, određeni su naponi smicanja i prividni viskozitet za svaku od primenjenih brzina prema formulama:  $\tau = +\alpha \times z$  i  $\eta = \tau/D$ , gde su  $\tau$  – napon smicanja pri upotrebljenoj brzini smicanja D (izražen u Pa);  $+\alpha$  – srednja vrednost odklona kazaljke na skali mernog instrumenta, koji je proporcionalan naponu smicanja; z – konstanta koja zavisi od mernog sistema (za sistem K1 = 7,73, a za S1 = 0,576);  $\eta$  – prividni viskozitet pri upotrebljenoj brzini smicanja D (izražen u Pas); D – upotrebljena brzina smicanja (izražena u s<sup>-1</sup>). Brzine smicanja se postepeno povećavaju (uzlazno merenje) do maksimalne vrednosti, pa se potom postepeno smanjuju (povratno merenje).



**Slika 5. Zavisnost tiksotropije od gradijenta brzine smicanja i viskoelastičnosti**

Kozmetički/dermokozmetički proizvodi tipa emulzije, su nenjutnovski reološki sistemi. Kod njih je karakteristično da aplikacija i efekat lokalne terapije mogu zavisiti od reoloških svojstava. Ukoliko proizvod poseduje lošu razmazivost, teže je da se nanese podjednako na svim delovima željenog mesta aplikacije, a samim tim se i teže postiže ujednačena koncentracija aktivne supstance na svim delovima mesta primene (Martić, 2016).

Ukoliko proizvod poseduje dobre reološke osobine, lako se razmazuje i moguće je postići željenu koncentraciju na svakom mestu aplikacije proizvoda. Naime, poznato je da viskozitet svih fluida zavisi od vrste fluida, temperature, pritiska, gradijenta brzine smicanja i vremena smicanja, a da navedeni parametri ne utiču na viskozitet u istoj meri. Prema svojim karakteristikama tečenja fluidi se mogu svrstati u jednu od tri grupe: njutnovski fluidi (idealni), nenjutnovski – vremenski zavisni fluidi i nenjutnovski – vremenski nezavisni fluidi (Martić, 2016).

Fluidi čiji se viskozitet menja pri konstantnom gradijentu brzine smicanja su vremenski zavisni nenjutnovski fluidi. Ukoliko se viskozitet takvih sistema vremenom smanjuje govori se o *tiksotropnim* sistemima, a ukoliko im se viskozitet sa vremenom povećava govori se o *reopektičkim* sistemima. Sistemi koji ne slede Njutnov zakon tečenja i kod kojih viskozitet ne zavisi od vremena smicanja su vremenski nezavisni nenjutnovski sistemi. Viskoizitet takvih sistema zavisi od gradijenta brzine smicanja. Ukoliko se viskoizitet takvih sistema smanjuje sa povećanjem gradijenta brzine smicanja govori se o pseudoplastičnim sistemima, a ukoliko im se viskoizitet povećava sa povećanjem gradijenta brzine smicanja govori se o dilatantnim sistemima. Veliki broj dermokozmetičkih proizvoda (kreme, masti) pokazuje psueudoplastična svojstva.

Od karakteristika tečenja gotovog proizvoda u velikoj meri zavise njegova primena i prihvatanje od strane potrošača (Martić, 2016). Proizvod treba biti ujednačene konzistencije, da se lako nanosi i da formira ujednačeni sloj na površini kože. Sa kompleksnim tečenjem materije tokom izrade formulacije povezane su brojne tehnološke operacije kao što su: mešanje, emulgovanje, dispergovanje; ali i razmazivost na mestu aplikacije, oslobađanje lekovite supstance iz podloge (Martić, 2016). Tako se npr. gradijenti brzine smicanja, koji se javljaju pri aplikaciji krema na kožu, menjaju u opsegu  $0 - 10\ 000\ s^{-1}$ .

Reološkim merenjima najpre se simuliraju gradijenti brzina smicanja koji se javljaju kod određenih procesa, a onda se prate (mere) promene u uzorku nastale usled njegovog deformisanja. Svaki farmaceutski oblik kao i dermokozmetički proizvod mora biti tako formulisan da može podneti uobičajene manipulacije (proizvodnja, aplikacija, skladištenje), tj. da pri tom zadrži željena reološka svojstva i stabilnost. Što je oblik odnosno proizvod složeniji (ukoliko se sastoji od više faza) to su i njegova reološka svojstva komplikovanija. Tako npr. reološka svojstva emulzija zavise od unutrašnje faze (zapreminski udeo, interakcija i flokulacija kapljica, veličina čestica, hemijska konstitucija), kontinuirane faze (viskoizitet, polarnost, pH, koncentracija elektrolita), emulgatora (konstitucija, koncentracija,

rastvorljivost u obe faze, stvaranje micela), kao i prisutnih ekscipijenasa (pigmenti, hidrokoloidi).

Svaka promena jednog od parametara može promeniti reološka svojstva čitavog sistema. Dakle, reološka merenja u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji sprovode se:

- radi određivanja strukture i sastava sirovina i proizvoda;
- radi praćenja promena u formulaciji u fazi razvoja leka tj. dermokozmetičkog proizvoda;
- radi praćenja uticaja reoloških svojstava na kvalitet dermokozmetičkog proizvoda;
- radi predviđanja i praćenje ponašanja proizvoda tokom proizvodnje;
- u svrhu kontrole sirovina i proizvoda;
- prikupljanje podataka potrebnih za dizajn i izradu proizvodne opreme;
- praćenje uticaja čuvanja i skladištenja dermokozmetičkog proizvoda na njegov kvalitet tokom testova stabilnosti.

Da bi se opisale karakteristike tečenja i struktura materijala u reologiji se koriste dva ključna pojma: napon smicanja (engl. *shear stress*) i gradijent brzine smicanja (engl. *shear rate*) (Vuleta, 2004).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Materijal

**Biljni materijal.** Plodovi i listovi, *M. nigra* i *M. alba* sakupljeni su u junu 2013. odnosno julu 2015. (selo Donji Barbeš, u blizini Gadžinog Hana, Srbija). Identitet biljnog materijala je potvrđen od strane dr Marije Marković sa PMF-a u Nišu, a vaučeri (VM0012 and VM0013) se nalaze u Herbarijumu Prirodno Matematičkog Fakulteta u Nišu, Srbija. Plodovi duda su do početka procesa ekstrakcije čuvane u frižideru (-17 °C). Deo lišća je hidrodestilovan odmah nakon sakupljanja, a drugi deo nakon perioda sušenja od mesec dana bez direktnog izlaganja sunčevoj svetlosti.

**Hemikalije i reagensi.** U eksperimentu su korišćene sledeće hemikalije: metanol p.a. (Macron, Fine chemicals, Norway); koncentrovana azotna kiselina (Sigma Aldrich); vodonik peroksid (Zorka farma); 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH); dimetilsulfoksid (Sigma Aldrich); tetrametilsilan (TMS); mravlja kiselina; dietiletar (Merck, Germany); magnezijum-sulfat (Sigma Aldrich); HCl; Carbopol®Ultrez 10 (Centrohem, Srbija); natrijum-benzoat; TEA (trietanolamin); Dekaben C (2-fenoksietanol, butilparaben, metilparaben, etilparaben, propilparaben, izobutilparaben); propilenglikol (Tehno-chem, Srbija); beli pčelinj vosak (extra pure, Centrohem, Srbija); lanolin (Sigma Aldrich, Srbija); polisorbit 60 (Tehno-chem, Srbija); cetostearil alkohol (extra pure, Centrohem, Srbija); tečni parafin (Swim d.o.o., Šabac, Srbija); beli vazelin (Tehno-chem, Srbija); natrijumlauril sulfat (NaLS) (Merck, Darmstadt, Germany); Parafilm® (American National Can. Co., Chicago, Illinois, USA); Sensifix® (Galenika, Srbija); trifenil tetrazolijum hlorid (TTC) – Radni rastvor je pripremljen rastvaranjem 0,5 g praškaste supstance u 100 cm<sup>3</sup> destilovane vode nakon čega je rastvor sterilisan i čuvan na temperaturi od 4 °C do upotrebe; fiziološki rastvor (0,9% rastvor natrijum-hlorida) je pripremljen rastvaranjem 9 g NaCl u 1 dm<sup>3</sup> destilovane vode, nakon čega je rastvor sterilisan i čuvan na temperaturi od 4°C do upotrebe; 10% rastvor DMSO-a (dimetil sulfoksid) je pripremljen rastvaranjem 10 g DMSO-a u 100 cm<sup>3</sup> destilovane vode, nakon čega je rastvor sterilisan i čuvan na temperaturi od 4 °C do upotrebe; Miler Hinton bujon (Müeller Hinton Broth, HiMedia, M391) je korišćen kao tečna podloga za gajenje bakterijskih kultura u eksperimentima za određivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija metanolnih ekstrakata. 1 dm<sup>3</sup> podloge sadrži: mesni ekstrakt (300 g), kazein hidrolizat (17,5 g), štirak (1,5 g). Konačna pH vrednost je 7,4±0,2 na 25 °C. Podloga je pripremana rastvaranjem 21,0 g suve podloge u 1 dm<sup>3</sup> destilovane vode. Nakon

stajanja od 15 minuta i inicijalnog zagrevanja na rešou radi potpunog rastvaranja, vršena je sterilizacija u trajanju od 20 minuta na 121 °C; Hranljivi agar (Torlak) je korišćen za presejavanje mikroorganizama pri njihovom održavanju, kao i za dobijanje prekonoćnih kultura od kojih su pravljene suspenzije mikroorganizama. Sastav ove podloge po 1 dm<sup>3</sup> je sledeći: pepton (15 g), mesni ekstrakt (3 g), natrijum-hlorid (5 g), kalijum-fosfat (0,3 g), agar agar (18 g). Konačna vrednost pH je 7,3 na 25 °C. Priprema ove podloge je vršena suspendovanjem 38 g suve podloge u 1 dm<sup>3</sup> destilovane vode. Nakon stajanja od 15 minuta i inicijalnog zagrevanja na rešou radi potpunog rastvaranja, vršeno je razlivanje podloga i sterilizacija u trajanju od 20 minuta na 121 °C.

**Bakterijski sojevi.** Osim referentnih bakterijskih sojeva iz ATCC kolekcije, korišćeni su i sojevi izolovani iz briseva rana pacijenata (izvor: Institut za javno zdravlje Novi Sad).

Korišćeni su sledeći bakterijski sojevi: Gram (+) – *Staphylococcus aureus* (izolat iz brisa rane), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* (izolat iz brisa rane), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* (izolat iz brisa rane), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis* (izolat iz brisa rane), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Propionibacterium acnae* ATCC 11827; Gram (-) – *Escherichia coli* (izolat iz brisa rane), *Escherichia coli* ATCC 9863, *Pseudomonas aeruginosa* (izolat iz brisa rane), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Acinetobacter sp.* (izolat iz brisa rane), *Acinetobacter baumannii* ATCC 196060, *Proteus mirabilis* (izolat iz brisa rane), *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella sp.* (izolat iz brisa rane), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

Izolacija i identifikacija bakterijskih sojeva vršena je standardnim mikrobiološkim metodama, na osnovu njihovih mikroskopskih, kulturalnih i fiziološki-biohemijskih osobina (Winn i Koneman, 2006). U postupku izolacije i identifikacije korišćene su sledeće podloge i testovi:

*Staphylococcus aureus* – Columbia agar (Oxoid), Chapman sa novobiocinom agar (Oxoid), test koagulacije plazme (HiMedia);

*Staphylococcus epidermidis* – Columbia agar (Oxoid)

*Streptococcus pyogenes* – Columbia agar (Oxoid), Bacitracinski test, Aglutinacija Streptokitom A (Oxoid);

*Enterococcus faecalis* – Columbia agar (Oxoid), Roche-ova podloga (bill-eskulin agar) (Merck);



*Escherichia coli* – Endo agar (HiMedia), standardna biohemijska serija (Kliglerov dvostruki šećer, peptonska voda-indol reakcija sa Kovačevim reagensom, Kristensenova urea, Simonsov citrat, pariski manit) (Oxoid);

*Pseudomonas aeruginosa* – Columbia agar (Oxoid), standardna biohemijska serija (Kliglerov dvostruki šećer, peptonska voda-indol reakcija sa Kovačevim reagensom, Kristensenova urea, Simonsov citrat, pariski manit) (Oxoid), King A i King B agar (HiMedia), Miler-Hinton agar na 42 °C;

*Acinetobacter sp.* – Columbia agar (Oxoid), standardna biohemijska serija (Kliglerov trostruki šećer, peptonska voda-indol reakcija sa kovačevim reagensom, Kristensenova urea, Simonsov citrat, pariski manit) (Oxoid), preparat po Gramu;

*Proteus mirabilis* – Columbia agar (Oxoid), standardna biohemijska serija (Kliglerov trostruki šećer, peptonska voda-indol reakcija sa Kovačevim reagensom, Kristensenova urea, Simonsov citrat, pariski manit) (Oxoid);

*Klebsiella sp.* – Endo agar (HiMedia), standardna biohemijska serija (Kliglerov trostruki šećer, peptonska voda-indol reakcija sa kovačevim reagensom, Kristensenova urea, Simonsov citrat, pariski manit) (Oxoid), Ornitin dekarboksilaza (ODC) test (Oxoid).

**Aparatura.** Blender za homogenizovanje materijala; bihnerov levak; magnetna mešalica; vakuum uparivač; peć za žarenje; rešo; termometar; varijabilne automatske pipete; Clevenger aparat.

Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP sistem (Thermo Fisher Scientific Cambridge, Velika Britanija) koji sadrži Charge Injector Device (CID) detektor, koncentrični tip raspršivača, kvarcni injektor i cikličnu sprej komoru a za analizu As korišćena je integrisana hidridna tehnika (HG-ICP-OES).

UV/VIS spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta od 1 cm.

Ultimate Dionex 3000 UHPLC + DAD (diode array) koji je povezan sa masenim spektrometrom LCQ Fleet Ion Trap Mass Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, USA; kolona Hypersil Gold C18 (50 × 2.1 mm, 1.9 mikrona), Thermo Fisher Scientific, USA.

Hewlett-Packard 6890N gasni hromatograf opremljen sa spojenom kapilarnom kolonom DB-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina sloja 0.25 μm, Agilent Technologies, USA) i kuplovan sa 5975B maseno selektivnim detektorom iste kompanije.

Mikrotitraciona ploča sa „U“ dnom (proizvođač Spektar, Čačak, Srbija) sa 96 udubljenja; cone-plate Konus CP-52, Brookfield, DV-III Ultra; propelerska mešalica Stirrer RW16 basic (IKA®WERKE, Germany); pH-metar HI 8417, Hanna Instruments,

Woonsocket, RI, USA; konduktometar HANNA Hi 98311 Hanna Instruments; Corneometer CM-825 (Courage&Khazaka, Nemačka).

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Ekstrakcija biljnog materijala – ploda vrsta roda *Morus* L.

Ekstrakcija ploda vrsta roda *Morus* je izvršena primenom raznih rastvarača od strane brojnih autora (Dimitrijević, 2014). U zavisnosti od korišćenog rastvarača ili kombinacije rastvarača zavisio je i sadržaj ekstrakta. Najbolji rezultati, uzimajući u obzir sadržaj flavonoida u ekstraktu i njegovu antioksidativnu aktivnost, dobijeni su korišćenjem metanola kao ekstragensa. Sagledavanjem ciljeva koji su postavljeni u ovom eksperimentalnom radu, za ekstrakciju ploda duda je odabran metanol kao optimalni ekstragens.

Priprema ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra* je izvršena na sledeći način: plodovi duda ubrani u junu 2013 su držani u frižideru (-17 °C) do početka procesa ekstrakcije. Pre ekstrakcije, 150 g svake vrste je usitnjeno u blenderu. Ekstrakcija je izvršena tri puta korišćenjem 500 cm<sup>3</sup> p.a. metanola (Macron, Fine chemicals, Norway) na magnetnoj mešalici pri sobnoj temperaturi (24 °C) u trajanju od jednog sata. Nakon toga, prvi ekstrakt je odvojen i 250 cm<sup>3</sup> metanola je dodato ostatku, i proces je ponovljen. Drugi ekstrakt je kasnije odvojen (filtrat) korišćenjem Bihnerovog levka. Ovaj ekstrakt je spojen sa prvim ekstraktom, a ostatak je po treći put ekstrahovan sa 250 cm<sup>3</sup> metanola. Treća ekstrakcija je trajala 30 minuta i izvedena je pod istim uslovima kao i prethodne. Treći ekstrakt je spojen sa dva prethodna ekstrakta; sveukupno, bilo je 1000 cm<sup>3</sup> metanolnog ekstrakta. Ekstrakt je uparavan na vakuum uparivaču za dalje analize.



Slika 6. Uparavanje metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* na vakuum uparivaču

### 3.2.2 Određivanje sadržaja makro- i mikroelemenata u listu i ekstraktima

Suvo lišće *M. alba* i *M. nigra* različite starosti je suvim postupkom pripremljeno za određivanje makro- i mikroelemenata. Uzorak suvog lišća (oko 2 g) je žaren u peći za žarenje 2 h na temperaturi od 250 °C. Nakon toga je postepeno povećavana temperatura do 550 °C i žarenje je vršeno još 12 h. Pepeo je preliven sa 5 cm<sup>3</sup> koncentrovane azotne kiseline, rastvor je proceđen kroz kvantitativan filter papir, lončić za žarenje je tri puta ispran 0,5% azotnom kiselinom i rastvor u normalnom sudu od 25 cm<sup>3</sup> je dopunjen 0,5%-tnom azotnom kiselinom do crte (Mateos-Aparico i sar., 2010; Azue i Mudroch, 1994).

Za analizu elemenata sveži plodovi *M. alba* i *M. nigra* pripremljeni su po sledećem postupku: 0,5 g osušenog uzorka je preliveno sa 5 cm<sup>3</sup> konc. HNO<sub>3</sub> i stavljeno da se greje na rešou u trajanju od 1 h do ključanja. Zatim je ponovo dodato 5 cm<sup>3</sup> conc. HNO<sub>3</sub> i 2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, i ponovo zagrevano u trajanju od jednog sata. Nakon hlađenja, rastvor je profiltriran kroz kvantitativni filter papir u normalni sud od 25 cm<sup>3</sup> koji je dopunjen do crte 2M HNO<sub>3</sub>.

Primenjeni sistem za analizu elemenata u listu i plodu duda je Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP sistem (Thermo Fisher Scientific Cambridge, Velika Britanija) koji sadrži Charge Injector Device (CID) detektor, koncentrični tip raspršivača, kvarcni injektor i cikličnu sprej komoru. Za analizu As korišćena je integrisana hibridna tehnika (HG-ICP-OES). Analiza pripremljenih uzoraka izvršena je primenom operativnih uslova navedenih u Tabeli 5. i standardnog referentnog materijala. Sva merenja su ponovljena tri puta.

**Tabela 5. Operativni parametri određivanja**

Parametar	Vrednost
Brzina peristaltičke pumpe	50 rpm
Snaga radiofrekvetnog (RF) generatora	1150 W
Protok raspršivačkog gasa	0,7 dm <sup>3</sup> /min
Protok gasa za hlađenje	12 dm <sup>3</sup> /min
Protok gasa za obrazovanje plazme	0,5 dm <sup>3</sup> /min
Vreme ispiranja	30 s
Pravac posmatranja plazme	Aksijalni Radijalni (Na, K, Ca, Mg, P)

### 3.2.3 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata

Svi korišćeni reagensi i rastvarači su analitičkog stepena čistoće. Spektrofotometrijska merenja su vršena korišćenjem UV/VIS spektrofotometra Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta od 1 cm.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala testiranih uzoraka određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališe DPPH· radikale (DPPH test) (Brand-Williams i sar., 1995). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot-centriranog DPPH· radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u redukovanu žuto obojenu formu DPPH-H (Fuhrman i sar., 2001). Stepem obezbojavanja rastvora DPPH radikala ukazuje na „scavenger“ (hvatanje) potencijal antioksidativnih komponenti. Metoda je primenjena da bi se odredila antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra*. Kao referentni antioksidans korišćen u ovom testiranju korišćen je metanolni rastvor troloksa (TE), troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhrom-2-karboksilna kiselina) je hidrosolubilni analog vitamina E, kao i sledeći rastvori – DPPH rastvor: 6 mg DPPH je rastvoreno u 250 cm<sup>3</sup> metanola; radni rastvor: u normalni sud od 10 cm<sup>3</sup>, odmeri se zapremina uzorka od 1 cm<sup>3</sup>, doda 5 cm<sup>3</sup> sveže napravljenog DPPH i dopuni do crte metanolom; kontrolni rastvor (rastvor slepe probe): u normalni sud od 10 cm<sup>3</sup>, odmeri se zapremina od 5 cm<sup>3</sup> sveže napravljenog DPPH i dopuni do crte metanolom.

Suvi ekstrakti plodova vrsta roda *Morus*, dobijeni ekstrakcijom metanolom, su rastvoreni u vodi do koncentracije 1 mg/cm<sup>3</sup> i pomešani sa 95% metanolnim rastvorom i 90 μM DPPH· radikala (u metanolu) do različitih koncentracija suvog ekstrakta (0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 mg/cm<sup>3</sup>). Kao kontrolni rastvor korišćena je mešavina u kojoj je umesto suvog ekstrakta dodata destilovana voda. Kao slepa proba korišćen je 95% rastvor metanola. Nakon 30 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, absorbance testiranih rastvora su snimljene na 515 nm. Sa izmerenim absorbancama testiranih rastvora i absorbancom kontrolnog rastvora moguće je izračunati RSC (%) vrednost. Svaki uzorak i svaka koncentracija je snimljena 3 puta. IC<sub>50</sub> vrednost (mg/cm<sup>3</sup>), definiše se kao koncentracija ekstrakta potrebna da reaguje sa 50% DPPH· radikala (RCS=50%) u unapred određenim eksperimentalnim uslovima, je izračunata iz jednačine linearne regresije.

### 3.2.4 HPLC-MS analiza ekstrakata plodova vrsta roda *Morus L.*

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom i UV-VIS absorpcionom spektrometrijom (MS i DAD, respektivno), su korišćeni za kvalitativno određivanje sastava ekstrakata. Analiza je rađena na instrumentu

Ultimate Dionex 3000 opremljenim sa UHPLC + DAD (diode array) detektorom, koji je povezan sa masenim spektrometrom LCQ Fleet Ion Trap Mass Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, USA. Korišćeni UV-VIS detektor ima mogućnost spektralne analize ispitivanih uzoraka svih retencionih vremena na dobijenom hromatogramu, celog spektralnog opsega od 200 do 800 nm, zahvaljujući komponenti detektora DAD, koji predstavlja sistem unakrsno spojenih foto dioda. Kolona na kojoj je vršeno razdvajanje je Hypersil Gold C18 (50 × 2,1 mm, 1,9 mikrona) istog proizvođača. Temperatura kolone je bila 25 °C. Mobilna faza je smeša dva rastvarača: (A) 0,1% mravlje kiseline u vodi i (B) 0,1% mravlje kiseline u metanolu, sa gradijentnim režimom rada. Linearni gradijent pri protoku od 0,250 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> je sledeći: 10% - 30% (B) prvih dva minuta, zatim 40% - 50% (B) od 5-8 minuta i 80% - 90% (B) od 9-11 minuta, praćeno izokratskim segmentom u sastavu 90 % (B) od 11 do 12 min i nakon promene 90 – 10 % (B) od 12 do 12,1 min, sledi izokratski segment 10% (B) do 20. minuta. Zapremina analiziranih uzoraka je 1 µl. Metoda 1: Eluiranje u gradijentnom režimu rada: A-voda+0,1%HCOOH, B-ACN+0,1%HCOOH - 0 min 10%B, 2 min 30%B, 5 min 50%B, 7 min 90%B, 9 min 90%B, 9,2 min 10%, 15 min 10%B. UHPLC-MS analiza, vreme trajanja analize 15 min, protok 0,25 cm<sup>3</sup>/min. Analiza ESI-MS: temperatura kapilare: 275 °C, napon u izvoru: 4,5 kV, protok gasa: 32 arbitrarnih jedinica, auksilarni protok gasa: 8 arbitrarnih jedinica, napon kapilare -41 V. Metoda 1 i metoda 2 – pozitivno: kod obe metode, u pozitivnom modu je sledeće: ESI-MS temperatura kapilare: 350 °C, napon u izvoru: 5 kV, protok gasa: 32 arbitrarnih jedinica, auksilarni protok gasa: 8 arbitrarnih jedinica, napon kapilare 49 V. Parametri MS-detekcije su: ESI-jonski izvor u negativnom jonizacionom modalitetu (Electro Spray Ionization) sa naponom od 4,5 kV, naponom i temperaturom kapilare od -41 V i 350 °C, respektivno. Protok azota kao glavnog i pomoćnog gasa iznosi 32 i 8 (relativne jedinice), respektivno. Komponente su identifikovane u tzv. “full scan” – celokupnom opsegu m/z vrednosti od 100 do 1000, kao i korišćenjem tzv. tandem-masene analize MS/MS spektara dobijenih fragmentacijom jona-prekursora. Odgovarajuća energija korišćena za fragmentaciju jona kolizijom je podešena na 30 eV. Svi rastvarači korišćeni u ovom segmentu eksperimenata su LC-MS čistoće.

### **3.2.5 Određivanje sastava etarskog ulja lišća vrsta roda *Morus L.***

Izolacija etarskog ulja: sveži listovi (≈300 g) i suvi listovi (≈300 g) su podvrgnuti hidrodestilaciji u trajanju od 4,5 h korišćenjem originalnog Clevenger aparata. Dobijena ulja su odvojena ekstrakcijom sa dietil etrom (3 × 30 cm<sup>3</sup>; Merck, Germany). Dobijeni rastvori etarskih ulja su sušeni iznad anhidrovanoh magnezijum sulfata (10 g; Aldrich, USA).

Rastvarač je uparen pod blagom strujanjem azota pri sobnoj temperaturi, sa ciljem da se ne bi izgubile bilo kakve isparljive supstance. Etarska ulja su analizirana odmah nakon izolacije.

GC-MS analiza: GC-MS analize (tri ponavljanja) su izvršena korišćenjem Hewlett-Packard 6890N gasnog hromatografa opremljenog sa spojenom kapilarnom kolonom DB-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina sloja 0,25 μm, Agilent Technologies, USA) i kuplovanog sa 5975B maseno selektivnim detektorom iste kompanije. Injektor i interfejs su radili pri 250 i 300 °C, respektivno. Čak iako je temperatura povišavana od 70 do 290 °C pri zagrevanju od 5 °C/min, program je završio izotermalnim periodom od 10 minuta. Kao nosač korišćen je helijum 1,0 cm<sup>3</sup>/min. Uzorci, 1 μl rastvora etarskog ulja i dietil etra (10,0 mg uzorka etarskog ulja na 1 ml rastvarača), je injektovano u podeljenom pulsirajućem modu (protok je bio 1,5 cm<sup>3</sup>/min prvih pola minuta a kasnije je podešeno na 1,0 cm<sup>3</sup>/min tokom ostatka analize; podeoni odnos 40:1). MS uslovi su bili sledeći: jonizaciona voltaža 70 eV, nadolazak opsega masa m/z 35-650, vreme skeniranja 0,32 s.

### **3.2.6 Antimikrobna aktivnost ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.**

#### **Mikrodiluciona metoda**

Od kultura bakterijskih sojeva, koje su kultivisane preko noći, pripremljene su suspenzije turbiditeta 0,5 McFarlanda (gustine 10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>3</sup>), propisano od strane „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI, 2009).

Primenom mikrodilucione metode je određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC), u okviru serija od 12 duplih razblaženja ekstrakata (CLSI, 2009). Metoda je izvođena u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (proizvođač Spektar, Čačak) sa 96 udubljenja. Za testiranje antimikrobne aktivnosti suvih metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra* korišćena je podloga Mueller-Hinton II bujon sa korigovanom količinom jona kalcijuma i magnezijuma (CAMHB, Becton Dickinson). Bila je pripremljena serija duplo razblaženih ekstrakata (u 10% vodenom rastvoru dimetil sulfoksida – DMSO). Testirane koncentracije ekstrakta *M. alba* su bile u opsegu 0,02 – 100,00 mg/cm<sup>3</sup>, i 0,12 – 251,00 mg/cm<sup>3</sup> ekstrakta *M. nigra*. Kao rastvarač za ekstrakte upotrebljen je dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich), što je bila negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola, vršeno je testiranje delovanja četiri antibiotika: doksiciklina, ciprofloksacina, gentamicina i metronidazola (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Napravljena su razblaženja u koncentracionom opsegu od 0,01 do 100 mg/cm<sup>3</sup>. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja. Bakterijski rast je detektovan dodavanjem po 20 μL

0,5% vodenog rastvora trifenil-tetrazolium-hlorida (TTC). Za vrednosti MIC ekstrakata uzimana je najmanja koncentracija ekstrakta u kojoj je izostao vidljivi rast bakterija, crveno obojenih kolonija na dnu udubljenja mikrotitar ploče nakon dodavanja TTC-a. Da bi se odredila MBC, sadržaj udubljenja na kojima nije bilo vidljivog rasta je prenet na petri ploče sa Mueller-Hinton agarom (MHA) i inkubiran 24 h na 37 °C, nakon čega su brojane kolonije bakterija koje su izrasle. MBC je ona koncentracija ekstrakta pri kojoj je ubijeno 99,9% od početnog broja bakterijskih ćelija.

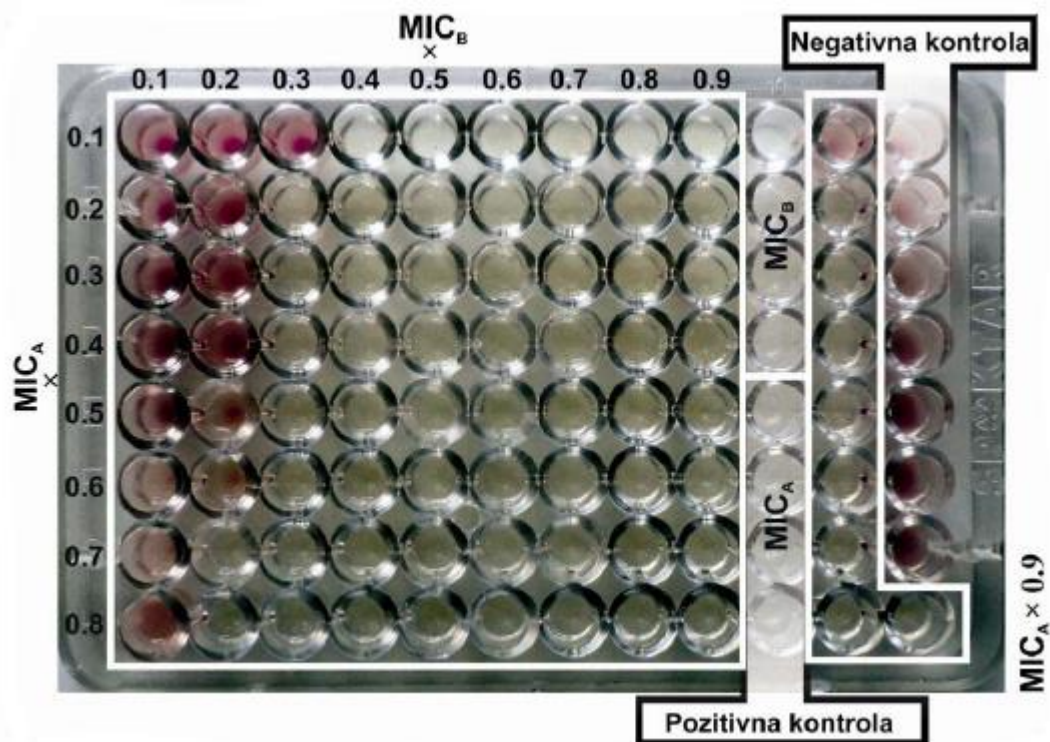
### **Mikrodiluciona metoda šahovske table**

„Checkerboard“ metodom se utvrđuje mogući sinergizam kombinovanjem dve komponente. Serije dvostrukih razblaženja svake komponente, počev od 4 x MIC, su pripremljene prema preporukama NCCLS-a neposredno pre testiranja (Bajaksouzian i sar., 1997). Za svaki testirani soj je napravljena ista suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda. Po 50 µL inokulisanog Mueller-Hinton bujona je distribuirano u svaki bunarić u mikrotitar ploči (96 bunarića), a zatim je dodato po 25 µL od svakog razblaženja obe komponente. Serijska razblaženja prve komponente (u ovom slučaju metanolni ekstrakti *M. nigra* ili *M. alba*) su dodata duž ordinate, dok su serijska razblaženja druge komponente (antibiotik metronidazol) dodata duž abscise. Ploče su inkubirane na temperaturi od 37 °C u trajanju od 24 h. Dobijena šahovska tabla sadrži svaku kombinaciju dveju komponenti, pri čemu se bunarići koji sadrže najviše koncentracije svake komponente nalaze na suprotnim uglovima (Slika 7). Sve analize su urađene u triplikatu. Određivanje interakcija metanolnih ekstrakata i antibiotika je zasnovano na srednjoj vrednosti i jednačini za određivanje efekata primene više lekova (Chou i Talalay, 1984). Tri efekta se izdvajaju: sinergistički, aditivni i antagonistički. Za njihovo kvantitativno određivanje koristi se koncept fracione inhibitorne koncentracije (FIC). U cilju procenjivanja tipa međusobne interakcije između dve komponente, FIC indeks se izračunava na sledeći način:

$$FIC = \frac{MIC(A)_{smeše}}{MIC(A)} + \frac{MIC(B)_{smeše}}{MIC(B)} + \frac{MIC(A)_{smeše} \times MIC(B)_{smeše}}{MIC(A) \times MIC(B)} \quad (1)$$

$$FIC = FIC_A + FIC_B + FIC_A \times FIC_B \quad (2)$$

pri čemu su MIC<sub>A</sub> i MIC<sub>B</sub> minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta i korišćenog antibiotika metronidazola. FIC indeks je izračunat uz pomoć „CalcuSyn“ (Biosoft), a rezultati su interpretirani na sledeći način: sinergistički efekat (<0,9) (Wyles i sar., 2007).



Slika 7. Šematski prikaz kombinovanja supstanci A i B u mikrotitar ploči

### 3.2.7 Antimikrobna aktivnost aglikona ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.

Aglikonske komponente su dobijene na sledeći način: 6,3 g metanolnog ekstrakta je pomešano sa  $100 \text{ cm}^3$  1 M HCl i ostavljeno je da stoji u normalnom sudu na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Nakon toga, izvršena je ekstrakcija u ekstrakcionom levku korišćenjem smeše hloroforma i acetona. Vodeni sloj koji je sadržao šećere je odstranjen, a gornji, koji je sadržao aglikonsku komponentu je uparen do suva. U ovom eksperimentu, korišćene su iste vrste bakterijskih sojeva (19 sojeva – 9 Gram (+) i 10 Gram (-)) kao i u testiranju antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata. Testirane koncentracije aglikona *M. alba* su od 942,05 do  $0,46 \text{ mg/cm}^3$ , a *M. nigra* od 971,6-0,48  $\text{mg/cm}^3$ .





**Slika 8. Ekstrakcija aglikonskog dela metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* u ekstrakcionom levku**

### **3.2.8 Izrada hidrogela**

Kako su ekstrakti plodova *M. alba* i *M. nigra* rastvorni u vodi, izrađeni su hidrogeli sa 2% svakog od ekstrakta pojedinačno. Sastav formulisanih fitopreparata za primenu na koži tipa hidrogela dat je u Tabeli 6. Hidrogeli su izrađivani na sledeći način: u laboratorijsku čašu je dodato 87,2 cm<sup>3</sup> prečišćene vode, dodat je ekstrakt ploda *M. alba*/*M. nigra* 2 g prethodno rastvoren u 10 cm<sup>3</sup> vode korišćenjem ultrazvučnog kupatila. Sadržaj čaše je potom mešan pri rotaciji propelerske mešalice Stirrer RW16 basic (IKA®WERKE, Germany) od 500 rpm u trajanju od 2 minuta. U čašu je zatim posuto sredstvo za geliranje Carbopol® Ultrez 10 (Centrohema, Srbija) i vršeno je dispergovanje u trajanju od 10 minuta pri 800 rpm. Zatim je dodato sredstvo za neutralizaciju i konzervans Dekaben C (2-fenoksietanol, butilparaben, metilparaben, etilparaben, propilparaben, izobutilparaben), Tehno-chem, Srbija).

**Tabela 6. Sastav hidrogela sa ekstraktom ploda *M. alba/M. nigra***

Sastojci	Količina (g)
Metanolni ekstrakt ploda <i>M. alba/M. nigra</i>	2,0
Carbopol®Ultrez 10	0,5
Dekaben C	0,15
TEA	0,15
Prečišćena voda	do 100,00

### 3.2.9 Izrada emulzija tipa U/V

Izrada emulzija tipa U/V, kao fitopreparata za lokalnu primenu na koži sa biljnim ekstraktom, vršena je prema tehnološkom rešenju (Miljković, 2016). Sastav formulisanih fitopreparata za primenu na koži tipa emulzija U/V dat je u Tabeli 7.

**Tabela 7. Sastav fitopreparata tipa emulzija sa ekstraktom ploda *M. alba/M. Nigra***

Sastojci	Količina (g)
Nejonska emulgjuća mast (MF 2008)	40,0
Propilenglikol	10,0
Prečišćena voda	48,0
Metanolni ekstrakt ploda <i>M. alba/M. nigra</i>	2,0

U/V emulzija je pripremljena dodavanjem vodene faze masnoj fazi uz kontinuirano mešanje. Uljana faza, koja se sastojala od belog pčelinjeg voska (Cera alba, extra pure, Centrohem, Srbija), lanolina (Adeps lanae, Sigma Aldrich, Srbija), polisorbata (Polysorbatum 60, Tehno-chem, Srbija), cetostearil alkohola (Alcohol cetylicus et stearylicus, extra pure, Centrohem, Srbija), tečnog parafina (Paraffinum liquidum, Swim d.o.o., Šabac, Srbija), vazelina (Vaselinum album, Tehno-chem, Srbija), zagrevana je u emajliranoj pateni korišćenjem vodenog kupatila do temperature od  $75^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Istovremeno, vodena faza, koja se sastojala od prečišćene vode (Aqua purificata), propilenglikola (Propylenglycolum, Tehno-chem, Srbija) je zagrevana do iste temperature. Nakon toga, vodenoj fazi je dodat ekstrakt ploda dudu rastvoren u delu prečišćene vode. Vodena faza je zatim dodata masnoj fazi uz kontinuirano mešanje. Nadoknađena je voda koja je u toku izrade izgubljena isparavanjem.

Emulzija je adekvatno konzervisana korišćenjem konzervansa (Dekaben C (2-fenoksietanol, butilparaben, metilparaben, etilparaben, propilparaben, izobutilparaben), Tehno-chem, Srbija) koji je dodat na temperaturi nižoj od 40 °C i potom mešana do hlađenja. Napravljeni uzorci su ostavljeni da stoje u adekvatnim uslovima (pri sobnoj temperaturi i zaštićeno od svetla) u trajanju od nedelju dana radi stabilizacije sistema, a nakon toga se pristupilo njihovom testiranju.

### **3.2.10 Reološka merenja**

Reološka merenja su vršena korišćenjem uređaja cone-plate Konus CP-52, Brookfield, DV-III Ultra, na 20 °C, uređaj koji može da se programira. Korišćen je sistem konusa i ploče (dijametar 50 mm, ugao 1°, razmak 50 µm, 10 s pauze) sa protokom uzoraka od 0,030 mm. Tokom kontinualnog testiranja, primenjena je stopa smicanja (stopa smicanja 1 s<sup>-1</sup> i nazad na početnu tačku, svaka etapa je trajala 100 s).

### **3.2.11 Fizička stabilnost formulacija**

U cilju preliminarne procene fizičke stabilnosti vršena su merenja vrednosti pH i električne provodljivosti formulisanih fitoprepara tipa emulzija U/V 7, 45 i 90 dana nakon izrade, korišćenjem pH-metra (HI 8417, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) i konduktometra HANNA Hi 98311 Hanna Instruments. Uzorci su čuvani 3 meseca u primarnoj ambalaži (plastične kutujice) pri sobnoj temperaturi.

### **3.2.12 Efekat U/V emulzija na kožu ispitanika**

Merenja koja spadaju u tehnike kvantifikacije biofizičkih parametara kože – neinvazivna biofizička merenja, eritema indeks (EI) vršena su korišćenjem sonde Mexameter R MX 18. Električna kapacitivnost (EC) kao mera hidratacije SC-a merena je korišćenjem Corneometer R CM 825, a TEWL je meren korišćenjem sonde Tewameter<sup>®</sup>TM 210, pH na površini kože određivan je sondom pH-meter 900. Sve sonde su deo uređaja Multi Probe Adapter MPA R9 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Germany).



**Slika 9. Multi Probe Adapter MPA R9 za neinvazivna biofizička merenja**

**Ispitanici.** *In vivo* merenja su vršena u skladu sa Helsinškom Deklaracijom, uz dobrovoljni pisani pristanak ispitanika koji su obavešteni o toku i ishodima istraživanja. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog Komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, broj 12-2307-2/4. Ukupno 10 dobrovoljaca (8 ženskog i 2 muškog pola; starosti  $20,9 \pm 1,1$  godine) bez vidljivih poremećaja kože je učestvovalo u istraživanju. Nisu koristili proizvode za negu kože za vreme trajanja studije kao ni nedelju dana pre početka studije. Kriterijum za isključivanje iz studije bio je korišćenje lekova sa lokalnim ili sistemskim dejstvom. Svi ispitanici su zadovoljavali ovaj kriterijum. Svi ispitanicu su bili zdravi i bez utvrđenih alergija na bilo koji od sastojaka uzoraka. Pre svakog merenja, aklimatizovali su se u trajanju od 30 minuta u prostoriji u kojoj su potom vršena merenja pod kontrolisanim uslovima ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $50 \pm 5\%$  relativna vlažnost).

**Studija bezbednosti (jednodnevna studija).** Svi napravljeni uzorci hidrogela i emulzija su najpre testirani “patch testom” na unutrašnjoj strani podlaktice svakog ispitanika kako bi se ustanovilo postojanje bilo kakve moguće reakcije na kožu od strane napravljenih formulacija (Akhat i sar., 2012). Izvršeno je merenje parametara (eritema indeks i TEWL) pre početka studije (bazalne vrednosti). Nakon što su uzorci bili u kontaktu sa kožom za koju su bili prilepljeni flasterom u trajanju od 24 h, flasteri su skinuti. Mesta pod flasterima su isprana mlakom vodom i osušena nežnim tapkanjem papirnim ubrusom. Nakon 60 minuta od ispiranja (drugog dana eksperimenta) ponovo su izmereni parametri kao pre nanošenja uzoraka.

Uzorci su nanošeni na sledeći način: unutrašnja strana leve i desne podlaktice je tretirana hidrogelima i emulzijama sa ekstraktom ploda *M. alba* i *M. nigra* korišćenjem

precizno definisanog i označenog kartonskog šablona (sa dva prazna mesta u obliku pravougaonika, svako površine 16 cm<sup>2</sup>). Postojala su i dva kontrolna mesta. Jedno mesto koje nije bilo tretirano pod okluzijom (UCO) – na desnoj ruci, i mesto bez okluzije (UCW) – na levoj ruci. Uzorci su nanešeni u količini od 0,016 g cm<sup>-2</sup>, razmazani ravnomerno higijenskom gumenom rukavicom, i odmah poklopljeni korišćenjem Parafilm® (American National Can. Co., Chicago, Illinois, USA), a zatim lepljivim pamučnim flasterom Sensifix® (Galenika, Srbija). Svi parametri su mereni u skladu sa smernicama (Pinagoda i sar., 1990; Berardesca i sar., 1997).

**Dizajn eksperimenta (protokol testa) sedmodnevne studije.** Emulzije su potom bile testirane i u sedmodnevnoj studiji. Efekti aplikacije proučavanih emulzija su testirani na koži 10 ispitanika – 8 ženskog i 2 muškog pola, (starosti 20,9 ± 1,1 godine; trajanje studije 7 dana) na koži unutrašnje strane podlaktice. Najpre je eksperimentalno indukovana iritacija kože uz merenja relevantnih biofizičkih parametara (Pinagoda i sar., 1990; Tupker i sar., 1997). Koža je zatim bila tretirana 7 dana uzorcima emulzija koje su napravljene u cilju procene efekata emulzija na veštački iritiranu kožu. Efekti su mereni na opisan način.

Količina od 75 µl rastvora za izazivanje iritacije (6 % vodeni rastvor natrijum-lauril-sulfata, NaLS), koji je prethodno pripremljen, je aplikovan na 5 mesta obe podlaktice. Aplikacija je urađena korišćenjem filter papira (9 cm<sup>2</sup>) tako što je on natopljen rastvom NaLS, a zatim su mesta pokrivena korišćenjem Parafilm®-a (American National Can. Co., Chicago, Illinois, USA) i zatim učvršćena lepljivim pamučnim flasterom Sensifix® (Galenika, Srbija). Početne vrednosti su izmerene pre aplikacije i 24 h nakon što je uklonjena okluzija sa rastvorom za izazivanje iritacije koja je držana 6 h. Po uklanjanju okluzije, koža je isprana mlakom vodom i osušena nežnim tapkanjem papirnim ubrusom. Zatim su uzorci testiranih formulacija označeni (MNG – hidrogel sa ekstraktom *M. nigra*; MAG – hidrogel sa ekstraktom *M. alba*; MNE – emulzija sa ekstraktom *M. nigra*; MAE – emulzija sa ekstraktom *M. alba*). Ispitanicima su podeljeni ovi uzorci za aplikaciju i oni su dobili jasna uputstva u pogledu količine (veličina zrna graška), učestalosti, vrste i mesta uzorka i načina aplikacije testiranih uzoraka (ujutru i uveče po jednom, u tankom sloju). I na levoj i na desnoj podlaktici obe ruke ostavljeno je po jedno mesto kao kontrola; na levoj podlaktici kao mesto na kome je izvršena iritacija pod okluzijom (UCO), na desnoj podlaktici kao kontrola pod okluzijom bez iritacije (UCW). Merenja parametara EC, EI, pH i TEWL su izvršena pre i nakon aplikacije rastvoar NaLS, kao i nakon 3, 4 i 7 dana tretmana.

### 3.2.13 Statistička obrada podataka

Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. *In vivo* izmereni parametri (u studiji za testiranje bezbednosnog profila) su izraženi kao apsolutna promena u odnosu na vrednosti pre nanošenja testiranih uzoraka (%), a rezultati su poređeni sa vrednostima za podlogu kao i sa obe kontrole (UCO i UCW). Vrednosti izmerenih parametara kože nakon iritacije poređeni su sa vrednostima pre iritacije; vrednosti parametara nakon 3, 4 i 7 dana od aplikacije emulzija su poređeni sa odgovarajućim vrednostima izmerenim neposredno nakon iritacije kože rastvorom NaLS. Eventualno odstupanje raspodele podataka od normalne raspodele je testirano testom Kolmogorov Smirnova. Utvrđeno je da nigde ne postoji značajno odstupanje od normalne raspodele. Razlike u prosečnim vrednostima između uzoraka su testirane jednofaktorskom analizom varijansi korišćenjem one-way ANOVA, a kao *post hoc* analiza urađen je LSD test. Prihvatana je razlika kao statistički značajna za  $p < 0,05$ .

#### 4. REZULTATI I DISKUSIJA

##### 4.1 Analiza sadržaja makro- i mikroelemenata u listovima i ekstraktima ploda vrsta roda *Morus* L.

Sadržaj makro- i mikroelemenata u listovima i ekstraktima plodova *M. alba* i *M. nigra* određivan je metodom ICP-OES. Dobijeni rezultati analize sadržaja elemenata su prikazani u Tabelama 8 i 9.

**Tabela 8. Sadržaj makro- i mikroelemenata u listu i ekstraktu ploda *M. alba***

Element	<i>Morus alba</i> L.			
	List		Ekstrakt	
Makroelementi	C <sub>SR</sub> ±SD	RSD %	C <sub>SR</sub> ±SD	RSD %
Ca	14,4±0,2 mg/g	1,39	3,26±0,03 mg/g	0,92
Mg	0,81±0,01 mg/g	1,23	0,89±0,01 mg/g	1,12
Na	0,0199±0,0002 mg/g	1,01	0,0081±0,0001 mg/g	1,23
K	8,2±0,2 mg/g	2,44	13,38±0,07 mg/g	0,52
Mikroelementi				
B	0,0399±0,0005 mg/g	1,25	0,0224±0,0001 mg/g	0,45
Co	0,000019±0,00001 mg/g	5,26	0,000022±0,00001 mg/g	4,55
Cr	0,21±0,1 µg/g	4,76	0,3±0,01 µg/g	3,33
Cu	0,0061±0,0001 mg/g	1,64	0,0051±0,0001 mg/g	1,96
Fe	0,0589±0,0004 mg/g	0,68	0,0044±0,0001 mg/g	2,27
Mn	0,0148±0,0004 mg/g	2,70	0,0147±0,0002 mg/g	1,36
Ni	0,51±0,02 µg/g	3,92	1,81±0,05 µg/g	2,76
Se	0,18±0,01 µg/g	5,56	0,59±0,00003 µg/g	5,08
Si	3,69±0,05 mg/g	1,36	0,0091±0,0001 mg/g	1,09
Zn	0,0151±0,0003 mg/g	1,99	0,0116±0,0001 mg/g	0,86
Al	0,0462±0,0005 mg/g	1,08	0,0171±0,0004 mg/g	2,34
As	1,02± 0,01 µg/g	0,98	5,0±0,1 µg/g	2,0
Cd	/	/	0,023±0,001 µg/g	4,35
Pb	0,096±0,04 µg/g	4,17	0,029±0,01 µg/g	3,45
P	2,79±0,03 mg/g	1,08	3,68±0,01 mg/g	0,27
Ba	0,0136±0,0002 mg/g	1,47	0,0139±0,0001 mg/g	0,72
V	1,21 µg/g	4,13	2,1 µg/g	4,76

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da su u listu *M. alba* od makroelemenata najzastupljeniji Ca (14,4 mg/g) i K (8,2 mg/g), a od mikroelemenata Si (3,7 mg/g) i P (2,8 mg/g), dok su ostali registrovani elementi prisutni u znatno manjoj količini. Sadržaj makroelemenata u listu *M. alba* raste sledećim redosledom: Na < Mg < K < Ca, dok sadržaj mikroelemenata u listu *M. alba* raste u nizu: Co < Pb < Se < Cr < Ni < As < V < Cu < Ba < Mn < Zn < B < Al < Fe < P < Si. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenih od strane drugih autora koji su analizirali biljni materijal vrsta roda *Morus* na području Srbije (Radojković, 2012).

U ekstraktu ploda *M. alba* je obrnuta situacija po pitanju sadržaja elemenata, tako da je od makroelemenata najzastupljeniji K (13,4 mg/g) pa Ca (3,3 mg/g), a od mikroelemenata P (3,7 mg/g), dok su ostali registrovani elementi prisutni u znatno manjoj količini. Sadržaj makroelemenata u ekstraktu ploda *M. alba* raste sledećim redosledom: Na < Mg < Ca < K, dok sadržaj mikroelemenata u ekstraktu ploda *M. alba* raste u nizu: Co < Cd < Pb < Cr < Se < Ni < V < Fe < As < Cu < Si < Zn < Ba < Mn < Al < B < P.

**Tabela 9. Sadržaj makro- i mikroelemenata u listu i ekstraktu ploda *M. nigra***

Element	<i>Morus Nigra</i> L.			
	List		Ekstrakt	
Makroelementi	C <sub>SR</sub> ±SD	RSD %	C <sub>SR</sub> ±SD	RSD %
Ca	27,4±0,3mg/g	1,09	3,86±0,09 mg/g	1,55
Mg	1,67±0,01 mg/g	0,60	0,97±0,03 mg/g	3,01
Na	0,0112±0,0001 mg/g	0,89	0,0053±0,0001 mg/g	1,89
K	3,35±0,04 mg/g	1,19	10,0±0,4 mg/g	4,0
Mikroelementi				
B	0,0541±0,0007 mg/g	1,29	0,0141±0,0001 mg/g	0,71
Co	0,000017±0,00001 mg/g	5,88	0,000019±0,00001 mg/g	5,26
Cr	0,34±0,03 µg/g	8,82	0,28±0,01 µg/g	3,57
Cu	0,0074±0,0001 mg/g	1,35	0,0069±0,0002 mg/g	2,90
Fe	0,154±0,001 mg/g	0,65	0,0039±0,0001 mg/g	2,56
Mn	0,0433±0,0006 mg/g	1,39	0,0152±0,0005 mg/g	3,29
Ni	0,71±0,04 µg/g	5,63	1,12±0,02 µg/g	1,79
Se	0,28±0,01 µg/g	3,57	0,43±0,02 µg/g	4,65
Si	9,1±0,1 mg/g	1,10	0,0052±0,0001 mg/g	1,92
Zn	0,0245±0,0004 mg/g	1,63	0,0159±0,0003 mg/g	1,89



**Tabela 9. –nastavak–**

Al	0,1265±0,0008 mg/g	0,63	0,0132±0,0005 mg/g	3,79
As	/	/	0,41±0,02 µg/g	4,88
Cd	/	/	/	/
Pb	0,024±0,1 µg/g	4,17	0,049±0,02 µg/g	4,08
P	1,93±0,03 mg/g	1,55	3,74±0,01 mg/g	0,27
Ba	0,0251±0,0002 mg/g	0,80	0,0064±0,0001 mg/g	1,56
V	1,32 µg/g	6,06	1,9 µg/g	5,26

Slična zapažanja su i kod analize dobijenih rezultata sadržaja elemenata u uzorcima *M. nigra*. Može se uočiti da su u listu *M. nigra* od makroelemenata najzastupljeniji Ca (27,4 mg/mg) i K (3,4 mg/g), a od mikroelemenata Si (9,1 mg/g) i P (1,9 mg/g), dok su ostali registrovani elementi prisutni u znatno manjoj količini. Sadržaj makroelemenata u listu *M. nigra* raste sledećim redosledom: Na < Mg < K < Ca, dok sadržaj mikroelemenata u listu *M. nigra* raste u nizu: Co < Pb < Se < Cr < Ni < V < Cu < Zn < Ba < Mn < B < Al < Fe < P < Si.

U ekstraktu ploda *M. nigra* je obrnuta situacija po pitanju sadržaja elemenata, tako da je od makroelemenata najzastupljeniji K (10,0 mg/g) pa Ca (3,9 mg/g), a od mikroelemenata P (3,8 mg/g), dok su ostali registrovani elementi prisutni u znatno manjoj količini. Sadržaj makroelemenata u ekstraktu ploda *M. nigra* raste sledećim redosledom: Na < Mg < Ca < K, dok sadržaj elemenata u ekstraktu ploda *M. nigra* raste u nizu: Co < Pb < Cr < As < Se < Ni < V < Fe < Si < Ba < Cu < Al < B < Mn < Zn < P.

Međusobnim upoređivanjem rezultata dobijenih za uzorke *M. alba* i *M. nigra* može se konstatovati da list *M. nigra* sadrži duplo više Ca i Si, dok list *M. alba* ima znatno veći sadržaj K i P. Po pitanju sadržaja elemenata, ekstrakti plodova *M. alba* i *M. nigra* ne pokazuju neku znatnu razliku. Razlika u hemijskom aspektu se očekuje sa aspekta analize prisutnih organskih jedinjenja.

Sa druge strane, poznato je da su teški metali, naročito Cd i Pb, vrlo štetni elementi za ljudski organizam, posebno kada su zastupljeni u visokim koncentracijama (Hamurcu, 2010). Na povećani sadržaj teških metala u voću i drugim jestivim delovima biljaka najviše utiču antropogeni faktori, tj. faktori ljudske aktivnosti kao što su izduvni gasovi (pored puteva), industrijski otpad i otpadne vode (Ma i sar., 2013). Prema Evropskim standardima, maksimalna dozvoljena koncentracija Cd u voću i povrću iznosi 0,05 mg/kg (European Commission, 2006). U ovom konkretnom slučaju, analizirani ekstrakti *M. alba* i *M. nigra* su bezbedni za upotrebu obzirom da ekstrakt ploda *M. alba* sadrži Cd u koncentraciji od 0,023

mg/kg (ispod maksimalne dozvoljene koncentracije – MDK), a da Cd nije registrovan kod ekstrakta ploda *M. nigra*. Po pitanju sadržaja Pb, maksimalna dozvoljena koncentracija u voću i povrću je 0,2 mg/kg (European Commission, 2006). Kod analiziranog biljnog materijala duda najveći sadržaj Pb (od 0,096 mg/kg) je registrovan u uzorku lista *M. alba*. Imajući u vidu ovaj propis, kao i prirodno stanište biljnog materijala, može se sa sigurnošću reći da su i plodovi i lišće, kako *M. alba*, tako i *M. nigra*, bezbedni za upotrebu sa aspekta sadržaja teških metala.

Članom 105. Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, određen je maksimalni dozvoljeni sadržaj elemenata koje kozmetički proizvodi koji dolaze u kontakt sa kožom mogu da otpuste. Po Pravilniku koji je na snazi, kozmetički proizvod koji se nalazi na tržištu može maksimalno da otpusti iz 1 kg proizvoda: As 5 mg, Cd 5 mg, Hg 10 mg, Pb 30 mg, Cr 50 mg, Ni 50mg. Znajući ovu odredbu, kao i količine navedenih elementa koji se nalaze u ekstraktima ploda duda koji su korišćeni za izradu fitopreparata za primenu na kožu (opisanih u narednom delu istraživanja), od formulisanih fitopreparata za lokalnu primenu na koži se može očekivati da ispunjavaju zakonsku odredbu.

#### **4.2 Antioksidativna aktivnost ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.**

Poznato je da se antioksidativna aktivnost, odnosno kapacitet hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity-RSC), može odrediti pomoću sledeće jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = (1 - A_{\text{uzorak}}/A_{\text{blank}}) \cdot 100 \quad (3)$$

gde su:  $A_{\text{blank}}$  – apsorbanca kontrolnog rastvora ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> DPPH u metanolu);  $A_{\text{uzorak}}$  – apsorbanca uzorka

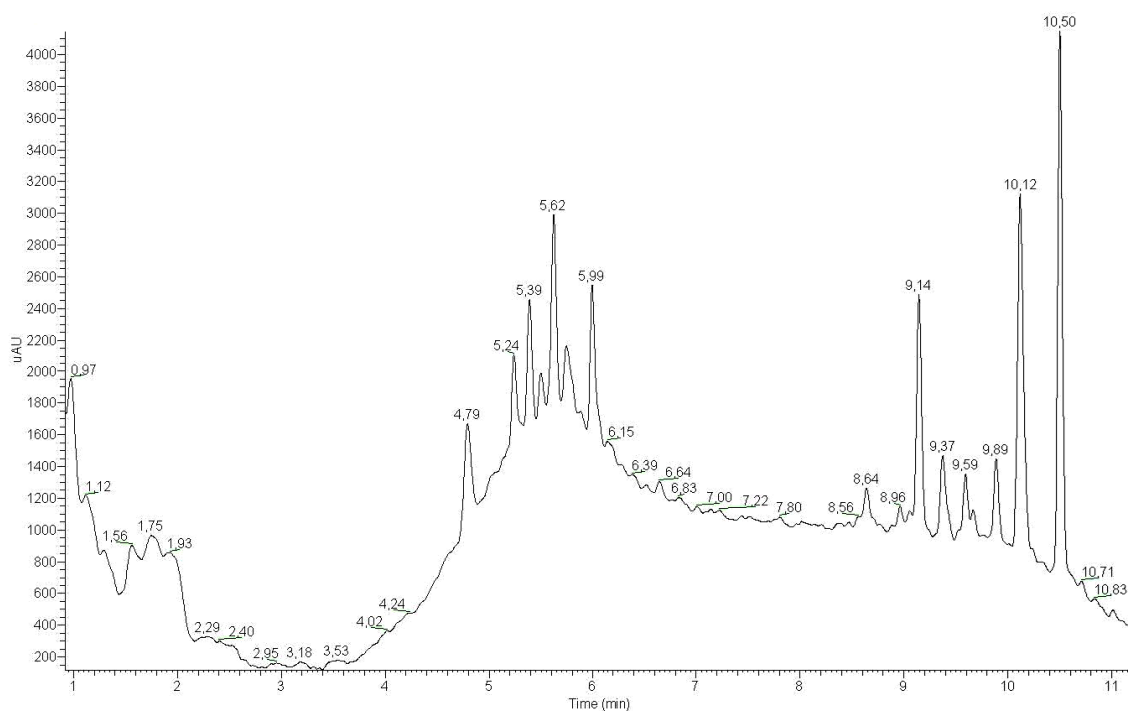
Iz vrednosti dobijenih za RSC određuju se IC50 vrednosti primenom regresione analize. U slučaju analiziranih ekstrakata vrsta roda *Morus*, određene su IC50 vrednosti od 0,048 mg/cm<sup>3</sup> za suvi ekstrakt ploda *M. alba* do 0,059 mg/cm<sup>3</sup> za ekstrakt ploda *M. nigra*. Dobijene vrednosti ukazuju na to da ekstrakti plodova imaju dobru sposobnost neutralizacije DPPH• radikala. Na osnovu IC50 vrednosti evidentno je da ekstrakti plodova obe analizirane vrste roda *Morus* pokazuju antiradikalnu aktivnost koja je manja od komercijalno korišćenih BHT i BHA čije su vrednosti 0,0134 mg/cm<sup>3</sup> i 0,0087 mg/cm<sup>3</sup> respektivno.

Istraživanja drugih autora su pokazala i da mehanizam reakcije antioksidanasa i DPPH• zavisi od strukture antioksidanasa (Bondet i sar., 1997). Tako, na antiradikalnu aktivnost fenolnih jedinjenja uticaj imaju broj i položaj hidroksilnih grupa (Cotelle, 2001;

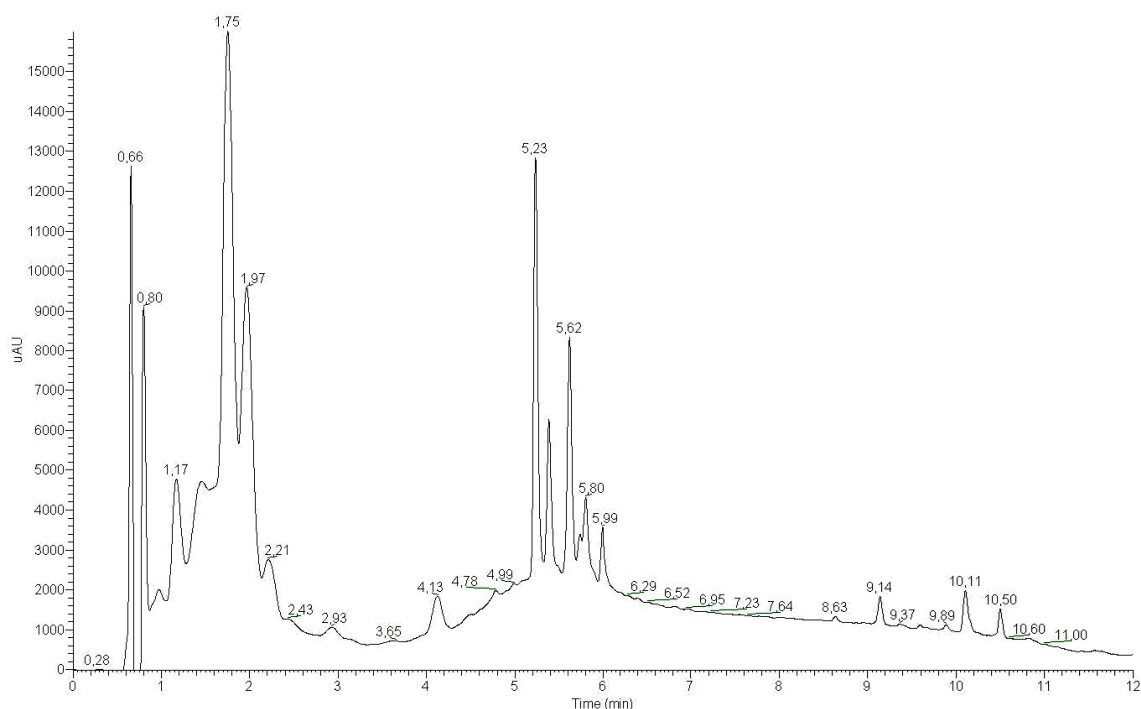
Heim i sar., 2002). Kafena kiselina, prisutna fenolna kiselina u ekstraktima duda, ispoljava veću antiradikalnu aktivnost na DPPH• u poređenju sa, npr., ferulnom i *p*-kumarinskom kiselinom, obzirom na njihovu strukturu, koja omogućava bolju stabilizaciju fenoksil radikala (Tumbas i sar., 2012).

### 4.3 HPLC analiza ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.

U cilju utvrđivanja kvalitativnog sastava metanolnih ekstrakata ploda vrsta roda *Morus* primenjavana je HPLC metoda. Hromatogrami HPLC analize su prikazani na Slici 10. i Slici 11. Sadržaji identifikovanih jedinjenja u ekstraktima istraživanih *Morus* vrsta prikazani su u Tabelama 10-13. Identifikovano je ukupno 18 različitih jedinjenja.



Slika 10. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta ploda *Morus alba* L.



Slika 11. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta ploda *Morus nigra* L.

Tabela 10. Rezultati analize ekstrakata plodova *Morus alba* i *Morus nigra* po metodi-1 u negativnom režimu rada ESI-MS detektora

Pik, r.br.	$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	Komponenta
1	0,70	-	179	135 (100%)	KAFENA KISELINA (Carrazone i sar., 2013)
2	0,80	-	191	173, 111 (100%)	HININSKA KISELINA (Pacifico i sar., 2015)
3	1,75	326, 290	353	-	HLOOROGENSKA KISELINA, IZOMER1(5-CQA) (Willems i sar., 2016)
4	1,93		353	-	HLOOROGENSKA KISELINA, IZOMER2 (4-CQA) (Willems i sar., 2016)
5	3,15	280	565	519 (100%)	-
6	4,79	316	447	401, 285	-
7	5,24	355, 260	609	301 (100%), 271, 255, 227, 193, 173	RUTIN (Chen i sar., 2015)
8	5,39	355, 258	463	301 (100%), 255, 179	KVERCETIN-GLIKOZID (Saldanha i sar., 2013)
9	5,62	355, 259	505	300/301 (100%), 271, 243, 151	KVERCETIN-ACETILGLIKOZID (Piao i sar., 2009)

**Tabela 10. –nastavak–**

10	5,70	-	593	285 (100%), 221, 167	-
11	5,74	340, 290	447	327, 285 (100%), 255	LUTEOLIN-GLIKOZID (Pikulski i sar., 2003)
12	5,99	347, 246	489	-	-
13	8,64	337, 302	-	-	-
14	9,14	319, 230	293	-	-
15	9,37	322, 285		-	-
16	9,59	387, 312	339	161 (100%), 321, 177	-
17	9,89	309, 278	595	549 (100%), 315, 279 (90%), 241, 223	-
18	10,12	337, 305	323	203 (100%), 159, 119	-
19	10,50	335, 321, 298	647	629, 649 (100%), 451, 359, 227	-
20*	1,16	286, 518	447	287 (100%)	CIJANIDIN- GALAKTOZID (Giomaro i sar., 2014)
21*	1,43	281, 515	447	285 (100%)	CIJANIDIN-GLUKOZID (Gouyea i sar., 2012)
22*	2,20	350	465	303, 285 (100%), 241	-

\*Odnosi se samo na ekstrakt *M. nigra***Tabela 11. Rezultati analize ekstrakta ploda *M. nigra* po metodi-1 u pozitivnom režimu rada ESI-MS detektora**

Pik, r.br.	t <sub>R</sub> , min	λ <sub>max</sub>	m/z [M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	Komponenta
20	1,16	286, 518	449	287 (100%)	CIJANIDIN- GALAKTOZID
21	1,43	281, 515	449	287 (100%)	CIJANIDIN- GLUKOZID
22	2,20	350	467	305, 287 (100%)	-

**Tabela 12. Rezultati analize ekstrakata plodova *M. alba* i *M. nigra* po metodi-2 u negativnom režimu rada ESI-MS detektora**

Pik, r.br.	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	m/z [M- H] <sup>-</sup>	MS/MS	Komponenta
1	0,70	-	179	135 (100%)	KAFENA KISELINA (Carrazone i sar., 2013)

**Tabela 12. –nastavak–**

2	0,80	-	191	173, 111 (100%)	HININSKA KISELINA (Pacifico i sar., 2015)
3	0,87	-	133	115 (100%)	JABUČNA KISELINA (Fernandez-Fernandez i sar., 2010)
4	1,70	302, 257	315	-	3,5- DIHIDROKSIBENZOEVA KISELINA- <i>O</i> - GALAKTOZID (Han i sar., 2008)
5	1,85	299, 257	315	-	3,5- DIHIDROKSIBENZOEVA KISELINA- <i>O</i> -GLUKOZID (Han i sar., 2008)
6	2,44	326	325	-	DERIVAT HLOOROGENSKE KISELINE
7	3,52	280	-	-	-
8	3,59	280	-	-	-
9	4,73	319, 294	515	353, 179	DIKAFEOL-HININSKA KISELINA, IZOMER 1 (Carrazone i sar., 2013)
10	5,26	326, 296	353	191 (100%)	HLOOROGENSKA KISELINA, IZOMER 1 (Willems i sar., 2016)
11	5,69	327, 297	353	191, 179, 173 (100%), 135	HLOOROGENSKA KISELINA, IZOMER 2 (Willems i sar., 2016)
12	5,78	303	531	484 (100%)	-
13	6,08	315, 291	499	-	-
14	6,20	314, 283	447	401 (100%)	-
15	6,38	306, 266	499	-	-
16	6,57	328, 241	563	544, 517 (100%), 494, 424	-
17	6,84	324, 260	565	519 (100%), 496	-
18	6,97	339	539	491 (100%)	-
19	7,24	291, 227	-	-	-
20	7,63	313	-	-	-
21	7,92	265	-	-	-
22	8,45	356, 259	515	353 (100%), 317, 243	DIKAFEOL-HININSKA KISELINA, IZOMER 2 (Chen i sar., 2015)
23	8,72	356, 259	463	301 (100%), 271, 151	KVERCETIN-GLIKOZID (Silva i sar., 2005)
24			609	301 (100%), 271, 255, 179	RUTIN (Chen i sar., 2015)
25	8,92	306	549	-	

**Tabela 12. –nastavak–**

26	9,11	357,259	505	463, 301 (100%), 271, 179	KVERCETIN- ACETILGLIKOZID (Piao i sar., 2009)
	9,78	347,267	447	285 (100%), 269, 255, 227, 243	LUTEOLIN-GLIKOZID (Ibrahim i sar., 2015)
28	10,30	345, 266	561	-	-
29	13,76	391	339	321, 177, 161 (100%)	-
30	14,38	331, 302	649	631, 471 (100%), 453, 361, 227	-
31	14,85	334, 320, 294	647	629, 469 (100%), 451, 359, 227	-
32*	6,23	281, ≈519	447	299, 285 (100%)	CIJANIDIN-3- <i>O</i> - GALAKTOZID (Giomaro i sar., 2014).
33*	6,30	281, ≈519	447	299, 285 (100%)	CIANIDIN-GLUKOZID (Yang i sar., 2015).

\*Odnosi se samo na ekstrakt *M. nigra*

**Tabela 13. Rezultati analize ekstrakta ploda *M. nigra* po metodi-2 u pozitivnom režimu rada**

**ESI-MS detektora**

Pik, r.br.	t <sub>R</sub> , min	λ <sub>max</sub>	m/z [M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	Komponenta
32	6,23	281, ≈519	449	287 (100%)	CIJANIDIN- GALAKTOZID (Giomaro i sar., 2014)
33	6,30	281, ≈519	449	287 (100%)	CIJANIDIN- GLUKOZID (Gouyea i sar., 2012)
34	6.54	281, ≈519	595	449, 287 (100%)	CIJANIDIN- GLUKOZID- RAMNOZID (Girones- Vilaplanaa i sar., 2014)
35	6,80	281, ≈519	433	-	KEMPFEROL- GLIKOZID (Lopez- Lutz i sar., 2010).

Prisustvo fenolnih kiselina, hlorogenske i kafene je detektovano u oba uzorka. Takav rezultat je zabeležen i od strane drugih autora autora koji su vršili HPLC analizu ekstrakta ploda duda sa teritorije Srbije, s tim što njihovo prisustvo nije bilo potvrđeno u ekstraktu *M. nigra* sa teritorije jugoistočne Srbije. Neohlorogenska i kriptohlorogenska kiselina nisu

detektovane u uzorcima analiziranim u ovom radu kao ni u uzorcima sa teritorije severne Srbije (Radojković, 2012; Dimitrijević, 2014).

Prisustvo flavonoida kvercetin-3-*O*-rutinozida ili kvercetin 3-*O*-glukozida je potvrđeno i od strane autora koji su takođe koristili ovu metodu analize za metanolni ekstrakt ploda duda iz jugoistočne Srbije (Dimitrijević, 2014). Prisustvo kvercetin-3-*O*-ramnozida nije potvrđeno u uzorcima koji su bili analizirani, dok je njegovo prisustvo potvrđeno samo u ekstraktu *M. nigra* od strane drugih autora. Kempferol-glikozid je bio prisutan samo u ekstraktu *M. nigra*, dok je njegovo prisustvo zabeleženo samo u ekstraktu *M. alba* i to u obliku kempferol-3-*O*-rutinozid. Kvercetin je bio prisutan u oba uzorka ekstrakata, za razliku od uzorka ekstrakta ploda duda iz severne Srbije u kome nije detektovan, i uzorka iz jugoistočne Srbije gde je bio prisutan samo u ekstraktu *M. nigra*. Rutin je bio prisutan u oba ekstrakta, dok je u uzorku duda iz severne Srbije bio prisutan samo u ekstraktu *M. nigra* (Radojković, 2012; Dimitrijević, 2014).

Prisustvo antocijana: cijanidin-3-*O*-glukozida ili cijanidin-3-*O*-rutinozida ili cijanidin-3-*O*-galaktozida je za razliku od uzorka iz severne Srbije – gde nije potvrđeno, i drugog uzorka iz jugoistočne Srbije – gde su bili prisutni samo u ekstraktu *M. nigra*, potvrđeno u oba ekstrakta (Dimitrijević, 2014).

Hininska kiselina, izomeri hlorogenske kiseline, luteolin-glukozid, jabučna kiselina 3,5-dihidroksibenzoeva kiselina-*O*-galaktozid ili glukozid, dikafeoil-hininska kiselina i njeni izomeri, nisu identifikovani od strane autora koji su koristili istu metodu analize metanolnih ekstrakata ploda duda sa teritorije Srbije. Istraživanja drugih autora su pokazala da klimatski uslovi, tip zemljišta, broj sunčanih sati u godini, prosečna temperatura i slično, bitno utiču na polifenolni sastav bobičastog voća (Dixon i Paiva, 1995; Geraspopoulos i Stavroulakis, 1997; Zadernowski i sar., 2005)

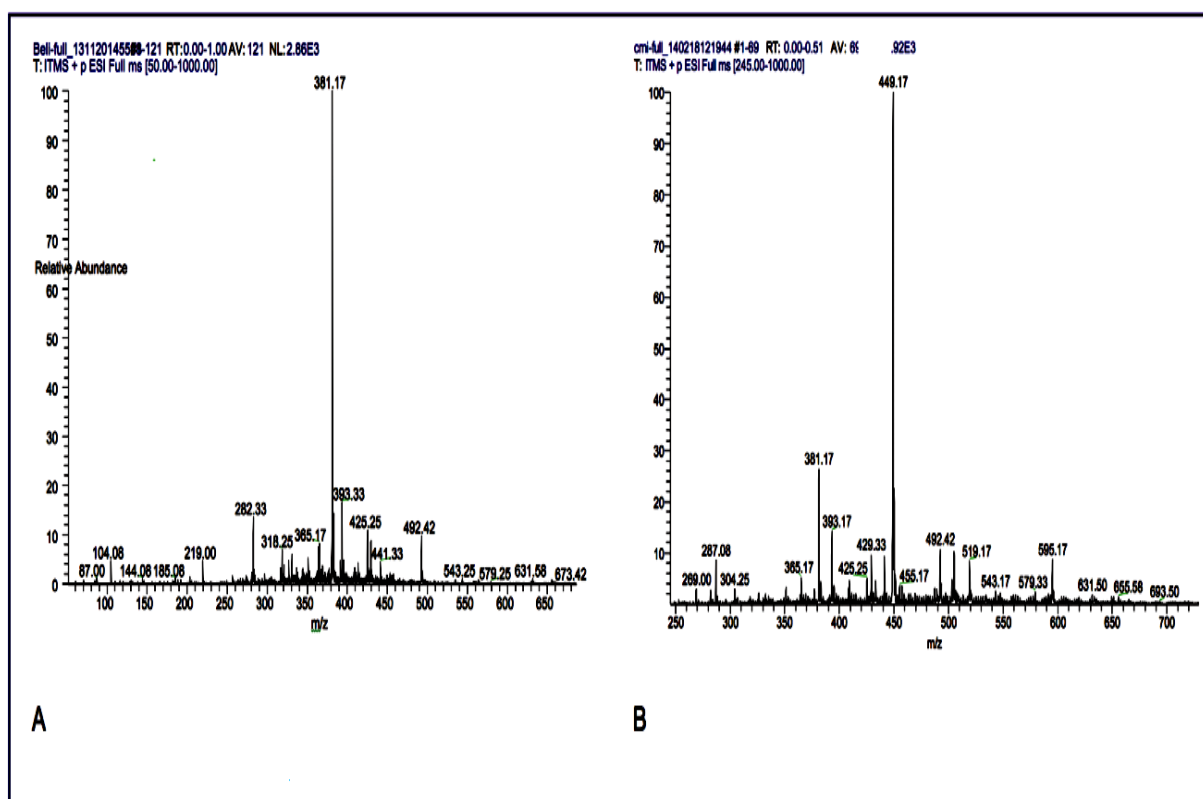
Uopšteno, znajući da kafena kiselina, hlorogenska kiselina, rutin i cijanidin-*O*- $\beta$ -glukozid poseduju pozitivne efekte, kao što su: antiinflamatorno, antioksidativno, protetkivno protiv UVB indukovanog eritema, anti-age efekat, hidrirajući, emolijentni, smanjuju znakove starenja kože, pomažu obnavljanje strukture i vlažnosti kože, koji su potvrđeni *in vitro* i *in vivo* uslovima, sadržaj ovih jedinjenja u ekstraktima govori o tome da plod duda predstavlja dobar izvor biološki aktivnih jedinjenja (Sato i sar., 2011; Russo i sar., 2000; Ng i sar., 2000). Sve ovo nedvosmisleno ukazuje da plod duda, njegov metanolni ekstrakt, predstavlja sirovinu koja se može koristiti u izradi fitopreparata namenjenih za lokalnu primenu na koži, u svrhu nege i održavanja.



#### 4.4 Masena spektrometrija ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.

Analiza masenom spektrometrijom je pokazala prisustvo većeg broja komponenti prisutnih u analiziranim ekstraktima duda u poređenju sa sličnim istraživanjima koja su ranije objavljena (Hye i sar., 2009; Trakoontivakorn, 2001; Du i sar., 2008). U ovom slučaju su detektovane istie komponente u ekstraktima *M. alba* i *M. nigra*: hininska kiselina, galna kiselina, apigenin, naringenin, katehin, kvercetin, miricetin, hlorogenske kiseline, cijanidin-3-*O*-arabinozid, peonidin-3-*O*-arabinozid, delphinidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid ili cijanidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid ili peonidin-3-*O*-galaktozid ili malvidin-3-*O*-arabinozid, delphinidin-3-*O*-glukozid ili delphinidin-3-*O*-galaktozid, petunidin-3-*O*-glukozid ili petunidin-3-*O*-galaktozid ili petunidin-3-*O*-arabinozid, malvidin-3-*O*-glukozid ili malvidin-3-*O*-galactozid, rutin, luteolin i možda 4-hidroksipanduratin A, i 10-formil-7,8-dihidrofolne kiseline (10-FDHFA). Identifikovane komponente su potvrđene korišćenjem referentnih spektara standarda u DMSO-d<sub>6</sub> (TMS kao interni standard). Dobijeni MS spektri su dati u Prilogu.

Kompletni maseni spektri metanolnih ekstrakata *Morus alba* L. i *Morus nigra* L. su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Kompletni maseni spektri metanolnih ekstrakata ploda duda A) *Morus alba* L.  
B) *Morus nigra* L.

Karakteristično je da je kod MS spektra ekstrakta ploda *M. alba* uočljivo prisustvo veoma intenzivnog pika pri  $m/z=381$  koji predstavlja osnovni molekulski jon koji potiče od najstabilnijeg fragmenta. Isti pik, manjeg intenziteta, je registrovan i kod ekstrakta ploda *M. nigra*. To ukazuje na prisustvo derivata hininske kiseline ( $[M-H]^+(m/z)=381$ , čiji se MS fragmenti nalaze na 191 i 110) (Pauli i sar., 1999), što važi za ekstrakt ploda *Morus nigra* ili prisustvo heksoze u strukturi (MS/MS fragmenti 201 i 219) (Simirgiotis, 2013), što je verovatnije za *Morus alba* i *Morus nigra*. U MS spektru ekstrakta ploda *M. nigra* uočljivo je prisustvo intenzivnog pika pri  $m/z=449$  koji potiče od cijanidin-3-galaktozida ili glukozida.

Galna kiselina je prisutna u izuzetno maloj količini u poređenju sa drugim komponentama detektovanim masenom spektrometrijom (Liu i sar., 2008). Isti zaključak se može izvesti i za sadržaj apigenina. Korišćenjem masene spektrometrije detektovan je i naringenin, prisutan u malim količinama (Kyriakou i sar., 2012). Katehin je bio prisutan u velikoj količini (Hye i sar., 2009). Sledeća komponenta koja je identifikovana, kvercetin, nije bila prisutna u velikoj količini ili u čistom obliku (Liu i sar., 2008). Miricetin je prisutan u tragovima (Liu i sar., 2008). Takođe, identifikovana je i hlorogenska kiselina kao derivat. Rutin i luteolin su zastupljeni u malim količinama ili kao derivati (Miljković i sar., 2015).

#### 4.5 Sastav etarskog ulja lišća vrsta roda *Morus* L.

Metodom hidrodestilacije dobijeno je 4 uzoraka etarskih ulja lišća *M. alba* i *M. nigra*, i to 2 uzorka svežeg i 2 uzorka osušenog lišća, sakupljenog u jugoistočnim krajevima Srbije. Analiza dobijenih uzoraka ulja GC metodom je rezultovala identifikacijom 131 konstituenta, što predstavlja 95,1 – 96,4% totalne površine GC pikova (Tabela 15). Najzastupljenije klase identifikovanih jedinjenja su alkani i diterpenoidi, koji zajedno čine više od 60% uzorka MA-2, kao i više od 88% uzorka MN-1, MN-2 i MA-1. Preostale identifikovane isparljive komponente su prikazane u Tabeli 16, i pripadaju karotenoidima (1,4 – 24,8%) ili jedinjenjima masnih kiselina (u tragovima – 8,1%). Glavni sastojci etarskog ulja *M. nigra* su: *trans*-fitol (65,4 – 71,2%), (*E,E*)-geranil linalool (0,2 – 8,0%) i alkani normalnog niza trikozan (2,0 – 2,8%), pentakozan (2,4 – 3,8%), heptakozan (1,9 – 2,7%), nonakozan (3,4 – 4,1%) i hentriakontan (2,4 – 3,5%).

Prinos etarskih ulja biljnog materijala MN-2 i MA-2 su bili 0,0011% i 0,0012%, respektivno, odnosno 0,0080% (w/w) iz obe vrste svežeg lišća MN-1 i MA-1.

Generalno, bilo je samo kvantitativnih varijacija konstituenata u etarskom ulju svežeg lišća *M. nigra* (MN-1; hidrodestilacija izvršena odmah nakon sakupljanja biljnog materijala) i osušenog lišća (MN-2; etarsko ulje izolovano nakon sušenja u periodu od jednog meseca pri

sobnoj temperaturi). Najprimetnije promene su uočene kod glavnih sastojaka, tako da se sadržaj *trans*-fitola i ukupni sadržaj alkana smanjuju za 5,8% i  $\approx 2\%$ , respektivno, dok se relativni sadržaj (*E,E*)-geranil linaloola povećao za 7,8%. Za razliku od najznačajnijih kvantitativnih promena u sastavu uzoraka etarskog ulja *M. nigra* koje nastaju tokom procesa sušenja lišća, sastav korespondirajućih etarskih ulja *M. alba* (MA-1 i MA-2) se razlikuje ne samo kvantitativno već i kvalitativno. Može se zaključiti da je *trans*-fitol konstituent koji je pokazao najznačajnije smanjenje relativnog sadržaja, približno 8 puta. Sa druge strane, sadržaj geranil acetona i svih izomera 4,6,8-megastigmatrien-3-ona se povećao tokom perioda sušenja (Tabela 14). Takođe,  $\gamma$ -lakton i *cis*-bovidol, koji se pojavljuju u etarskom ulju osušenog lišća *M. alba* su zastupljeni sa 8,1%.

**Tabela 14. Hemijski sastav etarskih ulja svežih i osušenih listova *M. alba* i *M. nigra***

Komponenta	Klasa	RI <sup>a)</sup>	<i>Morus nigra</i> <sup>b)</sup>		<i>Morus alba</i> <sup>c)</sup>		ID <sup>d)</sup>
			MN-1	MN-2	MA-1	MA-2	
Relativni sadržaj [%] <sup>h)</sup>							
Furfural	FA	828	-	-	tr	-	e, f, g
( <i>E</i> )-3-Heksen-1-ol	FA	844	-	-	tr	-	e, f
Tiglinska kiselina	FA	903	-	-	tr	-	e, f, g
4-Metilnonan	A	957	tr	-	-	-	e, f
Benzaldehid	O	959	-	-	tr	-	e, f, g
Dekan	A	1000	tr	-	-	-	e, f, g
Benzil alkohol	O	1034	-	tr	tr	-	e, f, g
2-Feniletanal	O	1051	tr	-	0,1	-	e, f
4-Metildekan	A	1057	tr	-	-	-	e, f
2-Metildekan	A	1068	tr	-	-	-	e, f
<i>p</i> -Krezol	O	1069	-	-	tr	-	e, f
Undekan	A	1100	1,0	-	-	-	e, f
Dehidro-sabina keton	M	1123	-	-	tr	-	e, f

**Tabela 14. –nastavak–**

Izoforon	C	1125	tr	-	-	-	e, f
3,7-Dimetildekan <sup>j)</sup>	A	1125	tr	-	-	-	e, f
4-Ketoizoforon	C	1145	-	-	tr	-	e, f
Benzoeva kiselina	O	1155	-	-	tr	-	e, f, g
Oktanonska kiselina	FA	1162	-	-	tr	-	e, f, g
2-Metilundekan	A	1163	0,2	-	-	-	e, f
3-Metilundekan	A	1170	tr	-	-	-	e, f
Dodekan	A	1200	2,0	-	-	-	e, f, g
Šafranal	C	1202	tr	tr	tr	tr	e, f
2,6-Dimetilundekan	A	1213	0,4	-	-	-	e, f
2-Metildodekan	A	1264	0,3	-	-	-	e, f
3-Metildodekan	A	1270	0,3	-	-	-	e, f
Dihidroedulan I	C	1298	-	-	tr	-	e, f
Tridekan	A	1300	1,8	tr	-	-	e, f, g
2,6-Dimetildodekan	A	1311	tr	-	-	-	e, f
4-Vinilguajakol	O	1311	-	tr	tr	tr	e, f
1-Metilnaftalen	O	1315	tr	-	-	-	e, f
3,7-Dimetildodekan	A	1317	tr	-	-	-	e, f
Eugenol	O	1353	-	-	tr	-	e, f, g
2-Metiltridekan	A	1363	tr	-	-	-	e, f
3-Metiltridekan	A	1370	tr	-	-	-	e, f
2,6,10-Trimetildodekan <sup>j)</sup>	S	1375	0,2	-	-	-	e, f
(Z)- $\beta$ -Damascenon	C	1380	-	-	tr	-	e, f

**Tabela 14. –nastavak–**

1-Undekanol	FA	1385	tr	-	-	-	e, f
1-Tetradecen	FA	1391	tr	-	-	-	e, f
Tetradekan	A	1400	0,8	-	tr	-	e, f, g
( <i>E</i> )- $\beta$ -Damascenon	C	1409	-	-	tr	tr	e, f
2,6-Dimetiltridekan	A	1413	tr	-	-	-	e, f
Geranil aceton	C	1447	-	-	-	9,8	e, f, g
Neidentifikovana komponenta <sup>i)</sup>		1461	tr	tr	0,1	3,2	
2-Metiltetradekan	A	1463	tr	-	-	-	e, f
3-Metiltetradekan	A	1470	tr	-	-	-	e, f
3,4-Dehidro- $\beta$ -jonon	C	1476	0,2	-	-	tr	e, f
( <i>E</i> )- $\beta$ -Jonon	C	1479	tr	-	tr	2,6	e, f
Pentadekan	A	1500	0,3	-	tr	-	e, f, g
2-Tridekanon	FA	1502	tr	-	tr	-	e, f
( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -Farnezen	S	1503	tr	-	-	-	e, f
3,4-Dimetil-5-pentil-2( <i>5H</i> )-furanon (sin. dihidrobovalid)	FA	1512	-	-	-	tr	e, f
( <i>Z</i> )-3,4-Dimetil-5-pentiliden-2( <i>5H</i> )-furanon (sin. <i>cis</i> -bovalid, ( <i>Z</i> )-bovalid) <sup>k)l)</sup>	FA	1518	-	-	-	8,1	e, f
Kaparatrien <sup>j)</sup>	S	1523	-	-	-	tr	e, f
( <i>6Z,8E</i> )-4,6,8-Megastigmatrien-3-on	C	1559	-	tr	0,1	tr	e, f
( <i>E</i> )-Nerolidol	S	1559	-	-	tr	-	e, f

**Tabela 14. –nastavak–**

2-Metilpentadekan	A	1563	tr	-	-	-	e, f
3-Metilpentadekan	A	1570	tr	-	-	-	e, f
(Z)-3-Heksenil benzoat	FA	1571	-	-	tr	tr	e, f
(6Z,8Z)-4,6,8-Megastigmatrien-3-on	C	1577	0,3	1,2	0,3	4,3	e, f
2-Metil-4-(2,6,6-trimetil-1-cikloheksen-1-il)-2-butenal (sin. boronia butenal) <sup>j)</sup>	C	1582	-	-	tr	-	e, f
Heksadekan	A	1600	tr	-	-	-	e, f, g
(6E,8E)-4,6,8-Megastigmatrien-3-on	C	1610	tr	tr	tr	tr	e, f
Tetradekanal	FA	1613	-	-	tr	-	e, f, g
(6E,8Z)-4,6,8-Megastigmatrien-3-on	C	1623	0,2	0,6	0,2	4,3	e, f
2-Metilheksadekan	A	1663	-	-	tr	-	e, f
1-Tetradekanol	FA	1678	-	-	tr	-	e, f, g
2-Pentadekanon	FA	1696	tr	-	tr	-	e, f
Heptadekan	A	1700	tr	tr	tr	tr	e, f, g
Pentadekanal	FA	1714	tr	-	tr	tr	e, f
Tetradekanonska kiselina	FA	1758	-	-	tr	-	e, f, g
Benzil benzoat	FA	1768	-	-	tr	-	e, f
3-Metilheptadekan	A	1771	-	-	tr	-	e, f
Oktil oktanoat	FA	1776	-	-	tr	-	e, f
Fenantren	O	1784	-	-	tr	-	e, f

**Tabela 14. –nastavak–**

1-Oktadecen	FA	1793	-	-	tr	-	e, f
Oktadekan	A	1800	tr	tr	tr	tr	e, f, g
Heksadekanal	FA	1816	-	-	tr	-	e, f
Neofitadien (izomer I)	D	1835	tr	-	tr	-	e, f
Heksahidrofarnezil aceton	C	1840	2,0	3,0	0,8	3,8	e, f
1-Heksadekanol	FA	1882	-	-	tr	-	e, f
1-Nonadecen	FA	1893	-	-	tr	-	e, f
Nonadekan	A	1900	tr	tr	0,1	tr	e, f, g
( <i>E,E</i> )-Farnezil aceton	C	1909	-	-	tr	tr	e, f
Metil palmitat	FA	1924	tr	tr	0,1	tr	e, f
Izofitol	D	1945	tr	tr	0,1	-	e, f
Heksadekanonska kiselina	FA	1969	-	-	2,0	-	e, f, g
Etil heksadekanoat	FA	1992	tr	-	-	-	e, f
1-Eikozen	FA	1994	-	-	tr	-	e, f
Eikozan	A	2000	tr	tr	0,1	tr	e, f, g
( <i>E,E</i> )-Geranil linalol	D	2022	0,2	8,0	0,6	tr	e, f
Metil ( <i>Z,Z,Z</i> )- 9,12,15- oktadekatrienoate	FA	2096	0,4	tr	0,3	-	e, f
Heneikozan	A	2100	0,3	tr	0,7	tr	e, f, g
<i>trans</i> -Fitol	D	2113	71,2	65,4	61,6	7,9	e, f
Oktadekanonska kiselina	FA	2160	-	-	0,3	-	e, f

**Tabela 14. –nastavak–**

(Z,Z,Z)-9,12,15-Oktadekatrienonska kiselina	FA	2164	0,2	-	0,3	-	e, f
1-Dokozen	FA	2192	-	-	0,2	-	e, f
Dokozan	A	2200	0,2	tr	0,5	tr	e, f, g
Eikozanal	FA	2213	-	-	tr	-	e, f
2-Metildokozen	A	2265	-	tr	tr	-	e, f
1-Trikozen	FA	2297	-	-	0,1	-	e, f
Trikozan	A	2300	2,0	2,8	2,8	3,0	e, f, g
2-Heneikozanon	FA	2307	-	-	tr	-	e, f
$\delta$ -Oktadekalakton	FA	2347	-	tr	0,2	-	e, f
3-Metiltrihozan	A	2374	-	-	tr	-	e, f
1-Tetrakozen	FA	2396	tr	tr	0,7	tr	e, f
Tetrakozen	A	2400	0,5	0,6	1,4	3,0	e, f, g
2-Dokozanon	FA	2410	-	-	tr	-	e, f
2-Metiltetrakozen	A	2465	-	-	tr	-	e, f
1-Pentakozen	FA	2497	-	-	0,8	-	e, f
Pentakozen	A	2500	2,4	3,8	8,2	10,9	e, f, g
1-Heksakozen	FA	2597	tr	tr	0,5	tr	e, f
Heksakozen	A	2600	tr	tr	0,7	2,8	e, f, g
2-Metilheksakozen	A	2665	-	-	tr	-	e, f
1-Tetrakozanol	FA	2677	-	-	tr	-	e, f
1-Heptakozen	FA	2697	-	-	tr	-	e, f
Heptakozen	A	2700	1,9	2,7	3,7	7,9	e, f, g
Pentakozanal	FA	2714	-	-	tr	-	e, f
3-Metilheptakozen	A	2775	-	-	tr	-	e, f
1-Oktakozen	FA	2797	tr	-	0,2	tr	e, f



**Tabela 14. –nastavak–**

Oktakozan	A	2800	tr	tr	0,2	tr	e, f, g
2-Metiloktakozan	A	2864	-	-	tr	-	e, f
Nonakozan	A	2900	3,4	4,1	4,2	12,4	e, f, g
3-Metilnonakozan	A	2975	-	-	tr	-	e, f
1-Triakonten	FA	2998	-	-	0,1	tr	e, f
Triakontan	A	3000	tr	tr	0,1	tr	e, f, g
1-Heksakozil acetat	FA	3013	-	tr	0,2	-	e, f
2-Metiltriakontan	A	3065	-	-	tr	-	e, f
Hentriakontan	A	3100	2,4	3,5	3,2	12,4	e, f, g
1-Dotriakonten	FA	3198	-	-	-	tr	e, f
Dotriakontan	A	3200	tr	-	tr	tr	e, f, g
1-Oktakozil acetat	FA	3213	-	-	tr	-	e, f
Trtriakontan	A	3300	tr	tr	0,2	tr	e, f, g
Ukupno			95,1	95,7	96,0	96,4	

Broj sastojaka kao i klase kojima pripadaju identifikovana jedinjenja etarskih ulja lišća vrsta roda *Morus* prikazan je u Tabeli 15.

**Tabela 15. Broj sastojaka i klase identifikovanih jedinjenja etarskih ulja lišća vrsta roda *Morus***

Broj sastojaka		71	36	96	43
Alkani	A	20,2	17,5	26,1	52,4
Karotenoidni derivati	C	2,7	4,8	1,4	24,8
Diterpenoidi	D	71,4	73,4	62,3	7,9
Masne kiseline i derivati masnih kiselina	FA	0,6	tr	6,0	8,1
Monoterpenoidi	M	-	-	tr	-
Drugi	O	tr	tr	0,1	tr
Seskviterpenoidi	S	0,2	-	tr	tr

LEGENDA tabela 14 i 15:

- a) RI = retencioni indeks određen u odnosu na relativni homologi niz n-alkana (C8-C33) na koloni DB-5MS;
- b) MN-1 = Uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svežeg lišća *Morus nigra*, odmah nakon sakupljanja biljnog materijala, MN-2 = Uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom lišća *M. nigra* koje je sušeno mesec dana pri sobnoj temperature;
- c) MA-1 = Uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svežeg lišća *Morus alba*, odmah nakon sakupljanja biljnog materijala, MA-2 = Uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom lišća *M. alba* koje je sušeno mesec dana pri sobnoj temperature;
- d) ID = Metod identifikacije;
- e) = sastojak identifikovan poređenjem maseno-spektralnih karakteristika sa onima iz literature (Adams, 2007);
- f) = sastojak identifikovan eksperimentalnim retencijom indeksom (DB-5MS koloni) poređenim sa literaturnim podacima (Adams, 2007);
- g) = identitet sastojka potvrđen korišćenjem GC ko-injekcijom autentičnog standard;
- h) tr = trag (< 0.05%); - = nije detektovano;
- i) MS (EI, 70 eV), m/z (rel. int., %): 178 (21, [M+]), 163 (42), 151 (6), 150 (47), 136 (12), 135 (100), 122 (7), 121 (30), 109 (13), 108 (11), 107 (47), 105 (7), 95 (19), 94 (7), 93 (31), 91 (25), 85 (7), 81 (25), 80 (10), 79 (65), 78 (9), 77 (34), 71 (16), 70 (8), 69 (47), 67 (15), 66 (9), 65 (16), 57 (17), 55 (25), 53 (17), 52 (6), 51 (10), 43 (18), 42 (6), 41 (41), 40 (5), 39 (24);
- j) Relativna stereochemija nije određena;
- k) Maseni spektar i retencioni indeks objavio G. MacLeod (MacLeod, 1991);
- l) MS (EI, 70 eV), m/z (rel. int., %): 181 (4), 180 (30, [M+]), 165 (5), 138 (15), 137 (87), 125 (29), 124 (100), 123 (8), 110 (5), 109 (12), 96 (10), 95 (6), 83 (7), 82 (14), 81 (17), 79 (6), 67 (6), 55 (59), 54 (16), 53 (10), 41 (11), 39 (12).

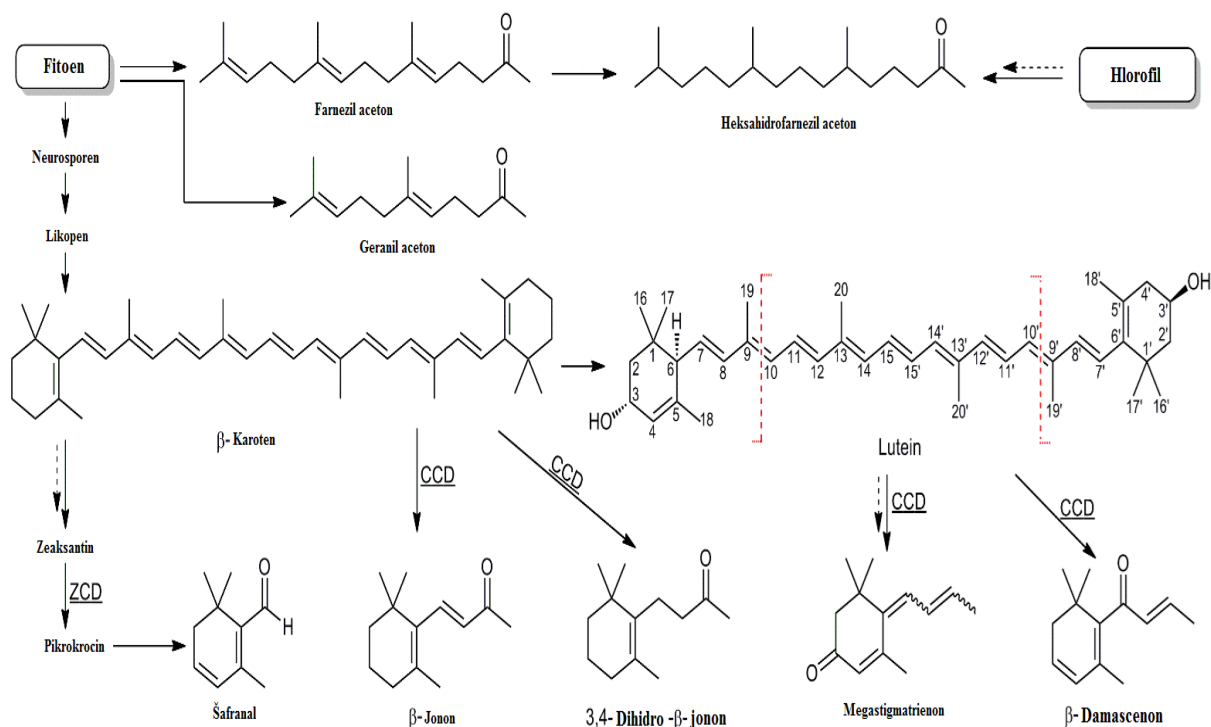
Komponente koje su derivati karotenoida (apokarotenoidi ili norizoprenoidi) su zastupljeni sa skoro ¼ (24,8%) od ukupnog uzorka MA-2, dok su komponente ove klase bili prisutni samo sa 1,4% u uzorku ulja iz svežih listova *M. alba*. Tako, ne samo relativni sadržaj frakcije karotenoida, nego i njen kvalitativni sastav, pokazuju razliku između uzoraka etarskih ulja iz svežih i osušenih listova *M. alba* (MA-1 i MA-2; Tabela 14). Generalno, ukus biljnog materijala je jedna od glavnih organoleptičkih karakteristika koja se koristi u njoj

selekciji, prihvatanju i ingestiji (Preedy, 2013). Otkrivene razlike, na primer povećan sadržaj karotenoidnih derivata, sugerise da proces sušenja ima ključnu ulogu za postojanje poznatog ukusa čaja (infuz sa vodom) pripremljenog od osušenog lišća *M. alba*. Komponente karotenoidnih derivata se karakterišu veoma niskim pragom za miris (upadljivi primeri su neobično snažni mirisi  $\beta$ -jonona i  $\beta$ -damascenona sa pragom za miris od 0,007 ppb i 0,002 ppb, respektivno (Winterhalter P, Rouseff R.,2001), i spadaju u potencijalno najaktivnije aromatične biljne metabolite (Preedy, 2013). Na primer,  $\beta$ -jonon (miris ljubičice, drveta, cvetni, voćni ukus), prisutan u oba uzorka *M. alba* etarskog ulja (MA-1 i MA-2; Tabela 14), je glavni nosilac aroma ruže, uprkos niskim koncentracijama u ulju ruže (Berger i sar., 1989). Pored (E)- $\beta$ -jonona, druge identifikovane komponente karotenoidnih derivata verovatno doprinose aromi lišća *M. alba* (na primer šafranal (slatkast, drven, fenolni, oštar, voćni, biljni), geranil aceton (ruža, cvetni, magnolija, aldehidni, voćni), farnezil aceton (voćni, miris vina, cvetni, kremast), (E)- i (Z)- $\beta$ -damascenon (voćni, medeni) i svi stereoisomeri megastigma-4,6,8-trien-3-ona (slatkasti)) (Preedy, 2013). Osim toga, oksidativni proizvodi karotenoida imaju važne biološke funkcije. U biljnim organima, apokarotenoidi obavljaju funkcije hormona, pigmentata, privlače insekte i imaju širok spektar bioloških aktivnosti (npr. antigljivično, antibakterijsko delovanje) (Giuliano i sar., 2003). Dalje, geranil aceton, koji je identifikovan samo u etarskom ulju osušenog lišća *M. alba* (9,8%), pokazuje značajno germicidno i antimikrobno dejstvo (Bonikowski i sar., 2015). Dakle, sa efektom poboljšanja organoleptičkih karakteristika osušenog lišća, veća količina karotenoidnih derivata, kao rezultat procesa sušenja, može značajno da poboljša biološki i/ili farmakološki potencijal lišća *M. alba*.

Značajne razlike među uzorcima etarskih ulja svežeg i osušenog lišća duda su verovatno rezultat daljeg uklanjanja isparljivih sastojaka etarskih ulja (etarsko ulje osušenog biljnog materijala je sadržalo samo  $\approx 50\%$  sastojaka koji su bili prisutni u uzorcima etarskog ulja svežeg lišća) ili usled biohemijских transformacija koje su se desile nakon sakupljanja materijala (npr. kvalitativne i kvantitativne razlike karotenoidnih derivata i diterpenoida u etarskom ulju dobijenom iz svežeg i osušenog biljnog materijala, posebno kod *M. alba*). Povećana količina i velika strukturna raznolikost apokarotenoida pronađenih u osušenom lišću *M. alba*, mogu biti dovedene u vezu uglavnom zbog raznolikosti katalitičkih enzima iz grupe Carotenoid Cleavage Dioxygenases (CCDs) koji katalizuju sintezu isparljivih apokarotenoida (El Hadi i sar., 2013; Simkin i sar., 2004). CCDs predstavljaju veliku grupu enzima i pokazuju visok stepen regiospecifičnosti na poziciji dvostruke veze njihovih supstrata (Yahyaa i sar., 2013). Kako CCDs često produkuju višestruke proizvode iz jednog

supstrata, što verovatno doprinosi raznolikosti apokarotenoida nađenih u prirodi (Auldrige i sar., 2013), nije iznenađujuće što većina identifikovanih apokarotenoida iz uzorka MA-2 mogu biti produkti iz jednog biosintetskog puta, sa početkom od fitoena.

Predloženi biosintetski put, koji povezuje većinu identifikovanih apokarotenoida iz osušenog lišća *M. alba* sa zajedničkim prekursorom (fitenom), opisan je na Slici 13. Na osnovu struktura biosintetizovanih apokarotenoida ( $C_{13}$ -norizoprenoida -  $\beta$ -jonona, 3,4-dihidro- $\beta$ -jonona, šafranal,  $\beta$ -damascenona i svih diastereoizomera megastigma-4,6,8-trien-3-ona), izgleda da je reakcija bio-oksidativnog razdvajanja koja uključuje 9,10 (9',10')-dioksidogenu (CCD1, CCD7 i/ili AtCCD1 enzim, koji vrši razdvajanje dvostruke veze na poziciji 9,10 njihovog karotenoidnog substrata (Winterhalter P, Rouseff R., 2001), bila dominantna. Prethodno je predložen mehanizam u dva koraka za način delovanja ovog enzima u cvetu ruža koji nije specifičan za funkcionalne grupe karotenoida (Eugster, Märki-Fischer, 1991). Takođe, transformacija početnih karotenoida do apokarotenoida može da se odvija putem neenzimskog procesa koji obuhvata foto-oksidaciju, (auto)oksidaciju i termalnu degradaciju (Winterhalter P, Rouseff R., 2001). Uprkos svemu, i pored dostupnih detaljnih znanja o biosintetskom putu apokarotenoida kod biljaka u tri razrađena koraka u biosintezi apokarotenoida iz karotenoida (Winterhalter P, Rouseff R., 2001), ostaje nepoznato koji put (enzimsko ili neenzimsko razdvajanje) je glavni kod brojnih biljnih vrsta. Ovo uključuje trenutni slučaj biosinteze apokarotenoida u lišću *M. alba*.



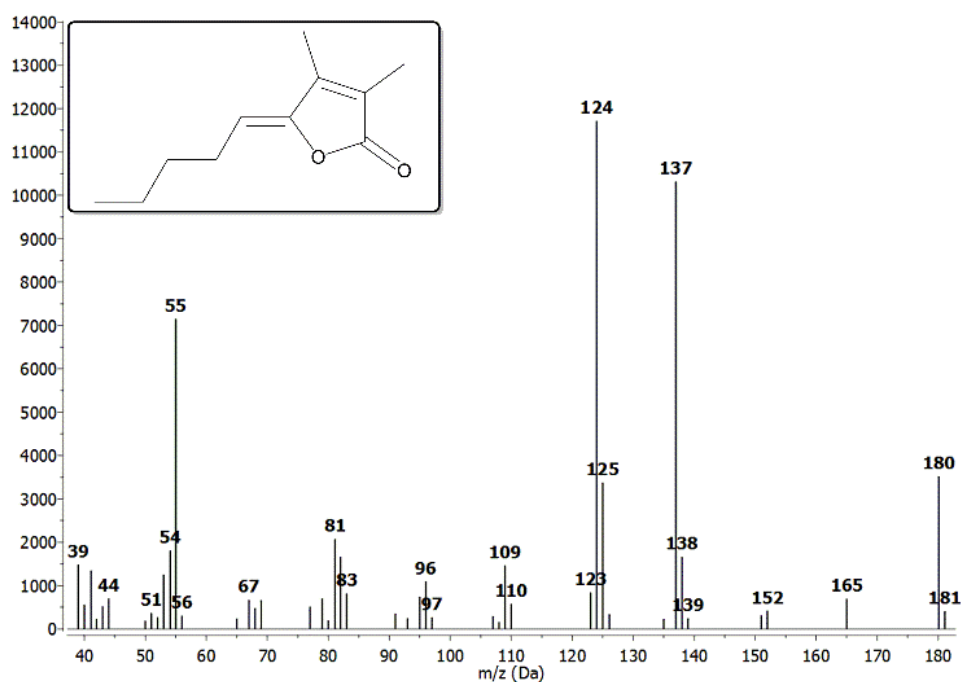
**Slika 13. Predloženi biosintetski put formacije apokarotenoida u etarskom ulju osušenog lišća *M. alba* sa fitenom kao početnim supstratom. ZCD je zeaxanthin cleavage dioksigenazai CCD je carotenoid cleavage dioksigenaza (Radulović i sar., 2017)**

Uzorak etarskog ulja osušenog lišća *M. alba* sadrži komponentu koja eluira pri RI 1518 i zastupljena je sa 8,1% u ulju, a nije detektovana u drugim uzorcima. Prilikom direktnog poređenja masenih spektara komponentata (molekulski jon pri  $m/z$  180, osnovni pik pri  $m/z$  124, Slika 14) sa onima koji su dostupni u komercijalnim bibliotekama masenih spektara (Adams (Adams, 2007), Wilez 6, NIST11 i MassFinder 2.3) nije se došlo do uspešnog rešenja. Iz iskustva, veoma slična komponenta je nađena kao sastojak mnogih etarskih ulja, ali je ostala neidentifikovana (na primer, u etarskom ulju osušenog *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae) (Radulović i sar., 2012)). Prvi tragovi koji su doveli do njene identifikacije poticali su od sličnosti sa jednim od sastojaka koji je bio prisutan u istom uzorku etarskog ulja. Naime, komponente dihidrobovalida, čija je identifikacija izvršena poređenjem masenih spektara i retencionih indeksa iz MassFinder-a 2.3, eluira se (RI 1512) baš pre nego komponenta bovalid. Dihidrobovalid ima maseni spektar koji pokazuje jone pri  $m/z$  vrednostima koje su 2 jedinice viši nego oni kod tada neidentifikovanog sastojka, uključujući njegov molekulski jon (pri  $m/z$  182). To je rezultovalo time da se uzme u obzir mogućnost da komponenta na RI 1518 predstavlja dehidro derivat dihidrobovalida.

Pretragom literature došlo se do zaključka da takva komponenta postoji: (E/Z)-3,4-dimetil-5-pentilidin-2(5H)-furanon, poznata i kao (*cis/trans*)-bovolid (Slika 14). Poređenje objavljenih (MacLeod G., 1991) masenih spektara i RI vrednosti, za kolone iste polarnosti, za bovolid sa onima koje odgovaraju komponenti iz etarskog ulja osušenog lišća *M. alba* potvrđuju okvirno identitet. Tako je komponenta na RI 1518 identifikovana kao jedan od geometrijskih izomera bovolida.

Bovolid je prvi put izolovan i identifikovan iz putera, i dobio je naziv zbog porekla iz govedine (Boidingh, Taylor, 1962; Lardelli, 1966). Ranije, je potvrđeno da bovolid i dihidrobovolid nastaju tokom biohemijskih transformacija nakon branja biljnog materijala pod dejstvom svetlosti iz početnih biljnih metabolita, koji obično prate proces biljnog materijala (Horita i sar., 1985). Iako je moguće postojanje dva diastereoizomera bovolida ((Z)- i (E)-3,4-dimetil-5-pentilidin-2(5H)-furanon), za samo jedan se zna da nastaje kao rezultat takve transformacije iz polaznih metabolita koji su povezani sa masnim kiselinama. Dominantno nastajanje Z izomera je prethodno objavljeno u literaturi (Park i sar., 2012), i ta činjenica se može shvatiti u smislu očigledno velike razlike u minimalnim potencijalnim energijama dva diastereoizomera. Da bi se ovo potvrdilo, korišćen je ChemBio 3D Ultra 12.0 softver, pri MM2 nivou teorije, izračunata je  $\Delta E$  vrednost između konformacija sa minimalnim energijama dva diastereoizomera. Dobijena je vrednost od  $\approx 4$  kcal/mol (9,4635 i 13,6868 kcal/mol za (Z)-3,4-dimetil-5-pentilidin-2(5H)-furanon i (E)-3,4-dimetil-5-pentilidin-2(5H)-furanon, respektivno). Radi poređenja, E izomer 3-heksana je za samo 0,21 kcal/mol stabilniji nego Z (razlika je računata na isti način). Takva razlika u stabilnosti sugerise da se, u ravnoteži između izomera, pri sobnoj temperaturi, može očekivati dominacija (Z)-bovolida više od 99,99% u stanju ravnoteže. Dakle, identifikovani izomer bovolida je najverovatnije termodinamički stabilniji oblik, Z-izomer.

Bovolid i dihidrobovolid, koji nisu povezani sa regularnim metaboličkim putem biosinteze masnih kiselina (Boidingh, Taylor, 1962; Lardelli i sar., 1966), prethodno su indentifikovani kod mnogo različitih čajeva (Horita i sar., 1985), ili kao sastojak duvana (Demole, Berthet, 1972), ulja nane (Sakata, Hashizume, 1973), *Lycium Chinese* (Sannai i sar., 1983) i *Carphephorus corymbosus* etarskih ulja (Karlsson i sar., 1972). Obe komponente poseduju jaku aromu, sličnu celeru, i patentirani su proizvodi koji se koriste u svrhu poboljšanja ukusa duvana (Boidingh, Taylor, 1962, Lardelli, 1966). Interesantno je to što se njihovo prisustvo koristi kao marker za ekspoziciju biljnog materijala svetlu (Horita i sar., 1985).



Slika 14. Maseni spektar i struktura *cis-bovolid*a ((*Z*)-3,4-dimetil-5-pentilidin-2(*5H*)-furanon)

#### 4.6 Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra* prikazani su u Tabeli 16.

Tabela 16. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije testiranih metanolnih ekstrakata (MIC/MBC u mg/cm<sup>3</sup>) protiv patogenih bakterija

Bakterijski soj		<i>Morus nigra</i> L	<i>Morus alba</i> L.
<b>Bakterijski sojevi uzročnici nastajanja akni</b>			
Gram (+)	Poreklo		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Brisevi rana	125,05/ >251,00	100,00/ >100,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	62,52/251,00	100,00/100,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Brisevi rana	62,52/251,00	100,00/100,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	62,52/125,05	100,00/ >100,00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brisevi rana	31,26/ >251,00	>100,00/ >100,00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC19615	31,26/251,00	100,00/100,00
<i>Propionibacterium acnae</i>	ATCC11827	125,05/ >251,00	100,00/ >100,00
<b>Bakterijski sojevi uzročnici infekcija</b>			
Gram (+)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	Brisevi rana	125,05/ >251,00	100,00/ >100,00

**Tabela 16. –nastavak–**

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19433	125,05/251,00	>100,00/ >100,00
Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>	Brisevi rana	125,05/ >251,00	100,00/ >100,00
<i>Escherichia coli</i>	ATCC9863	125,05/251,00	>100,00/ >100,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brisevi rana	125,05/ >251,00	>100,00/ >100,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	125,05/251,00	>100,00/ >100,00
<i>Acinetobacter spp.</i>	Brisevi rana	125,05/125,05	100,00/ >100,00
<i>Acinetobacter boumanii</i>	ATCC196060	125,05/251,00	100,00/ >100,00
<i>Proteus mirabilis</i>	Brisevi rana	62,52/125,05	>100,00/ >100,00
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC12453	125,05/251,00	>100,00/ >100,00
<i>Klebsiella spp.</i>	Brisevi rana	125,05/ >251,00	100,00/ >100,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC10031	125,05/ >251,00	>100,00/ >100,00

Vrednosti antimikrobne aktivnosti test antibiotika protiv korišćenih bakterijskih sojeva prikazane su u Tabeli 17.

**Tabela 17. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije referentnih antibiotika (MIC/MBC u mg/cm<sup>3</sup>) protiv patogenih bakterija**

Bakterijski soj		Test antibiotici			
		Metronidazol	Doksiciklin	Ciprofloksacin	Gentamicin
<b>Bakterijski sojevi uzročnici nastajanja akni</b>					
Gram (+)	Poreklo				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Brisevi rana	3,91/15,62	7,81/7,81	1,26/1,26	0,60/0,60
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	15,62/31,25	7,81/15,61	1,26/2,52	0,60/0,60
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Brisevi rana	7,81/31,25	3,91/3,91	0,63/0,63	0,30/0,30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	7,81/62,50	3,91/7,81	0,63/0,63	0,30/0,30
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brisevi rana	7,81/7,81	0,06/0,12	0,16/0,16	0,30/0,30
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC19615	0,98/15,62	0,06/0,12	0,16/0,16	0,30/0,30
<i>Propionibacterium acnae</i>	ATCC11827	0,98/15,62	15,61/15,6	2,50/ >20,00	2,50/ >20,00
<b>Bakterijski sojevi uzročnici infekcija</b>					
Gram (+)					
<i>Enterococcus faecalis</i>	Brisevi rana	7,81/62,50	0,25/0,25	0,30/0,30	0,08/0,08

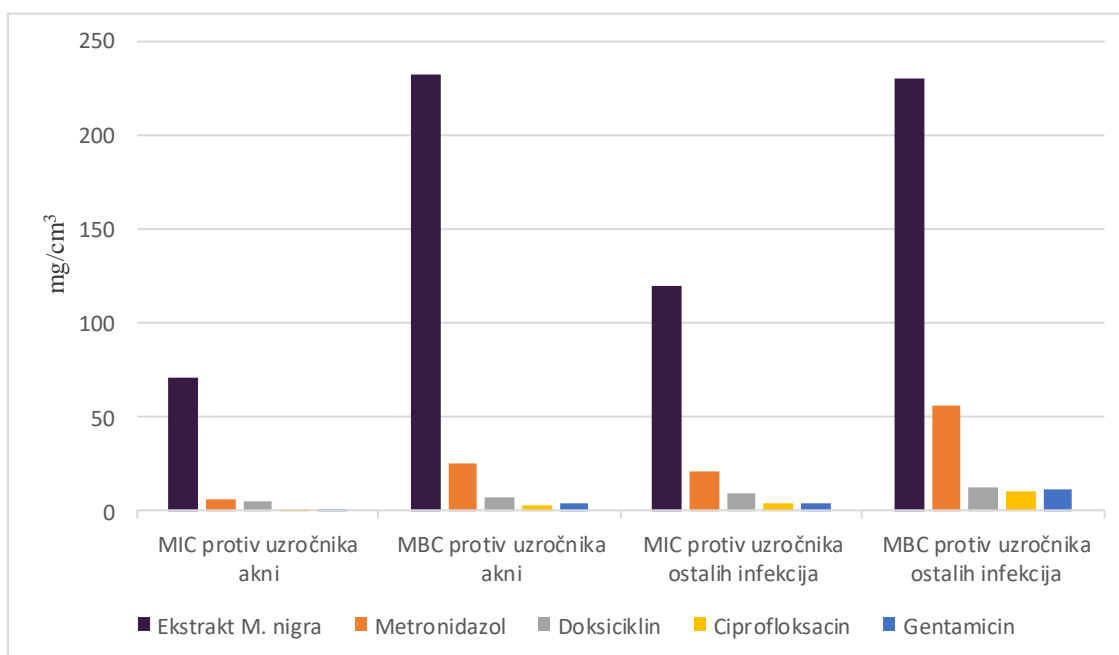


**Tabela 17. –nastavak–**

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19433	3,91/62,50	0,25/0,49	0,30/0,30	0,16/0,16
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	Brisevi rana	15,62/31,25	7,81/7,81	2,50/2,50	2,50/20,00
<i>Escherichia coli</i>	ATCC9863	31,25/31,25	7,81/15,61	2,50/2,50	2,50/20,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brisevi rana	15,62/62,50	7,81/15,61	0,02/0,63	2,50/10,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	31,25/31,25	15,61/15,61	0,02/0,63	2,50/10,00
<i>Acinetobacter spp.</i>	Brisevi rana	1,95/62,50	15,61/15,61	10,00/20,00	10,00/20,00
<i>Acinetobacter boumanii</i>	ATCC196060	15,62/15,62	15,61/15,61	10,00/20,00	10,00/20,00
<i>Proteus mirabilis</i>	Brisevi rana	7,81/7,81	7,81/15,61	10,00/20,00	1,25/5,00
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC12453	62,50/125,00	7,81/15,61	10,00/20,00	5,00/10,00
<i>Klebsiella spp.</i>	Brisevi rana	31,25/125,00	15,61/15,61	0,63/20,00	2,50/10,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC10031	31,25/62,50	15,61/15,61	10,00/20,00	10,00/20,00

U ovom testiranju, korišćen je celokupan ekstrakt. To je u skladu sa pretpostavkom da aditivni i sinergistički efekat fitohemikalija potiče od svih supstanci jedne lekovite biljke koja se koristi za lečenje (Liu, 2003). Rezultati dobijeni u testiranju antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata pokazuju da je ekstrakt biljne vrste *M. nigra* aktivniji od ekstrakta *M. alba*. Ekstrakt ploda *M. nigra* ima MIC=31,26-125,05 mg/cm<sup>3</sup>, i MBC=125,05-251,00 mg/cm<sup>3</sup> na testiranim bakterijskim sojevima. Antimikrobna aktivnost *M. nigra* je pokazana i u testiranju njegovog soka (Khalid i sar., 2011), tako da se može reći da je ovaj rezultat očekivan. Najveća testirana koncentracija ekstrakta nije pokazala antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim sojevima izolovanim sa rana pacijenata, među kojima su: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *Klebsiella sp.*. Izostala je i aktivnost protiv ATCC bakterijskih sojeva *P. acnae* i *K. pneumoniae*. Međutim, najbolja antimikrobna aktivnost je zapažena protiv soja ATCC 12228 *S. epidermidis* i *P. mirabilis* sa izolata rane, MIC/MBC=62,52/125,05 mg/cm<sup>3</sup>. Ovi rezultati se razlikuju od literaturnih, u smislu da pokazuju aktivnost protiv bakterija koje su u drugim istraživanjima bile rezistentne (Džgrak i sar., 1999). Razlog tome može biti taj što biljni materijal potiče sa različitog geografskog područja (Turska), a u prilog tome govore i rezultati koji su dobijeni testiranjem biljnog materijala sa područja Srbije (Dimitrijević, 2014). Protiv bakterijskog soja *S. pyogenes* ATCC 19615, ekstrakt *M. nigra* je imao MIC/MBC=31,26/251,00 mg/cm<sup>3</sup>. Ekstrakt *M. alba* je pokazao slabiju inhibitornu aktivnost pri najvećoj koncentraciji protiv 73% testiranih bakterijskih sojeva. Dejstvo je ostvareno protiv sojeva *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. pyogenes* (MIC=MBC=100 mg/cm<sup>3</sup>). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili i

drugi autori testiranjem na bakterijskim sojevima (Dimitrijević, 2014; Wang i sar., 2012). Zasluge za antibakterijski efekat protiv ovih bakterijskih sojeva, mogu se pripisati jedinjenju kuwanon G, za koje je utvrđeno da ima antimikrobni efekat i da je sastojak *M. alba* (Park i sar., 2003). Za razliku od ostalih istraživača, u ovom istraživanju je korišćen veći broj različitih bakterijskih sojeva, tako da se može reći da je dobijen kompletniji antibakterijski profil metanolnih ekstrakata.



**Slika 15. Poređenje antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta *M. nigra* sa referentnim antibioticima**

Odnos koncentracija potrebnih za postizanje MIC/MBC metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* i referentnih antibiotika prikazan je na Slici 15. Poređenjem vrednosti dobijenih za antimikrobnu aktivnost metanolnih ekstrakata i referentnih antibiotika može se izvesti zaključak o efikasnosti ekstrakata. Bila je potrebna 11 puta veća koncentracija ekstrakta ploda *M. nigra* u odnosu na potrebnu koncentracije metronidazola, 13 puta u odnosu na doksiciklin, 76 puta u odnosu na ciprofloksacin i oko 100 puta u odnosu na gentamicin za postizanje inhibitornog efekta protiv bakterijskih sojeva koji su uzročnici nastajanja akni. Za postizanje baktericidnog efekta protiv istih sojeva bila je potrebna 9 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, 32 puta u odnosu na doksiciklin, 64 puta u odnosu na ciprofloksacin i 60 puta u odnosu na gentamicin.

Za postizanje inhibitornog efekta protiv bakterijskih sojeva uzročnika ostalih infekcija bila je potrebna oko 6 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, 12 puta u odnosu na doksiciklin, 25 puta u odnosu na ciprofloksacin i skoro 30 puta u odnosu na gentamicin. Za postizanje baktericidnog efekta protiv istih sojeva bila je potrebna 4 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, skoro 19 puta u odnosu na doksiciklin, 22 puta u odnosu na ciprofloksacin i 19 puta u odnosu na gentamicin.

#### 4.7 Antimikrobna aktivnost aglikona ekstrakata plodova vrsta roda *Morus* L.

U ovom eksperimentu korišćene su iste vrste bakterijskih sojeva (19 sojeva – 9 Gram (+) i 10 Gram (-)), kao i kod analize antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata. Testirane su koncentracije aglikona *M. alba* su od 942,05 do 0,46 mg/cm<sup>3</sup>, a *M. nigra* od 971,6-0,48 mg/cm<sup>3</sup>. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu prikazani su u Tabeli 18.

**Tabela 18. Rezultati antimikrobnog delovanja aglikonskih komponenti metanolnih ekstrakata *M. alba* i *M. nigra* (MIC/MBC u mg/cm<sup>3</sup>) protiv patogenih bakterija**

Bakterijski soj	Poreklo	Aglikonska komponenta <i>Morus nigra</i> L.	Aglikonska komponenta <i>Morus alba</i> L.
<b>Bakterijski sojevi uzročnici nastajanja akni</b>			
Gram (+)	Poreklo		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Brisevi rana	60,73/485,80	29,44/58,88
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	30,36/242,09	29,44/58,88
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Brisevi rana	60,73/242,09	29,44/29,44
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	60,73/121,45	14,72/29,44
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brisevi rana	30,36/485,80	58,88/58,88
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC19615	30,36/242,09	29,44/58,88
<i>Propionibacterium acnae</i>	ATCC11827	30,36/485,80	58,88/117,76
<b>Bakterijski sojevi uzročnici infekcija</b>			
Gram (+)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	Brisevi rana	121,45/485,80	58,88/58,88
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19433	121,45/242,09	58,88/58,88

**Tabela 18. –nastavak–**

Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>	Brisevi rana	121,45/485,80	29,44/942,05
<i>Escherichia coli</i>	ATCC9863	121,45/242,09	29,44/942,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brisevi rana	121,45/485,80	58,88/942,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	121,45/242,09	58,88/471,02
<i>Acinetobacter spp.</i>	Brisevi rana	121,45 /121,45	29,44/471,02
<i>Acinetobacter boumanii</i>	ATCC196060	121,45/242,09	58,88/471,02
<i>Proteus mirabilis</i>	Brisevi rana	60,73/121,45	117,76/235,51
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC12453	121,45/242,09	29,44/117,76
<i>Klebsiella spp.</i>	Brisevi rana	121,45/485,80	58,88/235,51
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC10031	121,45/485,80	58,88/235,51

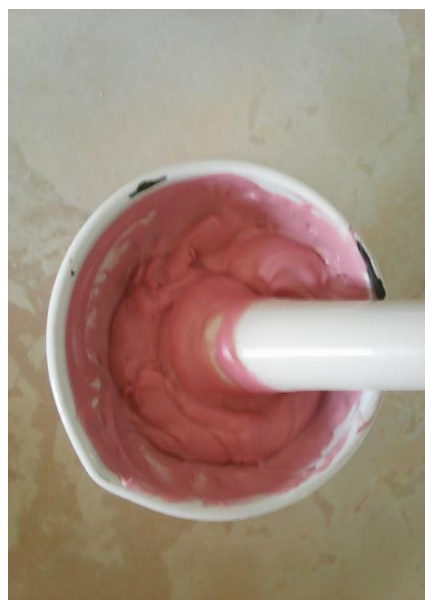
Na osnovu dobijenih rezultata se može doći do zaključka da je aglikonska komponenta metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* aktivnija protiv Gram (+) bakterija. MIC/MBC aglikona *M. alba* je bila u opsegu 14,72-58,88/29,44-117,76 mg/cm<sup>3</sup>. Najniža koncentracija bila je potrebna za dejstvo na *S. epidermidis*. Vrednosti za aglikon *M. nigra* bile su MIC/MBC u opsegu 30,36-121,45/121,45-484,80 mg/cm<sup>3</sup>. Na osnovu dobijenih rezultata izvodi se zaključak da aglikon metanolnog ekstrakta *M. alba* poseduje veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa aglikonom *M. nigra* na Gram (+) bakterije. Kada je reč o rezultatima antimikrobnog delovanja na Gram (-) bakterijama, koncentracije MIC/MBC aglikona *M. alba* su bile u opsegu 29,44-117,76/117,76-942,05 mg/cm<sup>3</sup>, a *M. nigra* 60,73-121,45/121,45-484,80 mg/cm<sup>3</sup>. Aglikonska komponenta ekstrakta *M. alba* je u nižim koncentracijama ostvarila inhibiciju rasta, ali je sa druge strane bila potrebna niža koncentracija aglikona *M. nigra* za postizanje baktericidnog efekta.

Imajući u vidu da u sastav bobica (jagoda, borovnica, malina, brusnica, aronija), u koje spada i plod dudu, ulaze jedinjenja kao što su: antocijani (kojima su posebno bogate), tanini (Hakkinen sar., 2000; Clifford i sar., 2000), flavonoidi (Hakkinen i sar., 1998; Hakkinen i sar., 1999), fenolne kiseline (Hukkanen i sar., 2006; Mattila i sar., 2006) i dejstva koja su potvrđena – antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno, i druga po zdravlje povoljna dejstva (Heinonen i sar., 2007), dobijeni rezultati za aglikonske komponente ne iznenađuju.

## 4.8 Formulacije sa ekstraktima ploda *Morus* vrsta

### 4.8.1 Organoleptička svojstva

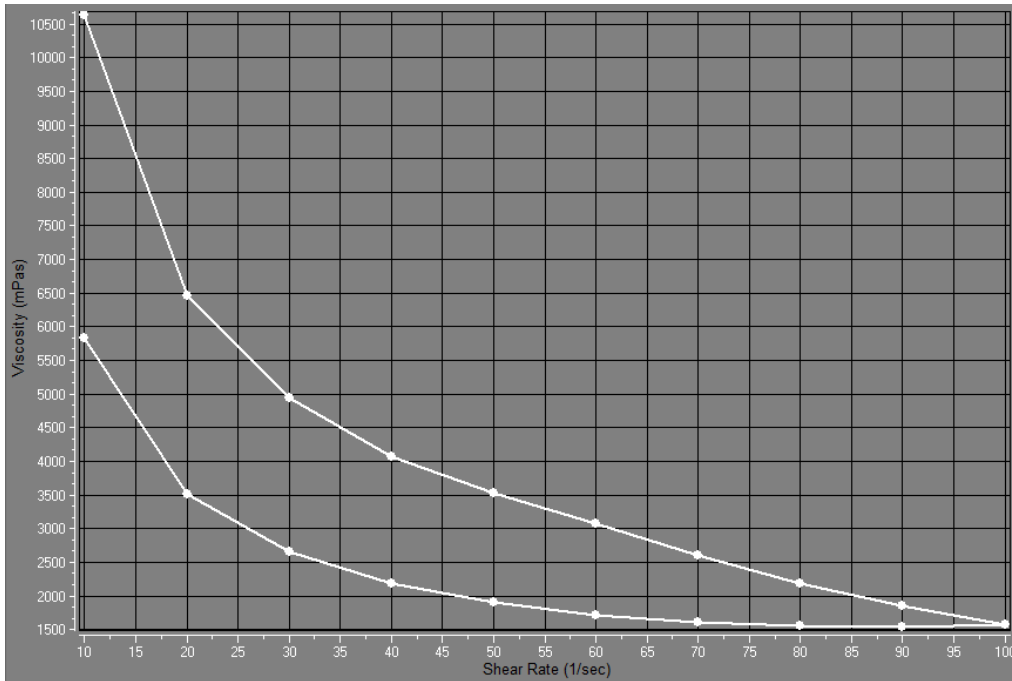
Određivanje organoleptičkih svojstava emulzija koje sadrže metanolni ekstrakt ploda *M. alba* i *M. nigra* su obuhvatala utvrđivanje karakterističnih svojstava polučvrstih preparata za primenu na kožu, kao što su: izgled, boja, sjaj, miris, konzistencija, homogenost, razmazivost i izgled filma koji proizvod ostavlja na koži. Proizvodi imaju karakterističan izgled homogene emulzije (bez grudvica), bele (Slika 16), odnosno crvenkaste boje (Slika 17) koja potiče od boje ekstrakata, normalnog sjaja na sobnoj temperaturi, karakterističnog mirisa. Proizvodi su fine, ujednačene, polučvrste konzistencije. U pogledu razmazivosti pri upotrebi, utvrđeno je da se proizvodi dobro razmazuju po koži.



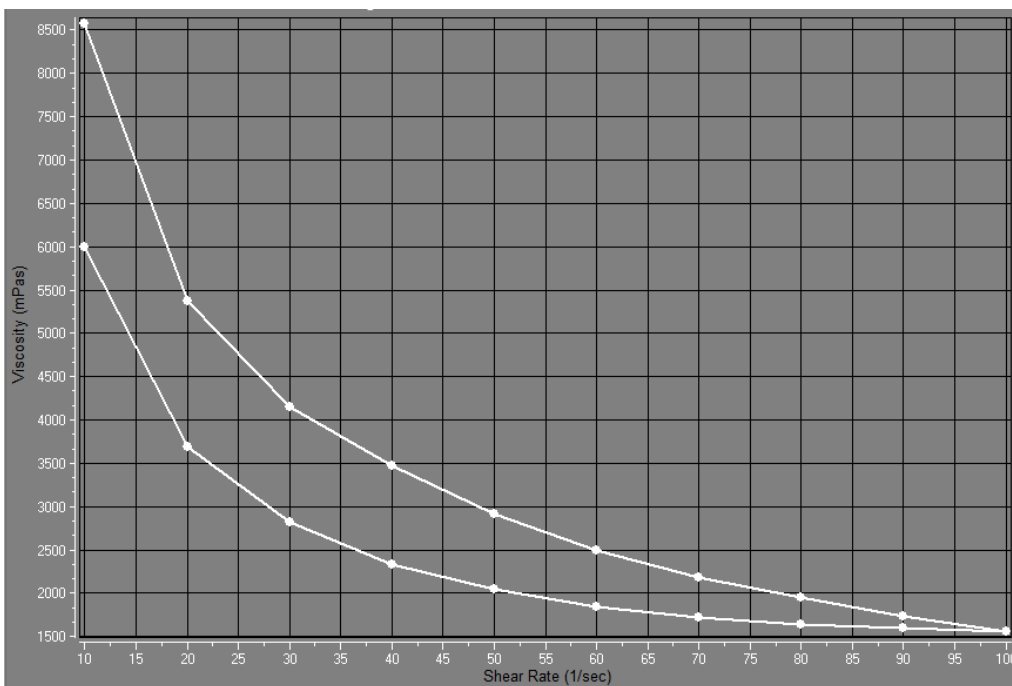
Slika 16. U/V emulzija sa ekstraktom *M. Alba*      Slika 17. U/V emulzija sa ekstraktom *M. nigra*

### 4.8.2 Reološka svojstva

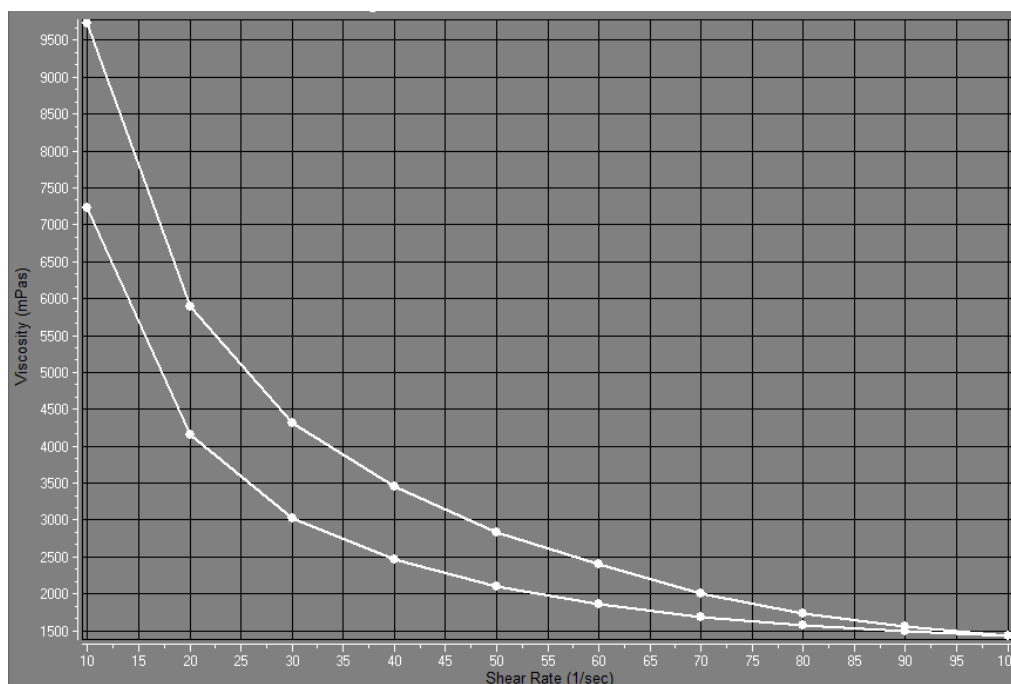
Merenja su rađena sa uzlaznom krivom, pored inicijalne, silazne krive, da bi se procenilo oporavljanje sistema nakon primenjenog stresa. U radu su određivana reološka svojstva, tj. utvrđivan je tip tečenja za: uzorak P (sama podloga-baza), uzorak MNE (emulzija sa metanolnim ekstraktom ploda *M. nigra*), MAE (emulzija sa metanolnim ekstraktom ploda *M. alba*). Dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 18-20.



**Slika 18. Promena viskoziteta korišćene podloge sa gradijentom brzine smicanja**



**Slika 19. Promena viskoziteta emulzije sa metanolnim ekstraktom ploda *M. nigra* sa gradijentom brzine smicanja**



**Slika 20. Promena viskoziteta emulzije sa metanolnim ekstraktom ploda *M. alba* sa gradijentom brzine smicanja**

Sva 3 uzorka pokazuju pseudoplastično tečenje (shear-thinning behavior), tj. da sa porastom sile smicanja opada viskozitet, kao i tiksotropiju (tj. da sila smicanja razruši strukturu emulzija i da treba izvesno vreme da se ponovo uspostavi ta struktura). Emulzioni sistemi sa pseudoplastičnim tečenjem stvaraju koherentan film na površini kože, koji je bitan za bolju antioksidativnu zaštitu (Di Mambro i sar., 2003). Činjenica da emulzije pokazuju pseudoplastični tip proticanja je poželjna za dermokozmetičke tj. fitopreparate za primenu na koži jer omogućava lako nanošenje utrljavanjem po površini kože.

Što se tiksotropije tiče, vidi se da je najizraženija kod same podloge (površina ispod tiksotropne petlje je najveća). Sama tiksotropija kao pojava može biti dizajnirana pri formulaciji nekih proizvoda (na primer kod lakova za nokte) gde je poželjno da prođe određeno vreme kako bi se uspostavila inicijalna struktura proizvoda da bi film laka bio gladak, tj. mogućnost da se "izravna"). Kod drugih je jednostavno karakteristika sistema, kao što je ovde slučaj.

Kod druga dva uzorka (MNE i MAE) tiksotropija je komparabilna. Uzorak emulzija sa ekstraktima duda utiče na strukturu i karakteristike same podloge, moguće zbog toga što ima više elektrolita u odnosu na samu podlogu. Na tiksotropiju emulzionih sistema utiču faktori kao što su; pH, temperatura, koncentracija polimera (ugušćivača), promena polimera kao i dodatak katjona i anjona (Lee i sar., 2009). Naime, u emulzijama sa ekstraktima je

prisutan veći sadržaj elektrolita nego u samoj podlozi, koji mahom potiču od katjona makroelemenata. U prilog toj tezi, urađena su i merenja provodljivosti testiranih emulzija i dobijeni su sledeći rezultati: uzorak P ima električnu provodljivost 19  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; MNE ima električnu provodljivost 113,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; MAE ima električnu provodljivost 128,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Vrednosti električne provodljivosti za uzorke MNE i MAE su tipični za U/V emulzije, dok je rezultat za uzorak P tipičan za mešovite sisteme (što je i logično, jer je podloga u pitanju). Objašnjenje za rezultat koji pokazuje manju provodljivost emulzije sa ekstraktom *M. nigra* može se naći u tome što ekstrakt *M. alba* ima veći sadržaj natrijuma. Kako je ekstrakt rastvoren u spoljašnjoj – vodenoj fazi, u kojoj se nalaze i joni natrijuma, verovatno je da oni utiču na povećanje provodljivosti. U svakom slučaju, razlika u viskozitetu između uzorka MNE i uzorka MAE nije od značaja.

#### 4.8.3 Fizička stabilnost

U cilju preliminarne procene fizičke stabilnosti formulisanih fitopreparata, izvršena su merenja pH vrednosti i električne provodljivosti direktnim uranjanjem sonde uređaja u uzorke. Rezultati merenja 7, 45 i 90 dana nakon izrade su prikazani u Tabeli 19.

**Tabela 19. Vrednosti pH i električne provodljivosti za emulzije tipa U/V sa ekstraktima ploda *M. alba* i *M. nigra* 7, 45 i 90 nakon izrade**

Uzorak	pH	Električna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
MAE	5,48; 5,18; 5,35	128,2; 145,1; 148,9
MNE	5,31; 5,43; 5,38	113,5; 114,1; 115
P	5,9; 5,94; 5,98	19; 19,2; 19,2

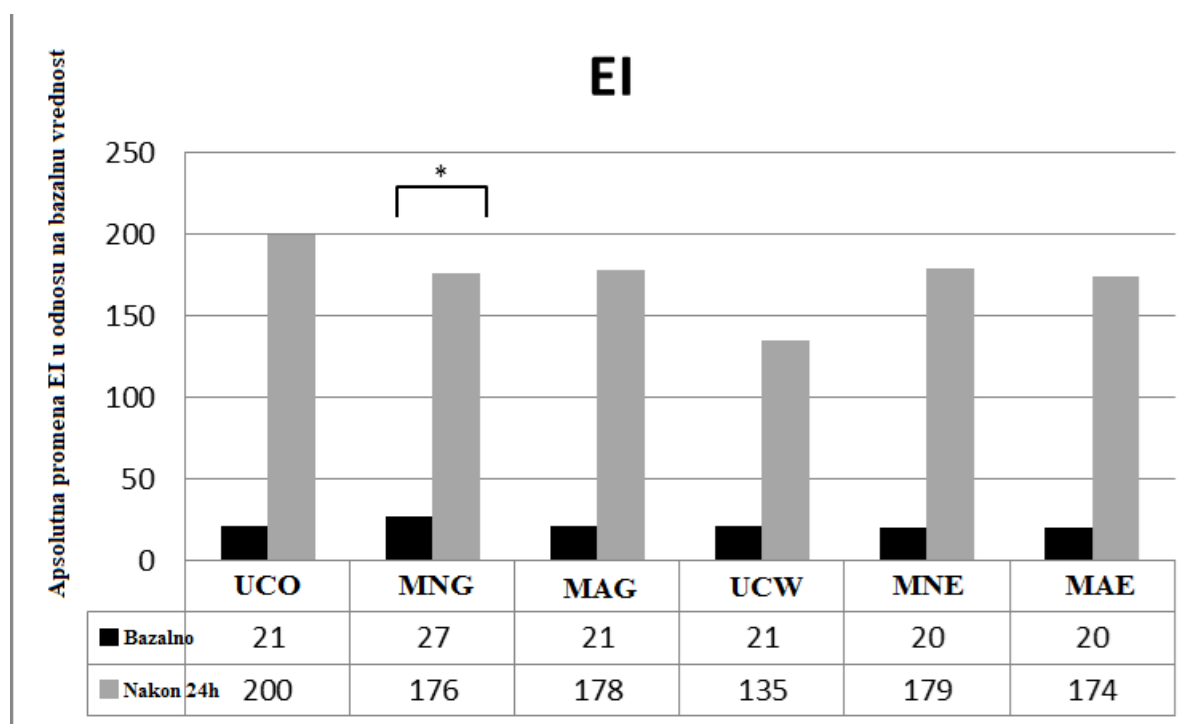
Izmerene vrednosti pH podloge pokazuju blaga svojstva korišćenog emulgatora. Vrednosti pH za fitopreparate tipa emulzija U/V su u opsegu 3,5-8, i bliske su fiziološkim pH kože. Povećanje vrednosti električne provodljivosti emulzija tokom vremena je u vezi sa promenom u strukturi emulzionih sistemima koja potiče od emulgatora. Međutim, ove promene nisu značajne te verovatno ukazuju na dobru fizičku stabilnost emulzija. Vrednosti pH i električne provodljivosti ukazuju da formulisani fitopreparati za primenu na kožu poseduju dobre fizičko-hemijske karakteristike koje su u skladu sa važećim Pravilnikom o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavlјati u promet.



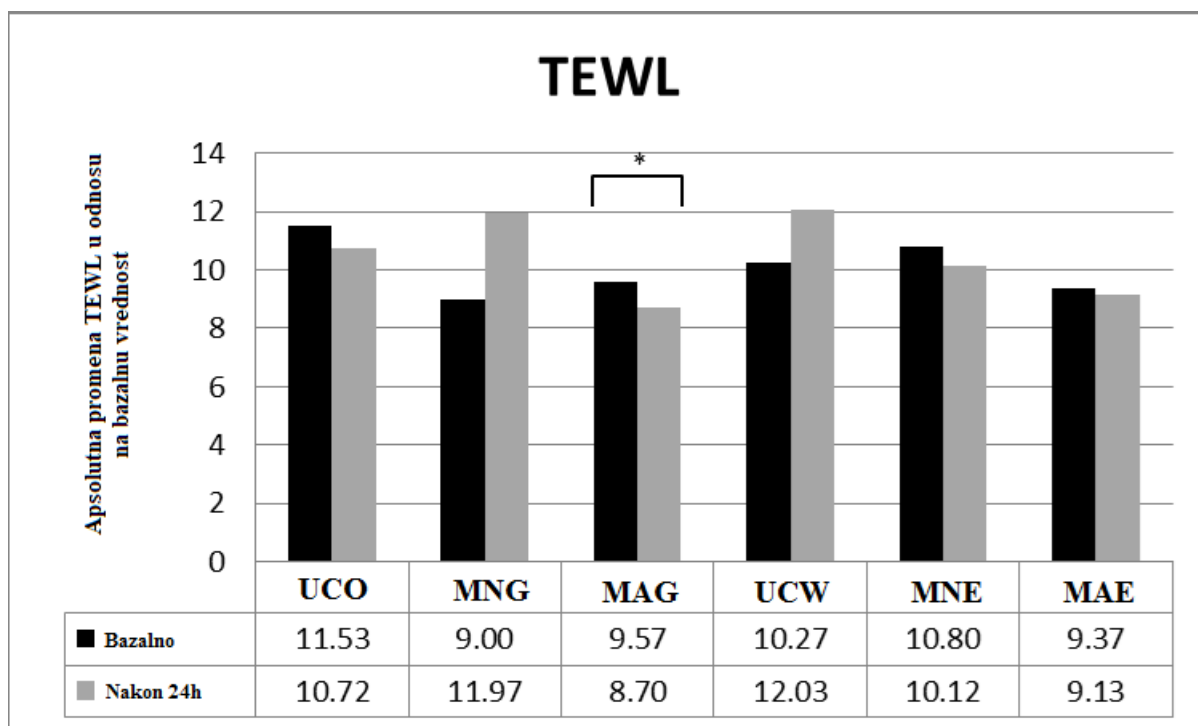
#### 4.8.4 Studija bezbednosti

U cilju testiranja bezbednosti primene formulisanih fitopreparata za lokalnu primenu na koži sprovedena je jednodnevna studija bezbednosti. Rezultati studije bezbednosti fitopreparata, u formi hidrogela i emulzija sa ekstraktima ploda duda prezentovani su na Slikama 21 i 22.

Testirani hidrogeli, emulzioni sistemi, podloga i kontrole su označene na sledeći način: mesto na koži koje je bilo kontrolno mesto pod okluzijom (tj. iritirana a potom netretirana koža) označeno je sa UCO; UCW je bilo mesto na koži pod okluzijom na kom nije vršena iritacija; sa MNG je označeno mesto koje je bilo tretirano hidrogelom sa 2% metanolnog ekstrakta *M. nigra*; MAG je oznaka za mesto na koži koje je tretirano hidrogelom sa 2% metanolnog ekstrakta *M. alba*; sa MNE je označeno mesto koje je tretirano emulzijom koja sadrži 2% metanolnog ekstrakta *M. nigra*; MAE je mesto na koži koje je tretirano emulzijom koja sadrži 2% metanolnog ekstrakta *M. alba*. Statistički značajne razlike označene su sa \*.



Slika 21. Rezultati studije bezbednosti za parametar eritema indeks



**Slika 22. Rezultati studije bezbednosti za parametar transepidermalni gubitak vode (TEWL)**

Na osnovu dobijenih rezultata sprovedene studije bezbednosti koji se odnose na vrednosti parametra eritema indeksa kao pokazatelja iritacije (Slika 21), može se konstatovati da je na mestu tretiranom hidrogelom sa 2% metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* (uzorak MNG) došlo do statistički značajnog povećanja vrednosti eritema indeksa nakon 24 h u odnosu na vrednosti pre aplikacije. Na tom mestu je koža ispitanika bila crveno obojena (Slika 23), koja se lako ispira nakon prvog pranja vodom. Očigledno je da crvena prebojenost kože potiče od boje ekstrakta, odnosno pigmenta ploda *M. nigra* prisutnog u ekstraktu, koji se inače i koristi u farmaceutskoj industriji za bojenje (Singhal i sar., 2009), te se porast iritacije u kontekstu merenja eritema indeksa ne može smatrati relevantnim.

Obe emulzije koje su sadržale ekstrakte plodova duda nisu pokazale statistički značajne vrednosti promene parametra EI, u odnosu na vrednosti pre aplikacije (bazalne vrednosti).



**Slika 23. Crvena obojenost kože na podlaktici ispitanika**

U slučaju analize parametra TEWL uočena je statistički značajna razlika na mestu tretiranom hidrogelom koji sadrži ekstrakt *M. alba* (Slika 22), u smislu smanjenja transepidermalnog gubitka vode nakon aplikacije uzorka, što jeste poželjno. Može se zaključiti da hidrogel koji sadrži 2% metanolnog ekstrakta ploda *M. alba* stvara neku vrstu zaštitnog filma na površini kože, sprečavajući gubitak vode. Rezultat za hidrogel sa ekstraktom *M. nigra* pokazuje da je došlo do povećanog odavanja vode u odnosu na vrednost pre aplikacije, ali bez statistički značajne razlike. To se eventualno može tumačiti nepovoljnim delovanjem nekog od sastojaka samog ekstrakta na barijernu funkciju kože. Ipak, povećani sadržaj odavanja vode može se tumačiti odavanjem vode iz hidrogela koji je ostao na površini kože.

Sa druge strane, kod studije bezbednosti dermokozmetičkih tj. fitopreparata tipa emulzija sa ekstraktima plodova duda, obe emulzije su pokazale malu promenu vrednosti parametara TEWL, ali bez statistički značajne razlike. Nakon aplikacije svake od emulzija sa ekstraktima duda došlo je do smanjenja vrednosti TEWL u odnosu na vrednosti pre njihove aplikacije, što je i poželjno. One verovatno formiraju neku vrstu zaštitnog filma koji sprečava odavanje vode sa površine kože, i na taj način održavaju kožu hidriranom. Takođe, može se pretpostaviti na osnovu određenog sastava ekstrakata da oni utiču pozitivno na strukturu same barijere SC.

Ipak, rezultati ove studije su pokazali dobar bezbednosni profil testiranih emulzija sa 2% metanolnim ekstraktom ploda duda u smislu izostanka iritacionog potencijala. Zbog toga, kao i zbog poželjnijih svojstava emulzija kao nosača kozmetički aktivne supstance u odnosu

na hidrogelne, dalja određivanja efekata formulacija sa ekstraktima duda (dugotrajna studija) su nastavljena sa njima.

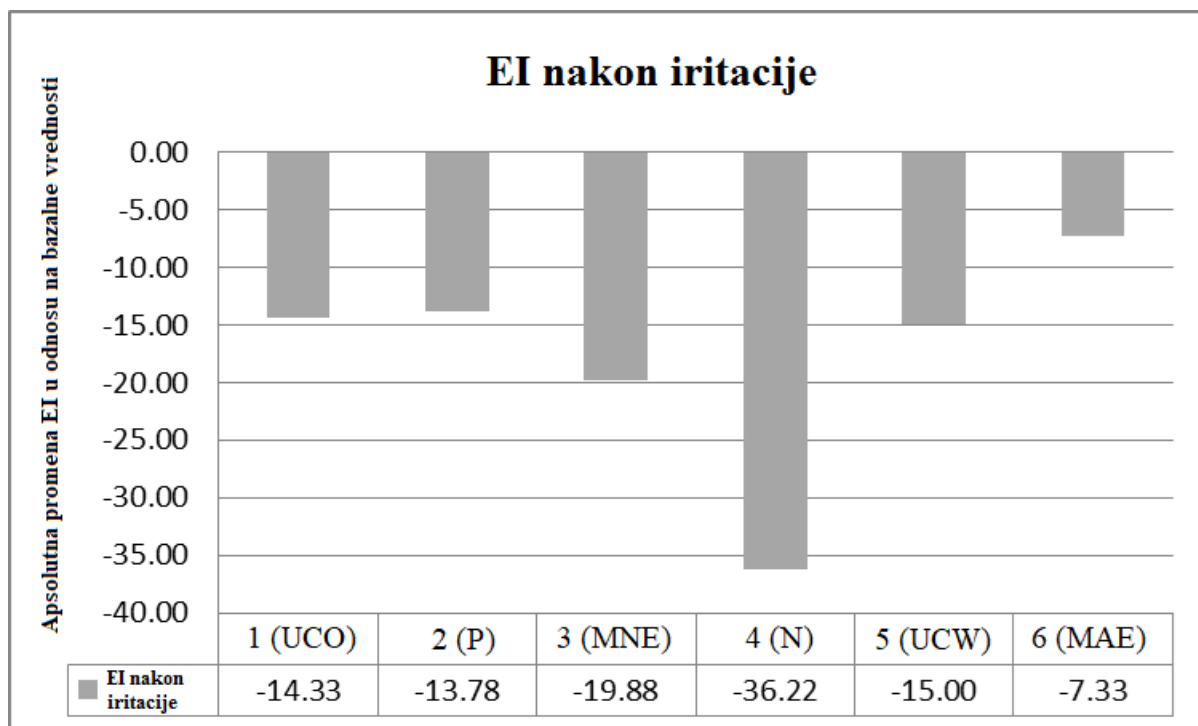
#### **4.8.5 Sedmodnevna studija efekata U/V emulzija na veštački iritiranoj koži**

Među mnogobrojnim formulacijama dermokozmetičkih proizvoda najzastupljenije su emulzije (Epstein, 2009), i one predstavljaju dobre nosače za proizvode koji se koriste u cilju nege, ali i reparacije kože, tj. kožne barijere (Epstein, 2014). U njima se mogu dispergovati/ugraditi i lipofilne i hidrofilne kozmetički aktivne supstance/komponente (Otto i sar., 2009; Epstein, 2014).

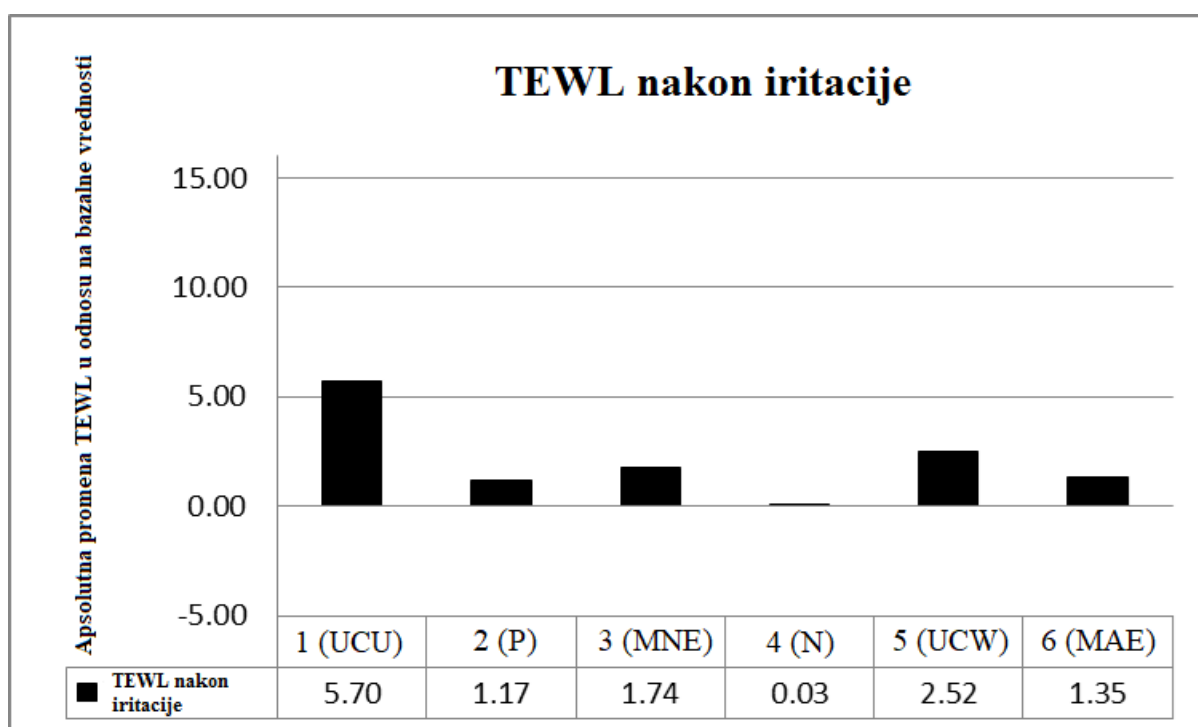
Zbog pretpostavljenih prednosti kao i zbog pokazane bezbednosti za primenu na koži, dalja testiranja su nastavljena sa emulzijama tipa U/V koje u sebi sadrže ekstrakte ploda vrsta *Morus*. Ekstrakt ploda *M. alba/M. nigra* je inkorporiran u podlogu *Unguentum emulsificans anionicum aquosum*, koja je oficinalna po Magistralnim Formulama 2008 (Magistralne Formule, 2008). Ona se koristi kao podloga za lekovite supstance koje su kompatibilne sa emulgatorima anjonskog tipa, kao hidrofilna U/V krema sa emolijentnim efektom na kožu (MF 2008).

Dakle, u ovom delu testiranja je *in vivo* efekat tokom sedmodnevne aplikacije emulzija (MNE i MAE) na kožu ispitanika koja je prethodno iritirana rastvorom NaLS. Ovaj model iritacije kože upotrebom anjonskog tenzida (Tupker i sar., 1997) je često korišćen za određivanje anti-inflamatornog potencijala preparata za lokalnu primenu na koži, imajući u vidu činjenicu da izloženost kože ovom tenzidu indukuje iritantni kontaktni dermatitis (ICD), neimunološku lokalnu inflamatornu reakciju (Kartono i sar., 2006). ICD je klinički uočljiv kao edem ili eritem i može se meriti relevantnim biofizičkim parametrima (Pinagoda i sar., 1990; Tupker i sar., 1997; Berardesca i sar., 1997; Kyidonieus i sar., 1999).

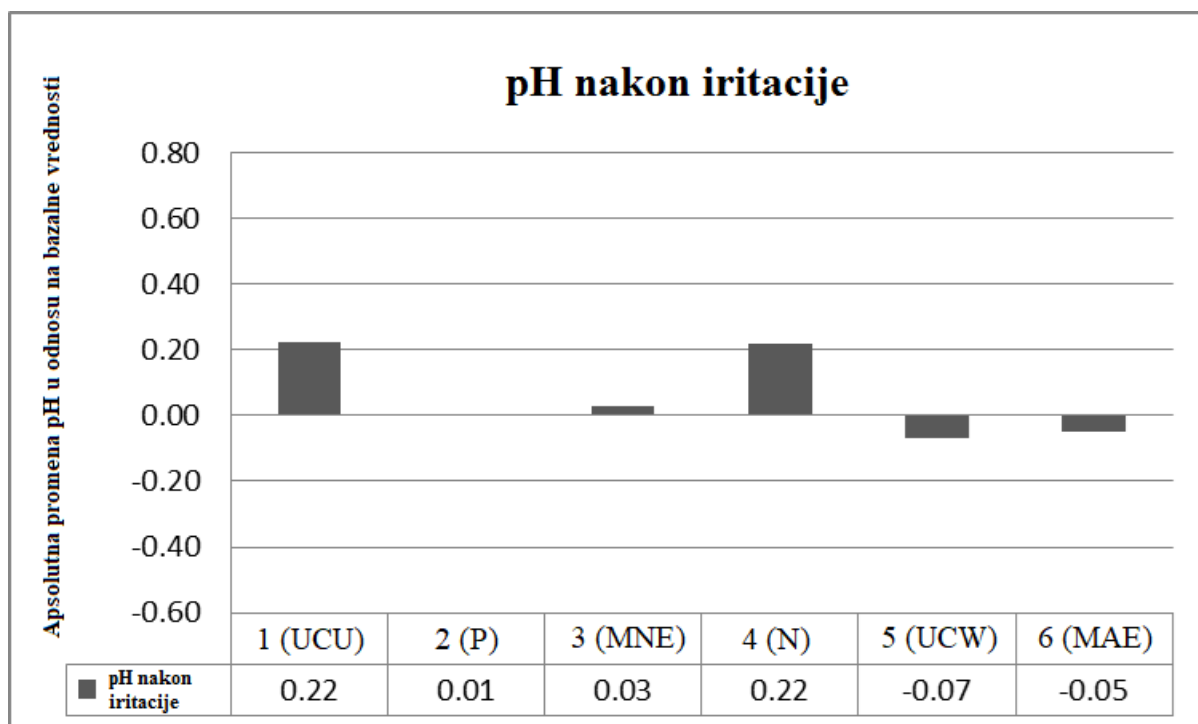
U tom smislu, najpre je izvršeno merenje parametara TEWL i EI pre, a potom i nakon izvršene iritacije. Dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 24-27 kao apsolutne razlike vrednosti parametara nakon iritacije, u odnosu na vrednosti izmerene pre indukovane iritacije (bazalne vrednosti).



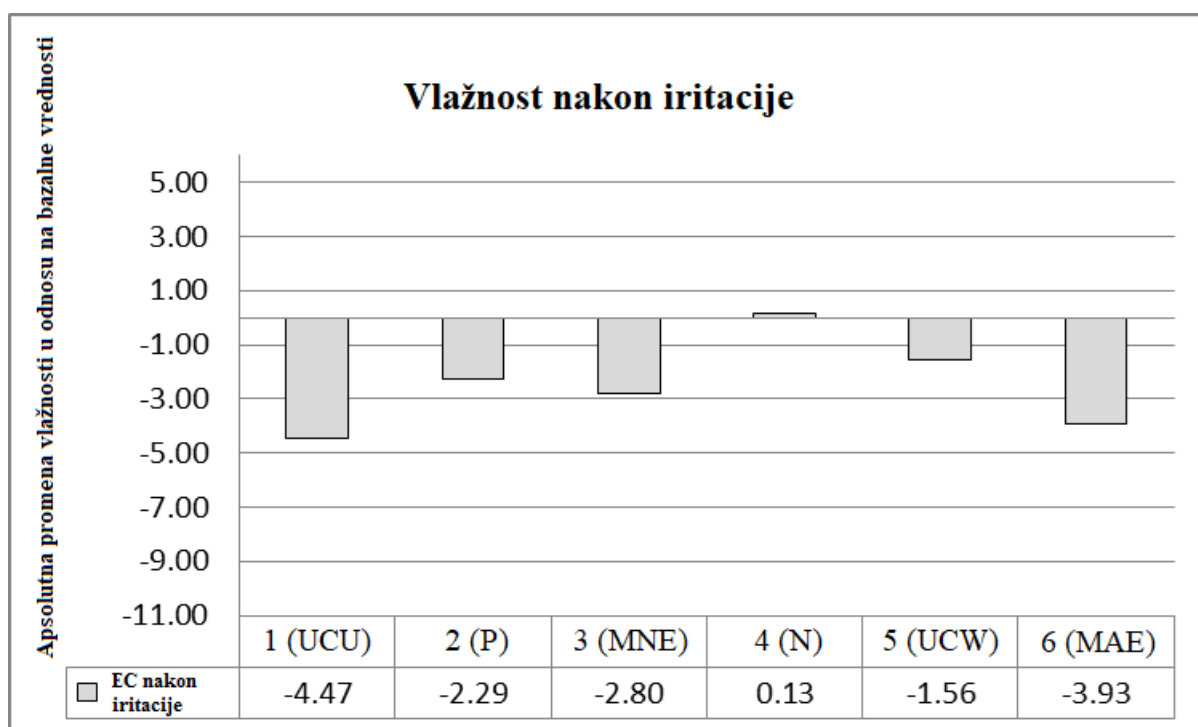
Slika 24. Rezultati za parametar eritema indeks (EI) nakon iritacije NaLS-om u poređenju sa vrednostima pre iritacije



Slika 25. Rezultati za parametar transepidermalni gubitak vode (TEWL) nakon iritacije NaLS-om u poređenju sa vrednostima pre iritacije



Slika 26. Rezultati za parametar pH nakon iritacije NaLS-om u poređenju sa vrednostima pre iritacije

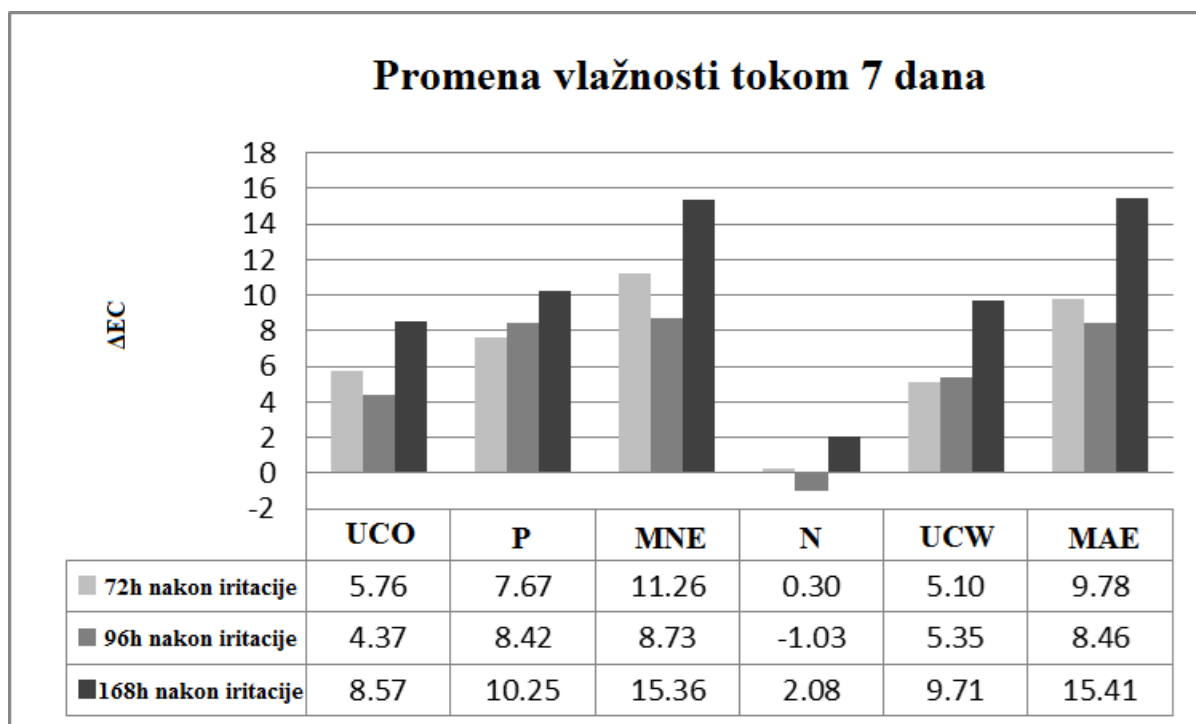


Slika 27. Rezultati za parametar vlažnost kože nakon iritacije NaLS-om u poređenju sa vrednostima pre iritacije

Mogu se uočiti promene merenih parametara nakon iritacije kože. Pri tom, kao što je i očekivano, dolazi uglavnom do porasta TEWL i pada nivoa hidratacije kože na iritiranim mestima, što se objašnjava negativnim uticajem NaLS na barijeru SC tj. njenim oštećenjem. Tačnije, okluzija kože sa 6% rastvorom NaLS su rezultovale u smanjenju vlažnosti kože, sa statistički značajnom razlikom, u odnosu na stanje pre izazivanja iritacije. Ipak, neočekivano, iritacija ne dovodi do porasta već do smanjenja vrednosti EI, mada ova smanjenja nisu bili statistički značajna.

Kontrolna i testirana mesta na koži ispitanika su označena na sledeći način: UCO je označeno mesto gde je izvršena iritacija kože ali nije bilo tretirano emulzijama; P je mesto na kome je izazvana iritacija i tretirano je podlogom; MNE je mesto tretirano emulzijom sa 2% ekstrakta ploda *M. nigra*; N je mesto na kome nije bila izvršena iritacija i nije bilo tretirano; UCW je mesto na kom je izvršena iritacija ali nije bilo tretirano emulzijama; MAE je mesto na koži koje je tretirano emulzijom sa 2% ekstrakta ploda *M. alba*. Svi ispitanici su rekli da su se pridržavali datih uputstava.

Tokom tretmana iritirane kože sa testiranim formulacijama, došlo do povećanja nivoa vlažnosti kože. Treba imati u vidu da je prethodna iritacija rezultovala smanjenjem vlažnosti. Poređenjem dobijenih vrednosti najbolje rezultate u smislu povećanja hidratacije kože su pokazale emulzije sa ekstraktima ploda *M. alba* i *M. nigra* (uzorci MNE i MAE, Slika 28). Nakon 72 h od tretmana, bilo je značajne razlike između vrednosti izmerenih na mestu N u odnosu na P, MNE i MAE. Naime, hidratacija koja je postignuta formulacijama koje su sadržale biljne ekstrakte je bila veća u odnosu na hidrataciju do koje je dovela sama podloga. Rezultati merenja nakon 96 h pokazuju statistički značajnu razliku između N u odnosu na P, MNE, UCW i MAE. Kao i nakon 72h od početka aplikacije, formulacije sa ekstraktima su pokazivale veću sposobnost vlaženja kože u odnosu na podlogu i kontrolu. Merenje nakon 168 h od početka tretmana iritirane kože je takođe pokazalo da je došlo do statistički značajnog povećanja vlažnosti kože koja nije tretirana u odnosu na mesta tretirana formulacijama. Formulacije sa ekstraktima su pokazala višu sposobnost hidratacije kože u odnosu na podlogu i kontrole ali bez statistički značajne razlike među sobom. Znajući da i sama okluzija može da dovede do povećane vlažnosti kože, rezultati za kontrole pod okluzijom nisu iznenađujuće (Savić i sar., 2009). Kako su formulacije sa ekstraktima imale višu vrednost hidratacije u odnosu na podlogu, taj rezultat se može pripisati dejstvu ekstrakata, s tim što je nakon 72 i 96 h formulacija sa ekstraktom *M. Nigra* imala bolji učinak u vlaženju kože, a nakon 168 h formulacija sa ekstraktom *M. alba* (Slika 28).



**Slika 28. Uticaj testiranih formulacija na *in vivo* merenu hidratisanost kože tokom sedmodnevnog tretmana nakon iritacije kože**

Imajući u vidu da oksidativni stres može da promeni stanje hidratisanosti ćelija (Krutmann i Yarosh., 2006), od velikog je značaja da dermokozmetička formulacija poseduje u svom sastavu komponentu koja ima antioksidativni potencijal. U takvoj formulaciji, antioksidans sprečava dejstvo slobodnih radikala koji uništavaju kolagen i elastin, i taj način narušavaju strukturu kože te mogu dovesti do njene dehidracije. Kafena kiselina pokazuje kako *in vitro* tako i *in vivo* antioksidativna svojstva, zaštitni efekat protiv UVB indukovano eritema (Sato i sar., 2011). Rutin se u dermokozmetičkim proizvodima koristi kao antioksidans i emolijens (Russo i sar., 2000; Ng i sar., 2000).

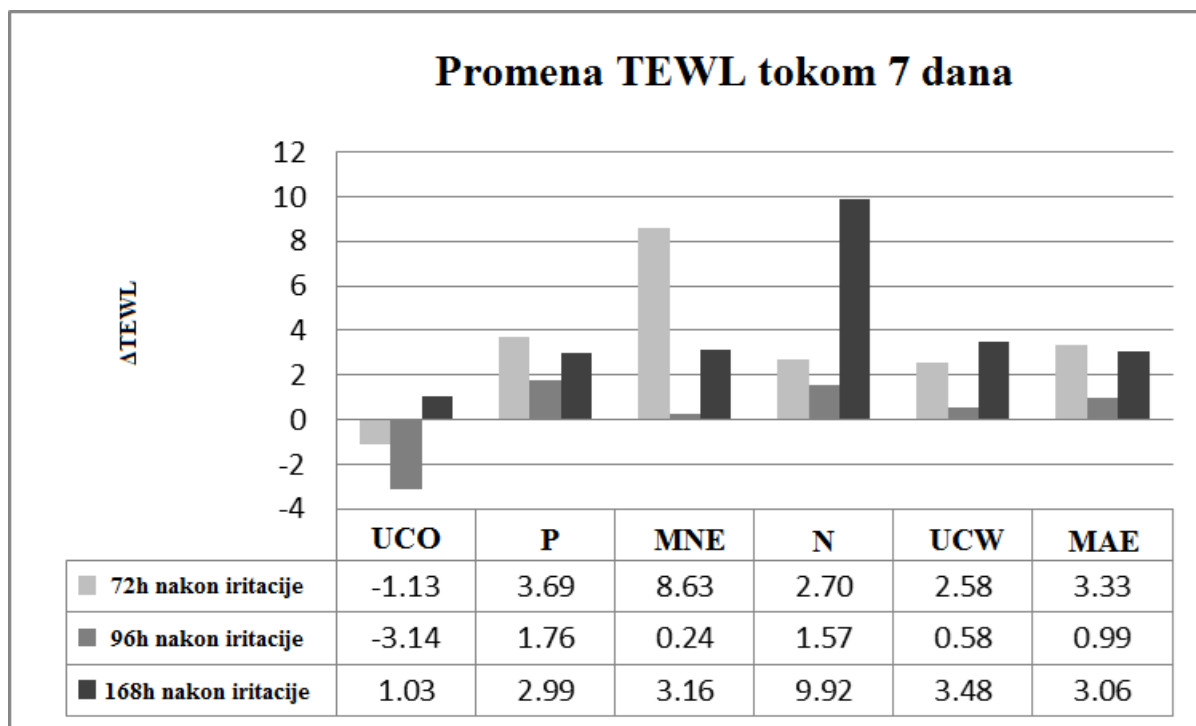
Preparati koji vlaže kožu spadaju u najbrojniju i najkorišćeniju klasu dermokozmetičkih proizvoda. Formulirani kao emulzije, oni su najčešće preporučivani preparati u dermatološkim ordinacijama. Koriste se preventivno, kao mono i dopunska terapija namenjena tretmanu brojnih patoloških stanja kože, posebno ihtioze, atopijskog dermatitisa i raznih dermatoza (Lodén, 2003). Efekat vlaženja kože nije samo površinski proces, nego često posledica funkcionalnih promena u SC i zbog toga se proizvodi sa ovim dejstvom svrstavaju u klasu dermokozmetičkih proizvoda (Fendler, 2000).

Efikasna hidratacija kože podrazumeva povećanje sadržaja vode u SC, što je uglavnom u vezi sa obnavljanjem lipidne barijere, održavanjem integriteta i lepog izgleda



kože. Dud sadrži različite aktivne sastojke kao što su limunska kiselina, vitamin C, palmitinska kiselina i antocijani (Chen i sar., 2006), koji imaju sposobnost hidratacije te se efekti fitopreparata izmereni u sedmodnevnoj studiji mogu objasniti dejstvom upravo ovih sastojaka na kožu. Kako su koži potrebni voda i lipidi, kada je lišena svojih prirodnih hidratacionih faktora, koža gubi vlažnost i elastičnost (Jeanette i Howard, 2006). Smanjenje sadržaja vlažnosti kože može dovesti do smanjenja njene elastičnosti. Anjonski tenzid (kao što je NaLS) može direktno da interaguje sa biološkim membranama i da ukloni lipide iz intracelularnog prostora *stratum corneum*-a i da dovede do dehidratacije. Povećanje apsorpcije vode, jačanje strukture i oporavak barijere iritirane kože nakon aplikacije fitopreparata sa ekstraktom duda se mogu dovesti u međusobnu vezu. Povećanje vlažnosti kože, koje je detektovano u ovoj studiji, zabeležili su i drugi istraživači (Akhtar i sar., 2012) koji su ispitivali emulziju sa ekstraktom duda, s tim što je u pitanju bio drugačiji sastav formulacije.

Parametar TEWL (Slika 29) meren tokom ove studije je u vezi sa hidratacijom kože (Slika 28). Nakon izazvane iritacije došlo je do povećanja TEWL. To se može tumačiti time što je došlo do narušavanja funkcije kožne barijere koja sprečava odavanje vode. Izmerene vrednosti nakon 3, 4 i 7 dana tretmana (uzorcima MNE i MAE) od izazvane iritacije kože, su bile veće od onih koje odgovaraju vrednostima za obe kontrole, netretirano mesto i podlogu, ali bez statističke značajnosti. To se može tumačiti povećanom apsorpcijom vode iz emulzionih sistema, koju je koža potom bila u stanju da odaje. TEWL je veličina čije vrednosti reflektuju stepen kontinualne difuzije vode iz unutrašnjosti kože, kroz SC, ka spoljašnjoj sredini (Rogiers, 2001). Kako je na osnovu rezultata za električnu kapacitivnost zaključeno da je došlo do povećanja vlažnosti, može se pretpostaviti da se upravo to dogodilo. Takođe, poznato je da i sama okluzija može da dovede do povećane vlažnosti i povećanog odavanja vode sa površine kože (Savić i sar., 2009).



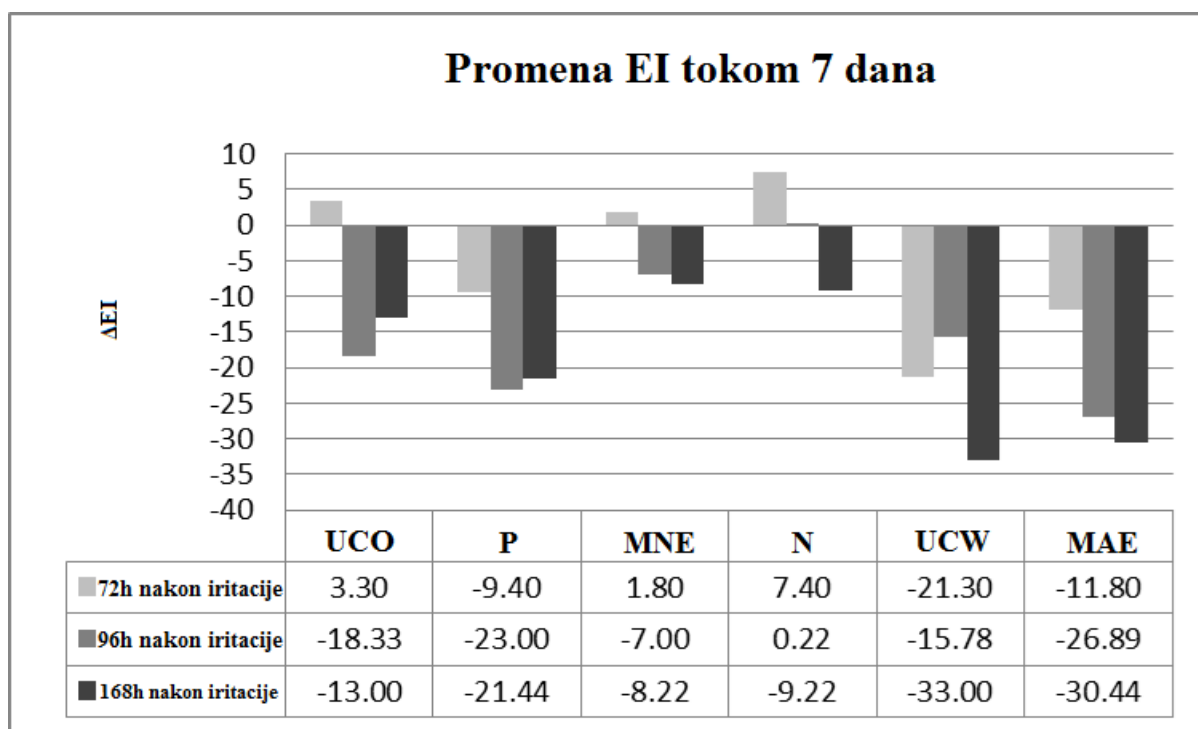
**Slika 29. Uticaj testiranih formulacija na *in vivo* mereni transepidermalni gubitak vode tokom sedam dana nakon iritacije**

Iako iritacija NaLS nije dovela do očekivanog porasta vrednosti EI na iritiranim mestima na koži, primena testiranih uzoraka na iritiranu kožu dovela je do smanjenja eritema tokom sedmodnevnog tretmana, mereno kao EI (Slika 30). Emulzija sa ekstraktom ploda *M. alba* je pokazala najbolji rezultat u smislu smanjenja vrednosti ovog parametra nakon 168 h od veštački izazvane iritacije u poređenju sa podlogom i obe kontrole. EI meren na mestu koje je nakon iritacije bilo tretirano emulzijom sa ekstraktom ploda *M. nigra* je pokazala manji EI nego netretirano mesto. U poređenju sa hidrogelom koji je sadežao isti ekstrakt, emulzioni sistem sa ekstraktom *M. nigra* nije uzrokovao crvenu obojenost kože.

Može se pretpostaviti da su neke od komponenti inkorporiranog ekstrakta odgovorne za ovakav efekat. Verovatno su u pitanju limunska kiselina i flavonoidi za koje je prethodno utvrđeno da imaju antiinflamatorno dejstvo (James i Mary, 2002), a koji se nalaze u dudu. Cijanidin-*O*-β-glukozid poseduje anti-inflamatorno dejstvo (Min i sar., 2010). Rutin ima sposobnost da spreči pojavu bora, kao i da smanji pojavu znakova starosti (npr. pega po koži) (Lee i sar., 2012). Hlorogenska kiselina sprečava foto-starenje kože i pomaže koži da obnovi svoju strukturu i vlažnost (Velazquez i sar., 2009).

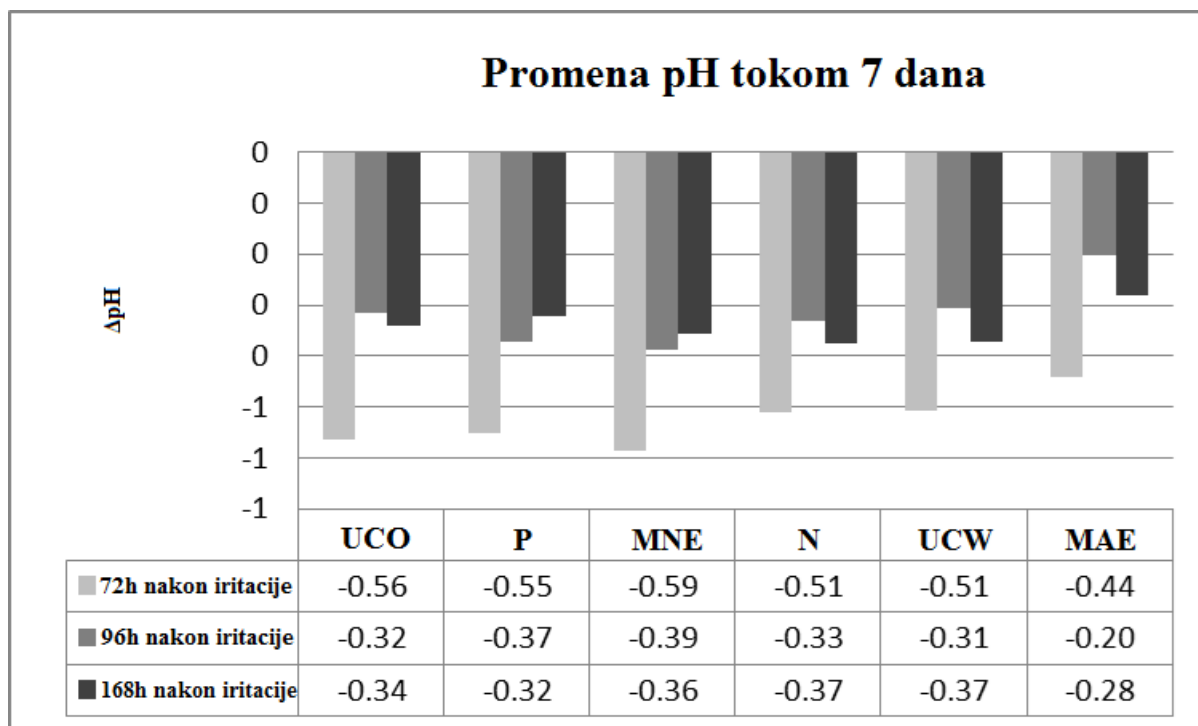
Emulzija sa ekstraktom lista dudu je testirana od strane drugih autora u cilju bržeg zarastanja rana, a upotrebljena formulacije je bila drugačijeg sastava od testirane u ovom

radu. Dobijeni su rezultati koji pokazuju reparirajući efekat emulzije sa ekstraktom duda u zarastanju rana (Bhatia i sar., 2014). U studiji emulzije sa drugom vrstom ekstrakta duda i drugačijim sastavom emulzije (Akhtar i sar., 2012) pokazan je efekat smanjenja iritacije. Dakle, rezultati studije koja je rađena u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima postignutim od strane drugih autora.



**Slika 30. Uticaj testiranih formulacija na *in vivo* mereni eritema indeks tokom sedmodnevnog tretmana nakon iritacije kože**

Nakon eksperimentalno izazvane iritacije, nije bilo veće razlike u promeni pH kože u odnosu na vrednosti pre izazvane iritacije. Prema rezultatima ove studije, aplikacija emulzije sa ekstraktom ploda *M. alba* je smanjila vrednosti pH kože koja je prethodno eksperimentalno iritirana, u manjoj meri nego sama podloga i emulzija sa ekstraktom ploda *M. nigra* (Slika 31). Testirane emulzije su bile u stanju da smanje pH vrednost kože bez istovremene iritacije, što je od značaja ako se ima u vidu da je smanjenje vrednosti pH kože često praćeno iritacijom (Smith, 1994). Međutim, promene pH vrednosti nisu bile statistički značajne u poređenju sa vrednostima nakon izazvane iritacije, a ulogu u postizanju takvih rezultata imao je verovatno i sam puferski potencijal kože (Pavlović i sar., 2013).



**Slika 31. Uticaj testiranih formulacija na *in vivo* merene vrednosti pH kože tokom sedmodnevnog tretmana nakon iritacije**

## 5. ZAKLJUČAK

1. ICP-OES analizom ekstrakata biljnog materijala *M. alba* i *M. nigra* utvrđeno je da list *M. nigra* sadrži najviše Ca (27,4 mg/g) i Si (9,1 mg/g) i to duplo više u poređenju sa *M. alba*, za koji je karakteristično da ima znatno veći sadržaj K (8,2 mg/g) i P (2,8 mg/g). Ekstrakti plodova *M. alba* i *M. nigra*, po pitanju sadržaja elemenata, ne pokazuju neku znatnu razliku. U njima su najzastupljeniji od makroelemenata K (13,4 mg/g) pa Ca (3,9 mg/g), a od mikroelemenata P (3,8 mg/g), dok su ostali registrovani elementi prisutni u znatno manjoj količini. U pogledu maksimalnog sadržaja teških metala (olova 0,096 mg/kg i kadmijuma 0,023 mg/kg, ispod MDK utvrđeno je da su plod i list *M. alba* i *M. nigra* bezbedni za upotrebu.
2. Utvrđeno je da ekstrakti plodova duda poseduju antioksidativnu aktivnost, obzirom da imaju sposobnost neutralizacije DPPH• radikala. Određene su IC50 vrednosti od 0,048 mg/cm<sup>3</sup> za suvi ekstrakt ploda *M. alba*, do 0,059 mg/cm<sup>3</sup> za ekstrakt ploda *M. nigra*. Metanolni ekstrakti plodova oba analizirana duda pokazuju manju antiradikalnu aktivnost od komercijalno korišćenih BHT i BHA.
3. Masenom spektrometrijom, u metanolnim ekstraktima plodova *M. alba* i *M. nigra* detektovana su sledeća jedinjenja: cijanidin-3-*O*-arabinozid, peonidin-3-*O*-arabinozid, delfinidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid ili glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid ili galaktozid ili malvidin-3-*O*-arabinozid, delfinidin-3-*O*-glukozid ili galaktozid, petunidin-3-*O*-glukozid ili galaktozid, malvidin-3-*O*-glukozid ili galaktozid, hininska kiselina, galna kiselina, apigenin, naringenin, apigenin, katehin, kvercetin, hlorogenska kiselina, miricetin, rutin, luteolin.
4. HPLC analizom je utvrđen kvalitativni sastav metanolnih ekstrakta. Identifikovano je 18 različitih komponenti, koje imaju povoljan efekat na fiziološko stanje kože. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima – kafena kiselina, hlorogenska kiselina, rutin i cijanidin-*O*-β-glukozid, doprinose efektu vlaženja, smanjenja iritacije i povećane hidratisanosti kože.
5. GC i GC/MS analizom uzoraka etarskih ulja svežeg i osušenog lišća *M. alba* i *M. nigra*, dobijenih hidrodestilacijom, identifikovano je oko 130 konstituenta.

Najzastupljenije klase identifikovanih jedinjenja su alkani i diterpenoidi, koji zajedno čine više od 60% uzorka. Preostale identifikovane isparljive komponente pripadaju karotenoidima (1,4 – 24,8%) ili jedinjenjima masnih kiselinama (u tragovima – 8,1%). Povećan broj karotenoidnih derivata i (Z)-bovolida u etarskom ulju lišća *M. alba* je rezultat procesa sušenja, što može značajno da utiče na organoleptičke karakteristike i biološko/farmakološki potencijal analiziranog biljnog materijala.

6. Bovolid, novoidentifikovana supstanca, čije je prisustvo potvrđeno samo u osušenom lišću duda, može se koristiti u proceni svežine biljnog materijala.
7. U *in vitro* uslovima je ispitana antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra* na bakterijskim ATCC sojevima kao i na izolatima rana. Rezultati su pokazali da je metanolni ekstrakt *M. nigra* aktivniji od ekstrakta *M. alba*. Najbolja antimikrobna aktivnost je zapažena protiv soja ATCC 12228 *Staphylococcus epidermidis* i *Proteus mirabilis* iz izolata rane, MIC/MBC=62,52/125,05 mg/cm<sup>3</sup>. Protiv bakterijskog soja *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, ekstrakt *M. nigra* je imao MIC/MBC=31,26/251,00 mg/cm<sup>3</sup>. Ekstrakt *M. alba* je pokazao slabiju inhibitornu aktivnost pri najvećoj koncentraciji protiv 73% testiranih bakterijskih sojeva. Dejstvo je ostvareno protiv sojeva *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* i *Streptococcus pyogenes* (MIC=MBC=100 mg/cm<sup>3</sup>).
8. Rezultati antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata ploda *M. alba* i *M. nigra* su upoređeni sa test antibioticima: metronidazol, doksiciklin, ciprofloksacin, gentamicin. Potrebna je 11 puta veća koncentracija ekstrakta ploda *M. nigra* u odnosu na potrebnu koncentracije metronidazola, 13 puta u odnosu na doksiciklin, 76 puta u odnosu na ciprofloksacin i oko 100 puta u odnosu na gentamicin za postizanje inhibitornog efekta protiv bakterijskih sojeva koji su uzročnici nastajanja akni. Za postizanje baktericidnog efekta protiv istih sojeva bila je potrebna 9 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, 32 puta u odnosu na doksiciklin, 64 puta u odnosu na ciprofloksacin i 60 puta u odnosu na gentamicin. Za postizanje inhibitornog efekta protiv bakterijskih sojeva uzročnika ostalih infekcija bila je potrebna oko 6 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, 12 puta u odnosu na doksiciklin, 25 puta u odnosu na ciprofloksacin i skoro 30 puta u odnosu na gentamicin. Za postizanje baktericidnog efekta protiv istih sojeva bila je

potrebna 4 puta veća koncentracija ekstrakta *M. nigra* u odnosu na metronidazol, skoro 19 puta u odnosu na doksiciklin, 22 puta u odnosu na ciprofloksacin i 19 puta u odnosu na gentamicin.

9. Utvrđeno je da je aglikonska komponenta metanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* aktivnija protiv Gram (+) bakterija. MIC/MBC aglikona *M. alba* je bila u opsegu 14,72-58,88/29,44-117,76 mg/cm<sup>3</sup>. Najniža koncentracija bila je potrebna za dejstvo na *Stafilococcus epidermidis*. Vrednosti za aglikon *M. nigra* bile su MIC/MBC u opsegu 30,36-121,45/121,45-484,80 mg/cm<sup>3</sup>. Aglikon metanolnog ekstrakta *M. alba* poseduje veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa aglikonom *M. nigra* na Gram (+) bakterije. Kada je reč o rezultatima antimikrobnog delovanja na Gram (-) bakterijama, koncentracije MIC/MBC aglikona *M. alba* su bile u opsegu 29,44-117,76/117,76-942,05 mg/cm<sup>3</sup>, a *M. nigra* 60,73-121,45/121,45-484,80 mg/cm<sup>3</sup>. Aglikonska komponenta ekstrakta *M. alba* je u nižim koncentracijama postizala inhibiciju rasta. Bila je potrebna niža koncentracija aglikona *M. nigra* za postizanje baktericidnog efekta u odnosu na aglikon *M. alba*.
10. Izrađeni su fitopreparati za lokalnu primenu na koži (tipa hidrogela i U/V emulzija) sa metanolnim ekstraktom ploda *Morus* kao aktivnom supstancom u procentu od 2%. Za izradu emulzija U/V tipa korišćena je podloga *Unguentum emulsificans anionicum aquosum*, koja je oficinalna po Magistralnim Formulama 2008. Hidrogel sa ekstraktom *M. nigra* dovodi do crvene obojenosti kože koja se uklanjala nakon jednog spiranja vodom te se pokazao kao neadekvatan za korišćenje. Hidrogel sa ekstraktom *M. alba* postigao smanjenje transepidermalnog gubitka vode. Formulirani hidrogeli i emulzioni sistemi sa ekstraktima su bezbedni za dermalnu primenu. Emulzije su se pokazale kao prikladni nosači za ispitivane ekstrakte.
11. U/V emulzije sa metanolnim ekstraktima ploda duda poseduju zadovoljavajuće i poželjne reološke karakteristike – pokazuju pseudoplastično tečenje koje omogućava stvaranje koherentnog filma na površini kože, kao i tiksotropiju. Takođe, imaju očekivane organoleptičke karakteristike – homogen izgled bez grudvica, blag miris na upotrebne sastojke i sjajnu površinu.

12. Formulirani fitopreparati tipa U/V emulzija za lokalnu primenu na koži ispunjavaju odredbu Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljeti u promet koja se tiče pH vrednosti. Na osnovu fizičkih osobina smatraju se preliminarno stabilnim.
13. Od formuliranih fitopreparata za lokalnu primenu na koži se očekuje da odgovaraju odredbi Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljeti u promet koja se tiče maksimalne količine teških metala koji smeju biti otpušteni iz proizvoda koji dolaze u kontakt sa kožom.
14. Testiranjem delovanja fitopreparata tipa emulzionih U/V sistema za lokalnu primenu na koži sa metanolnim ekstraktom ploda *Morus* vrsta i *in vivo* merenjem biofizičkih parametara kože ispitanika, zaključeno je da imaju pozitivno dejstvo na stepen hidratacije kože. Takođe, zabeleženi su efekti kao što su smanjenje odavanja vode sa površine tretirane kože, smanjenja iritacije i smanjenja pH vrednosti tretirane kože na kojoj je prethodno eksperimentalno izvršena iritacija, mada bez statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti nakon izvršene iritacije.



## 6. LITERATURA

Adams R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Ed. 4. Allured Publishing Corporation, Carol Stream (2007) 1-698.

Akhat N., Hisham J., Khan H.M.S., Khan B.A., Mahmood T., Saeed T., Whitening and antierythemic effect of a cream containing *Morus alba* extract, *Journal of Drugs and Medicines* 4(1) (2012) 97-103.

Akhtar N., Hisham J., Khan B.A., Khan H.M.S., Mahmood T., Rasul A., Iqbal M., Qayum M., Cosmetic application of phenolic cream from mulberry bark extract, *Asian Journal of Chemistry* 24(4) (2012) 1805-1808.

Ananthaswamy H.N., Pierceall W.E., Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis, *Photochemistry and Photobiology* 52 (1990) 1119-1136.

Arabshahi-Delouee S., Urooj A., Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves, *Food Chemistry* 102 (2007) 1233-1240.

Auldridge M.E., McCarty D.R., Klee H.J., Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products, *Current Opinion in Plant Biology* 9 (2006) 315–321.

Asano N., Oseki K., Tomioka E., Kizu H., Matsui K., N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities, *Carbohydrate Research* 259 (1994) 243–255.

Azue J., Mudroch A., Comparasion of different ashing and digestion methods for analizis of trace elements in vegetation, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 57 (1994) 151-162.

Bajaksouzian S., Visalli M.A., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (1997) 1073-1076.

Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A., Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution, *Cell* 102(5) (2000) 615–23.

Bastianetto S., Zheng W.H., Quirion R., Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide related toxicity in cultured hippocampal neurons, *British Journal of Pharmacology* 131 (2000) 711-720.

Baumann L., Kozmetička dermatologija: načela i praksa, Prvo izdanje na hrvatskom jeziku, Interpreta usluge d.o.o., Zagreb (2011).

Berardesca E., EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods, *Skin Research and Technology* 3 (1997) 126-132.

Berger R.G., Drawert F., Kollmannsberger H., The flavor of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 188 (1989) 122–126.

Berger-Jekić O., Jovanović K.M., Kocić B., Kulauzov M., Nedeljković R.M., Otašević M., Pecić J., Švabić-Vlahović M., Specijalna bakteriologija, IŠP „Savremena administracija“ D.D., Beograd (1997).

Bhatia N., Singh A., Sharma R., Singh A., Soni V., Singh G., Bajaj J., Dhawan R., Singh B., Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of *Morus alba* based cream in rats, *The Journal of Phytopharmacology* 3(6) (2014) 378-383.

Bleckmann A, Kropke R, Schneider G.U., Preparations of the W/O emulsion type with increased water content, and comprising cationic polymers, United States Patent (2006) 7138128.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V., Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annals of Botany* 91 (2000) 179–194.

Bocca B., Pino A., Alimonti A., Forte G., Toxic metals contained in cosmetics: a status report, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 68(3) (2014) 447–467.

Boidingh J., Taylor R.J., Trace constituents of butterfat. Isolation and identification of unsaturated aliphatic lactones, *Nature* 194 (1962) 909-913.

Bondet W., Williams B., Berset C., Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *LWT – Food Science and Technology* 30 (1997) 609-615.

Cotelle N., Role of flavonoids in oxidative stress, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (2001) 569-590.

Bonikowski R., Świtakowska P., Kula J., Synthesis, odour evaluation and antimicrobial activity of some geranyl acetone and nerolidol analogues, *Flavour and Fragrance Journal* 30 (2015) 238–244.

Bose P.C., Genetic resources of mulberry and utilization, Mysore, CSIR and TI (1989) 183-190.

Bown D., Encyclopedia of herbs and their uses, Dorling Kindersley, Michigan (1995) 1-424.

Bradamante S., Barenghi L., Villa A., Cardiovascular protective effects of resveratrol, *Cardiovascular Drug Reviews* 22(3) (2004) 169-188.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie* 28 (1995) 25-30.

Brooks G., Butel J., Morse S., Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology, 23<sup>th</sup> ed, The McGraw – Hill Companies, London (2004) 223.

Butt M.S., Nazir A., Tauseef Sultan M., Schroen K., *Morus alba* L. nature's functional tonic, *Trends in Food Science & Technology* 19 (2008) 505-512.

Carrazone C., Mascherpa D., Gazzani G., Papetti A., Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 138 (2013) 1062-1071.

Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Kuo W.H., Chiang C.L., Hsieh Y.S., Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line, *Cancer Letters* 235 (2006) 248–259.

Chen S.D., Lu C.J., Zhao R.Z., Identification and quantitative characterization of PSORI-CM01, a Chinese medicine formula for psoriasis therapy, by liquid chromatography coupled with an LTQ orbitrap mass spectrometer, *Molecules* 20(1) (2015) 1594-1609.

Chen Y.C., Tien Y.J., Chen C.H., Francesca N.B., Evangeline C.A., Ran-Juh W., Den-Jen W., Clément M., Yea-Lih L., Wen-Chin Y., *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert antiinflammatory activity *via* inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling, *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2013) 13-45.

Chou T.C., Talalay P., Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances in Enzyme Regulation* 22 (1984) 27-55.

Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., Zervos, M.J., Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis, *Antimicrob Agents Chemother* 37(11) (1993) 2474–7.

Chevallier A., The encyclopedia of medicinal plants, London: Dorling Kindersley Limited, London (1996).

Choi C.M., Berson D.S., Cosmeceuticals, *Seminars in cutaneous medicine and Surgery* 25 (2006) 163-168.

Chung K.O., Kim B.Y., Lee M.H., Kim Y.R., Chung H.Y., Park J.H., Moon J.O., *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55(12) (2003) 1695–1700.

Clifford M.N., Scalbert A., Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food Agriculture* 80 (2000) 1118-1125.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement, Wayne, PA, USA (2009) M100-S19.

CodexStan,(1995)[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/livestockgov/documents/1\\_CXS\\_193e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf)

Cody V., Middleton E.J.R., Harborne J.B., Beretz A., Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular, and medicinal properties, Alan R. Liss Incorporated, New York (1988) 107–121.

COLIPA Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic products, Third Edition, May 2008.

Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff, *Official Journal of European Union* 2006 L364/5.

Coors E.A., Seybold H., Merk H.F., Mahler V., Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 95(6) (2005) 593-99.

Cowan M.M., Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology Reviews* 12(4) (1999) 564-582.

Yahyaa M., Bar E., Dubey N.K., Meir A., Davidovich-Rikanati R., Hirschberg J., Aly R., Tholl D., Simon P.W., Tadmor Y., Lewinsohn E., Ibdah M., Formation of norisoprenoid flavor compounds in carrot (*Daucus carota* L.) roots: characterization of a cyclic-specific carotenoid cleavage dioxygenase 1 gene, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 12244–12252.

Čajkanović V., Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama, Beograd (1994) 82.

Darias-Martin J., Lobo-Rodrigo G., Henrnandez-Cordero J., Diaz E., Diaz-Romero C., Alcoholic beverages obtained from black mulberry, *Food Technology and Biotechnology* 41(2) (2003) 173-176.

Darr D., Fridovich I., Free radicals in cutaneous biology, *Journal of Investigative Dermatology* 102 (1994) 671-675.

Demole E., Berthet D., A chemical study of burley tobacco flavor (*Nicotiana tobacum* L.). Volatile to medium-volatile constituents, *Helvetica Chimica Acta* 55 (1972) 1866–1882.

Di Mambro V.I., Azzolini A.E.C.S., Valim Y.M.L., Fonseca M.J.V., Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 262 (2003) 93-99.

Dimitrijević D., Analiza hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata duda (*Morus spp.*, Moraceae), doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Niš (2014).

Dixon R.A., Paiva N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7 (1995) 1085-1097.

Doi K., Kojima T., Makino M., Kimura Y., Fujimoto Y., Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49(2) (2001) 151-153.

Du J., He Z.D., Jiang R.W., Ye W.C., Xu H.X., But P.P.H., Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L., *Phytochemistry* 62 (2003) 1235–1238.

Du Q., Zheng J., Xu Y., Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity, *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008) 390-395.

Economic Division, updated on 27.09.2012. central silk board.

Duraković S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno- tehnološki inženjering, Zagreb, (1996).

Đekić Lj., Krajišnik D., Đuriš J., Primorac J., Farmaceutsko tehnički aspekti preparata za prevenciju i lečenje poremećaja venske cirkulacije, *Arhiv za farmaciju* 63 (2013) 248-278.

Elston D.M., Epidemiology, responsible allergens, and management, *Journal of the American Academy of Dermatology* 58(1) (2008) 1-21.

El Hadi M.A.M., Zhang F.J., Wu F.F., Zhou C.H., Tao J., Advances in fruit aroma volatile research, *Molecules* 18 (2013) 8200–8229.

Epstein H., Skin care products, U: Barel AO, Paye M, Maibach HI (eds). Handbook of cosmetic science and technology, 4<sup>th</sup> ed., Boca Raton: CRC Press (2014) 103–14.

Ercisli, S., Orhan, E., Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits, *Food Chemistry* 103 (2007) 1380-1384.

Ercisli S., Orhan E., Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey, *Scientia Horticulturae* 116 (2008) 41-46.

Eugster C.H., Märki-Fischer E., The chemistry of rose pigments, *Angewandte Chemie International Edition* 30 (1991) 654–672.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition* 18 (2002) 872-879.

Fendler E.J., Physico-chemical consideration. V: Lodén M., Maibach HI (Eds.), Dry Skin and Moisturizers, 1<sup>st</sup> ed., Boca Raton: CRC Press (2000) 175-182.

Fernandez-Fernandez R., Lopez-Martinez J.C., Romero-Gonzalez R., Martinez-Vidal, J. L., Flores, M. I. A., Frenich, A. G., Simple LC–MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables, *Chromatographia* 72(1-2) (2010) 55-62.

Fernandez M.T., Mira M.L., Florenco M.H., Jenings K.R., Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study, *Journal of Inorganic Biochemistry* 92 (2002) 105–111.

Fiorani M., De Sancitis R., De Bellis R., Dacha M., Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes, *Free Radical Biology & Medicine* 32 (2002) 64–72.

Food, Drug and Cosmetics Act, FDA, 21 U.S. Code 301, 1938.

Fuchs J., Huflejt M., Rothfuss L., Wilson D., Caramo G., Packer L., Accute effects of near ultraviolet light on the cutaneous antioxidant defense system, *Photochemistry and Photobiology* 50 (1989) 739-744.

Fuhrman B., Volkova N., Suraski A., Aviram M., White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 3164-3168.

Fukai T., Hano Y., Hirakura K., Nomura T., Uzawa J., Fukushima K., Structures of two natural hypotensive diels-alder type adducts, mulberrofuran F and G, from the cultivated mulberry tree (*Morus lhou* KOIDZ.), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) 33 (1985) 3195–3204.

Galvano F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N.C., Tavazzi B., Galvano G., Cyanidins: metabolism and biological properties, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15 (2004) 2-11.

Gerasopoulos D., Stavroulakis G., Quality characteristics of four mulberry (*Morus sp.*) cultivars in the area of Chania, Greece, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (1997) 261–264.

Gerner-Smidt P., Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex, *Journal of Clinical Microbiology* 30(10) (1992) 2680–5.

Giomaro G., Karioti A., Bilia A.R., Bucchini A., Giamperi L., Ricci D., Fraternali D., Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy), *Chemistry Central Journal* 8 (2014) 45.

Girones-Vilaplana A., Baenasa N., Villanoa D., Speiskyb H., Garcia-Viguera C., Morena D.A., Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects, *Journal of Functional Foods* 7 (2014) 599-608.

Gisby J., Bryant J., Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparasion with oral and topical agents in experimental skin infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(2) (2000) 255-260.

Giuliano G., Al-Babili S., von Lintig J., Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it, *Trends in Plant Science* 8 (2003) 145–149.

Glišić S., Cakić M., Cekić N., Nikolić G., Razvoj i ispitivanje antiseptičkih bioaktivnih kozmetičkih formulacija prirodnog porekla, *Savremene tehnologije* 2(1) (2013) 5-14.

Golkar L., Ding X.Z., Ujiki M.B., Salabat M.R., Kelly D.L., Scholtens D., Fought A.J., Bentrem D.J., Talamonti M.S., Bell R.H., Adrian T.E., Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcriptional induction of macrophage inhibitory cytokine-11, *Journal of Surgical Research* 138 (2007) 163-169.

Gouvea A.C.M.S., de Araujo M.C.P., Schulz D.F., Pacheco S., Godoy R.L. de O., Cabral L.M.C., Anthocyanins standards (cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 32(1) (2012) 43-46.

Gram L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J.B., Christensen A.B., Givskov M., Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 78(1-2) (2002) 79-97.

Gundogdu M., Muradoglu F., Gazioglu Sensoy R.I., Yilmaz H., Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC, *Scientia Horticulturae* 132 (2011) 37-41.

Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications* 9 (1990) 1-32.

Halliwell B., Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence, *The Lancet* 344 (1994) 721–724.

Hakkinen S.H., Auriola S., High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, *Journal of Chromatography A* 829 (1998) 91-100.

Hakkinen S., Karenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkanen H.M., Torronen A.R., Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempherol in 25 edible berries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 2274-2279.

Hakkinen S.H., Karenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkanen H.M., Torronen A.R., Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage, *European Food Research and Technology* 212 (2000) 75-80.

Hamurcu M., Mineral and heavy metal levels of some fruits grown at the roadsides, *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 1767-1770.

Han J., Ye M., Qiao X., Xu M., Wang B.-r., Gu, D.-A., Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47(3) (2008) 516-525.

Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55 (2000) 481–504.

Harding C.R., Aho S., Bosko C.A., Fillagrin-revised, *International Journal of Cosmetic Science* 35(5) (2013) 412-23.

Hassimotto N.M.A., Genovese M.I., Lajolo F.M., Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil, *Food Science and Technology International* 13 (2007) 17-25.

Havsteen B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochemical Pharmacology* 32 (1983) 1141–1148.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal Nutrition Biochemistry* 13 (2002) 572-584.

Horita H., Hara T., Sannai A., Fujimori T., The light-induced volatile components of green tea, *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (1985) 3601–3603.

Heinonen M.I., Meyer A.S., Frankel E.N., Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 4107–4112.

Heinonen M., Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective, *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (2007) 684-691.

Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K., NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007, *Infection Control & Hospital Epidemiology* 29(11) (2008) 996–1011.



Hukkanen A.T., Polonen S.S., Karenlampi S.O., Kokko S., Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 112-119.

Huycke M.M., Spiegel C.A., Gilmore M.S., Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(8) (1991) 1626-34.

Hy M.A., Taher M.A., Ali M.Y., Ali M.U., Zaman S., Isolation of (+)-catechin from *Acacia catechu* (cutch tree) by a convenient method, *Journal of Scientific Research* 1(2) (2009) 300-305.

Ibrahim R.M., El-Halawany A.M., Saleh D.O., El Naggar E.M.B., El-Shabrawy A.E.-R.O., El-Hawary S.S., HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25 (2015) 134-141.

Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B., Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice, *Infection and Immunity* 45(2) (1984) 528–30.

Imran M., Khan H., Shah M., Khan R., Khan F., Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species, *Journal Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnology)* 11 (2010) 973-980.

Iwai I., Han H., den Hollander L., Svensson S., Ofverstedt L.G., Anwar J., Brewer J., Bloksgaard M., Laloef A., Nosek D., Masich S., Bagatolli L.A., Skoglund U., Norlén L., The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety, *Journal of investigative dermatology* 132(9) (2012) 2215-25.

James A.D., Mary J.B., Hand book of medicinal herbs, CRC Press, New York (2002) 772. Jeanette, M. W., Howard, I. M., Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure, *Skin Research and Technology* 12 (2006) 145.

Jin W., Na M., An R., Lee H., Bae K., Kang S.S., Antioxidant compounds from twig of *Morus alba*, *Natural Product Sciences* 8(4) (2002) 129–132.

Jugoslovenska farmakopeja 2000, prilagođeni prevod Evropske farmakopeje, Javni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja (2000).

Kalac P., Svoboda L., A review of trace elements concentration in edible mushrooms, *Food chemistry* 69 (2000) 273-281.

Karaklašević B., Peto izdanje, Mikrobiologija i parazitologija, Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga (1987).

Karlsson K., Wahlberg I., Enzell C.R., Volatile constituents of *Carphephorus corymbosus* and *Carphephorus paniculatus*, *Acta Chemica Scandinavica* 26 (1972) 3839–3848.

van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A* 11 (1963) 463-471.

Kartono F., Maibach H.I., Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response: an overview of tandem irritation studies, *Contact Dermatitis* 54 (2006) 303-312.

Kaur I., Kapila M., Agrawal R., Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing, *Ageing Research Reviews* 6 (2007) 271–288.

Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M., Berry phenolics and their antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 4076-4082.

Khalid N., Fawad S.A., Ahmed I., Antimicrobial activity phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus Nigra* L.) fresh juice, *Pakistan Journal of Botany* 43(S1) (2011) 91-96.

Kim H.M., Han S.B., Lee K.H., Lee C.W., Kim C.Y., Lee E.J., Huh H., Immunomodulating activity of a polysaccharide isolated from *Mori* cortex radices, *Archives of Pharmacal Research* 23 (2000) 240-242.

Kligman A., The future of cosmeceuticals, *Dermatologic Surgery* 31 (2005) 890-891.

Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R., Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry* 64 (2003) 923-933.

Krutmann J., Yarosh D., Modern photoprotection of human skin. In: Skin Aging (Krutmann, J. and Gilchrist, B.A., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2006) 104–112.

Kutlu T., Durmaz G., Ates B., Yilmaz I., Cetin M.S., Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.), *Turkish Journal of Biology* 35(1) (2011) 103-110.

Kydonieus F.A., Wille J.J., Biochemical modulation of skin reactions: transdermals, topicals, cosmetics, Taylor & Francis (1999).

Kyriakou, E., Primikyri, A., Charisiadis, P., Katsoura, M., Gerothanassis, I. P., Stamatis, H., Tzakos, A. G., Unexpected enzymecatalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones, *Organic & Biomolecular Chemistry* 10(9) (2012) 1739-1742.

Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y., Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity, *Food Chemistry* 97 (2006) 25-31.

Lansing M.P., John P.H., Donald A.K., Microbiology, fourth edition, The McGraw-Hill Companies Inc. (1999).

Lardelli G., Dijkstra G., Harkes P.D., Boldingh J., A new  $\gamma$ -lactone found in butter. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 85 (1966) 43-55.

Lee C.H., Moturi V., Lee Y., Thixotropic property in pharmaceutical formulations, *Journal of Controlled Release* 136 (2009) 88-98.

Lee C.Y., Sim S.M., Cheng H.M., Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract, *Nutrition Research* 28 (2008) 555-563.

Lee W., Ku S.K., Bae J.S., Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*, *Food and Chemical Toxicology* 50(9) (2010) 3048-3055.

Li W.L., Zheng H.C., Bukuru J., Kimpe N.D., Natural medicines used in the traditional Chinese medicinal system for therapy of diabetes mellitus, *Journal of Ethnopharmacology* 92 (2004) 1-21.

Lindee M., Acres of skin, The University of Chicago Press, Chicago (2000).

Liu J.X., Di D.L., Shi Y.P., Diversity of chemical constituents from *Saxifraga Montana* H., *Journal of the Chinese Chemical Society* 55(4) (2008) 863-870.

Liu R.H., Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals, *The American Journal of Clinical Nutrition* 78 (2003) 517S–520S.

Lodén M., Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders, *American Journal of Clinical Dermatology* 4 (11) (2003) 771–778.

Lodén M., The clinical benefit of moisturizers, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 19 (2005) 672–688.

Lodén M., von Scheele J., Michelson S., The influence of a humectant-rich mixture on normal skin barrier function and on once- and twice-daily treatment of foot xerosis. A prospective, randomized, evaluator-blind, bilateral and untreated-control study, *Skin Research and Technology* 19(4) (2013) 438-45.

Lopes-Lutz D., Dettmann J., Nimalaratne C., Schieber A., Simkin A.J., Schwartz S.H., Auldridge M., Taylor M.G., Klee H.J., A tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone, *The Plant Journal* 40 (2004) 882–892.

Lopes-Lutz D., Dettmann J., Nimalaratne C., Schieber A., Characterization and quantification of polyphenols in Amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius), *Molecules* 15 (2010) 8543-8552.

Lubrizol Advanced Materials, LSP-PS-PHROP-BRC: pharmaceutical polymers typical properties and specifications, Lubrizol, Cleveland (2013).

Lukić M., Pantelić I., Savić S., An overview of novel surfactants for formulation of cosmetics with certain emphasis on acidic active substances, *Tenside, surfactants, detergents* 56 (2016) 7-19.

MacLeod G., Identification of bovolide and dihydrobovolide in beef, *Food Chemistry* 40 (1991) 113–117.

Magistralne Formule, Farmaceutsko društvo Srbije, Beograd (2008).

Marinovich M., Boraso M.S., Testai E., Galli C.L., Metals in cosmetics: an a posteriori safety evaluation, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69(3) (2014) 416–424.

Martić R., Emulzije ulje u vodi koje podležu brznoj inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu (2016).

Mateos-Aparico I., Redondo-Cuebeca A., Villabueva-Suarez M.J., Zapata-Revila M.A., Tenorio-Sanz M.D., Pea pod, broad bean and okara, potential sources of functional compounds, *LTW Food Science and Technology* 43 (2010) 1467-1470.

Mattila P., Hellstrom J., Torronen R., Phenolic acids in berries, fruits and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 7193-7199.

Mehrota T., Mishra K.P., Raman G., Banerjee G., Differential regulation of free radicals (reactive oxygen and nitrogen species) by contact allergens and irritants in human keratinocyte cell line, *Toxicology Mechanisms and Methods* 15 (2005) 343–350.

Memon A.A., Memon N., Luthria D., Bhangar M.I., Pitafi A.A., Phenolic acids profiling and antioxidant of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 60 (2010) 25-32.

Milanović M., Uticaj anjonskog i nejonskog tenzida na fizičko-hemijske osobine vodenih rastvora makromolekula, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, (2016).

Miletić I., Magistralne Formule, Farmaceutsko Društvo Srbije, Beograd, (2008).

Miljković V., Arsić B., Bojanić Z., Nikolić G., Nikolić Lj., Kaličanin B., Savić V., Interactions of metranidazole with other medicines: a brief review, *Die Pharmazie* 60 (2014) 571-577.

Miljković V., Nikolić G., Nikolić Lj., Arsić B., *Morus* species through centuries in pharmacy and as food, *Advanced technologies* 3(2) (2014) 111-115.

Miljković V., Nikolić Lj., Radulović N., Arsić B., Nikolić G., Kostić D., Bojanić Z., Zvezdanović J., Flavonoids in mulberry fruit: Identification of nonanthocyanin phenolics in some mulberry fruit species (*Morus alba* L., *Morus rubra* L. and *Morus nigra* L.), *Agro FOOD Industry Hi Tech* 26(3) (2015) 38-42.

Miljković V., Nikolić G., Cekić N., Tasić Kostov M., Formulacije bioaktivnog U/V emulzionog sistema na bazi ekstrakata ploda belog i crnog duda, Tehničko rešenje (M83) – Novi tehnološki postupak, Ev. br. 06-1412/1, 29.08.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac. Usvojeno na NNV 26.09.2016. (Odluka br. 04-4/85-XVII).

Min S.W., Ryu S.N., Kim D.H., Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid, *International Immunopharmacology* 10 (2010) 959–966.

Moncrieff G., Cork M., Lawton S., Kokiet S., Daly C., Clark C., Use of emollients in dry-skin conditions: consensus statement, *Clinical and experimental dermatology* 38(3) (2013) 231-8.

Morganti P., Paglialunga S., EU borderline cosmetic products review of current regulatory status, *Clinical Dermatology* 26 (2008) 392-397.

Murray B.E., The life and times of the *Enterococcus*, *Clinical Microbiology Reviews* 3(1) (1990) 46–65.

Ng T.B., Liu F., Wang Z.T., Antioxidative activity of natural products from plants, *Life Science* 66(8) (2000) 709-723.

Nitra N., Kornkanok I., Wiroje K., Sathaporn W., Bhinai H., Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2007) 853-858.

Nuengchamnon N., Ingkaninan K., Kaewruang W., Wongareonwanakij S., Hongthongdaeng B., Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry laves usnig liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutsical and Biomedical Analysis* 44 (2007) 853-858.

O'Shea M.K., *Acinetobacter* in modern warfare, *International Journal of Antimicrobial Agents* 39(5) (2012) 363–75.

Ogura R., Sugiyama M., Nishi, J., Haramaki, N., Mechanism of lipid radical formation following exposure of epidermal homogenate to ultraviolet light, *Journal of Investigative Dermatology* 97 (1991) 1044-1047.

Otto A., du Plessis J., Wiechers J.W., Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery, *International Journal of Cosmetic Science* 31 (2009) 1–19.

Ouyang Z., Li Y.H., Xu W.D., Chen J., Determination of 1-deoxynojirimycin in leaves of *Morus alba* by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *China journal of of Chinese material medica* 30 (2005) 682-685.

Ozcan M., Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey, *Food Chemistry* 84 (2004) 437-440.

Ozgen M., Serce S., Kaya C., Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits, *Scientia Horticulturae* 119 (2009) 275-279.

Pacifico S., Galaso S., Piccoella S., Kretschmer N., Pan S.–P., Nocera P., Lettieri A., Bauer R., Monaco P., Winter wild fennel leaves as a source of anti-inflammatory and antioxidant polyphenols, *Arabian Journal in Chemistry* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.026>.

Pal R., Rheology of simple and multiple emulsions, *Current opinion in colloid & interface science* 16 (2011) 41–60.

Park K.M., You J.S., Lee H.Y., Baek N.I., Hwang J.K., Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens, *Journal of Ethnopharmacology* 84 (2003) 181–185.

Park R., Kim K.H., Lim J.W., Kim J.N., Facile synthesis of  $\gamma$ -alkylidenebutenolides from Morita–Baylis–Hillman adducts, *Tetrahedron Letters* 53 (2012) 36–40.

Pauli G.F., Kuczkowiak U., Nahrstedt A., Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids, *Magnetic Resonance in Chemistry* 37(11) (1999) 827-836.

Parrotta J. A., Healing Plants of Peninsular India, Wallingford, UK, CABI Publishing, Rio Piedras, Puerto Rico (2001).

Pathak D., Pathak K., Singla A.K., Flavonoids as medicinal agents—recent advances, *Fitoterapia* 62 (1991) 371–389.

Pavlović D.R., Tasić-Kostov M., Marčetić M., Lakušić B., Kitić D., Savić S., Kovačević N., Evaluation of *in vivo* effects on surfactant-irritated human skin, antioxidant properties and phenolic composition of five Ericaceae species extracts, *La rivista Italiana delle sostanze grasse* vol. XC ottobre/dicembre (2013) 255-264.

Pawlowska A.M., Oleszek W., Braca A., Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56 (2008) 3377-3380.

Pharmacopoeia Yugoslavica (Ph. Yug.V), Belgrade: Federal Institute of Public Health & Contemporary Administration (2000).

Piao X.-L., Mi X.-Y., Tian Y.-Z., Wu Q., Piao H.-S., Zeng Z., Wang D., Piao X., Rapid identification and characterization of antioxidants from *Ligularia fischeri*, *Archives of Pharmacol Research* 32(12) (2009) 1689-1694.

Pikulski M., Brodbelt J.S., Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14(12) (2003) 1437-1453.

Pinagoda J., Tupker R.A., Agner T., Serup J., Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis, *Contact Dermatitis* 22 (1990) 164-178.

Pothinuch P., Tongchitpakdee S., Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing, *Food Chemistry* 128 (2011) 415-419.

Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, Službeni list SFRJ (br. 18/91).

Pravilnik o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica, Službeni list SCG (br. 4/2004, 2/2004 i 48/2004).

Preedy V.R., Tea in health and disease prevention, Academic Press, London (2013) 1-1612.

Radojković M., Ekstrakti duda (*Morus* spp., Moraceae), sastav, delovanje i primena, doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2012).

Radulović N., Miljković V., Mladenović M., Nikolić G., Essential oils of *Morus alba* and *M. nigra* leaves: effect of drying on the chemical composition, *Natural Product Communications* 12(1) (2017) 115-118.

Radulović N., Dekić M., Stojanović-Radić Z., Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oils of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae), *Medicinal Chemistry Research* 21 (2012) 601–615.

Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), OJEU, L 342/59, 2009.

Rice–Evans C.A., Miller N.J., Bolwel P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., The relative antioxidant activities of plant–derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research* 22 (1995) 375– 383.

Rogiers V., EEMCO Group. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences, *Skin Pharmacology and Physiology* 14 (2001) 117-128.

Russo A., Acquaviv R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C., Virgata G., Barcellona M.L., Vanella A., Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors, *Cell Biology and Toxicology* 16(2) (2000) 91–98.

Ryan K.J., Ray C.G., Sherris Medical Microbiology (4th ed.), McGraw Hill (2004) 294-5.

Saija A., Tomaino A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T., Paolino, D., Bonina F., *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents, *International Journal of Pharmaceutics* 199 (2000) 39–47.

Sainio, E.L., Jolanki, R., Hakala, E., Kanerva, L., Metals and arsenic in eye shadows, *Contact Dermatitis* 42(1) (2000) 5–10.

Sakata I., Hashizume T., Isolation and identification of 2,3-dimethyl-4-hydroxy-2-nonenic acid lactone from shubi, *Agricultural and Biological Chemistry* 37 (1973) 2441–2442.

Saldanha L.L., Vilegas W., Dokkedal A.L., Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR, *Molecules* 18 (2013) 8402-8416.

Sannai A., Fujimori T., Kato K., Neural volatile components of 'kukoshi' (*Lycium chinese* M.), *Agricultural and Biological Chemistry* 47 (1983) 2397–2399.

Saraf S., Chhabra S.K., Kaur C.D., Saraf S., Development of photochemoprotective herbs containing cosmetic formulations for improving skin properties, *Journal of Cosmetic Science* 63 (2012) 119–31.

Sarić M., Lekovite biljke SR Srbije. Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd (1989).

Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M.M., Toth Markus M., Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables, *Food Research International* 38(8-9) (2005) 1023-1029.

Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K., *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid, *International Journal of Pharmaceutics* 403 (2011) 136–138.



Savić S., Weber C., Tamburić S., Savić M., Muller-Goymann C.C., Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: the influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro/in vivo skin performance, *Journal of Pharmaceutical Science* 98 (2009) 2073–2090.

Savić S., Weber C., Savić M., Muller-Goymann C.C., Natural surfactant-based topical vehicles for two model drugs: influence of different lipophilic excipients on *in vitro/in vivo* skin performance, *International Journal of Pharmaceutics* 381 (2009) 220-230.

Schlunzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Winn W.C., Koneman E.W., Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (2006).

Schweiger D., Baufeld C., Drescher P., Oltrogge B., Höpfner S., Mess A., Lüttke J., Rippke F., Filbry A., Max H., Efficacy of a new tonic containing urea, lactate, polidocanol, and *glycyrrhiza inflata* root extract in the treatment of a dry, itchy, and subclinically inflamed scalp, *Skin pharmacology and physiology* 26(2) (2013) 108-18.

Shindo Y., Witt E., Packer L., Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light, *Journal of Investigative Dermatology* 100 (1993) 260-265.

Silva S., Matias A.A., Nunes A., Duarte C., Coelho A.V., Rosario Bronze M., Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry, *Ciencia eTecnica Vitivinicola* 20(1) (2005) 17-33.

Simirgiotis M.J., Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile, *Molecules* 18(2) (2013) 2061-2080.

Singab A.N., El-Beshbishy H.A., Yonekawa M., Nomura T., Fukai T., Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology* 100(3) (2005) 333–338.

Smith W.P., Hydroxy-acids and skin aging, *Cosmetics & Toiletries* 109 (1994) 41-47.

Stuart C.H., Schwartz S.A., Beeson T.J., Owatz C.B., *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment, *Journal of Endodontics* 32 (2006) 93–98.

Sohn H.Y., Son K.H., Kwon C.S., Kwon G.S., Kang S.S., Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai, *Phytomedicine* 11 (2004) 666-672.

Sun F., Shen L., Ma Z., Screening for lignans of human aromatase from mulberry (*Mori alba* L.) leaf by using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 126 (2011) 1337-1343.

Sykorova M., Janošova V., Štroffekova O., Košťalova D., Havranek E., Račkova L., Determination of selected elements by XRF and total phenolics in leaves and crude methanol extract of leaves of *arctostaphylos uva-ursi*, *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana* (2009) 136-145.

Tadros T., Emulsion formation and stability, Weinheim: John Wiley & Sons (2013).

Tanović S., Srpski narodni običaji u Đevđelijskoj Kazi, Srpski etnografski zbornik br.16, Beograd (1927) 431.

Tasić-Kostov M., Dermokozmetičke emulzije sa lamelarnom tečno-kristalnom fazom kao nosač za laktobionsku kiselinu – ispitivanje koloidne strukture, efikasnosti i bezbednosti, doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Beograd (2013).

Tasić-Kostov M., Vesić S., Savić S., Objective skin performance evaluation: how mild are APGs to the skin? In: Pantelic I (ed) Alkyl polyglucosides: from natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Woodhead publishing, Cambridge (2014) 135-161.

Topisirović Lj., Jovčić B., Antibiotici-molekularni mehanizmi delovanja i rezistencije, Beograd: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu (2013).

Trakoontivakorn G., Nakahara K., Shinmoto T.M., Onishi-Kameyama M., Ono H., Yoshida M., Nagata T., Tsushida T., Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4-hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49(6) (2001) 3046-3050.

Tumbas T.V., Čanadanović-Brunet J.M., Četojević-Simin D.D., Detković G.S., Đilas S.M., Gille L., Effect of rosehip (*Rose canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (2012) 1273-1281.

Tupker R.A., Willis C., Berardesca E., Lee C.H., Fartasch M., Atinrat T., Serup J., Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests, *Contact Dermatitis* 37 (1997) 53-69.

Varagić V., Milošević M., Farmakologija, Elit Medica Beograd (2008).

Vasiljević D., Priručnik iz kozmetologije, Nauka, Beograd (2007).

Vasiljević D., Savić S., Đorđević Lj., Krajišnik D. Priručnik iz kozmetologije, drugo izdanje, Nauka, Beograd (2009).

Vecchio C., Frisinghelli A., Topically applied heparins for the treatment of vascular disorders: a comprehensive review, *Clinical drug investigation* 28(10) (2008) 603-14.

Velazquez P.M.C., Dieamant G.C., Eberlin S., Nogueira C., Colombi D., Di Stasi L.C., Queiroz M.L.D.S., Effect of green *Coffea arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in vitro and ex vivo human skin models, *Journal of Cosmetic Dermatology* 8(1) (2009) 56-62.

Velimirovic D., Kaličanin B., A study of the possible harmful effects of cosmetic beauty products on human health, *Biological trace element research* 2(170) (2016) 476-484.

Vuleta G., Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom, Izdavačko preduzeće Nauka, Beograd (2004).

Vuleta G., Milić J., Primorac J., Savić S., Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu, Beograd (2012).

Wang H., Cao G., Prior R.L., Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) 304-309.

Wang Q., Xu J., Rottinghaus G.E., Simonyi A., Lubahn D., Sun G.Y., Sun A.Y., Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils, *Brain Research* 958 (2002) 439-447.

Weisglass H., Medicinska bakteriologija, Drugo izdanje, Zagreb: Jugoslovenska medicinska naklada (1989).

World Health Organization, Trace elements in human nutrition and health, WHO Library Cataloguing in Publication Data, Geneva (1996).

Willems J.L., Khamis M.M., Saeid W.M., Purves R.W., Katselis G., Low N.H., El-Aneed A., Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 933 (2016) 164-174.

Williner M.R., Pirovani M.E., Guemes D.R., Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (2003) 842–845.

Winterhalter P., Rouseff R., Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction, *ACS Symposium Series* 802 (2001) 1–17.

Wyles D.L., Kaihara K.A., Vaida F., Schooley R.T., Synergy of small molecular inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets, *Journal of Virology* 81(6) (2007) 3005-8.

Zadrnowski R., Naczki M., Mesterowicz J., Phenolic acid profiles in some small berries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 2118-2124.

Zhang W., He J., Pan Q., Han F., Duan C., Separation and character analysis of anthocyanins from mulberry (*Morus alba* L.) pomace, *Czech Journal of Food Science* 29 (2011) 268–276.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry* 64 (1999) 555-559.

Živković J., Farmakološki aktivne supstance kestena (*Castanea sativa* Mill.), doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2009).

Yaar M., Clinical and histological features of intrinsic versus extrinsic skin aging, In: *Skin Aging* (Krutmann, J. and Gilchrest, B.A., eds), 9–21. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2006).

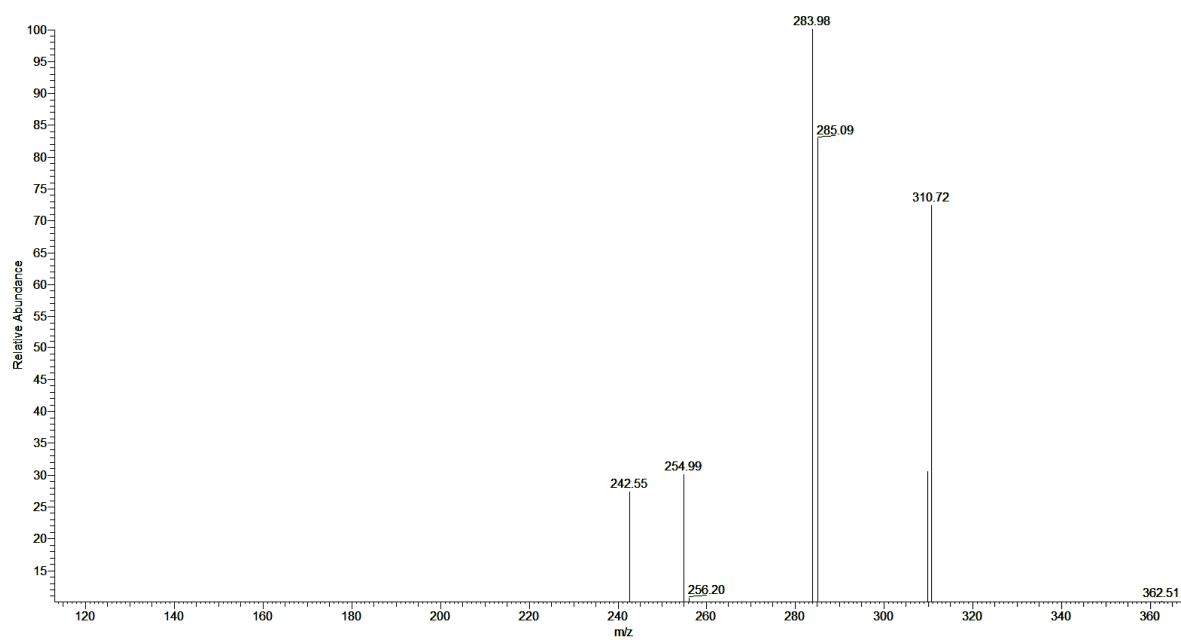
Yang X., Yang L., Zheng H., Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats, *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2374-2379.

Yang Y., Yuan X., Xu Y., Yu Z., Purification of anthocyanins from extracts of red raspberry using macroporous resin, *International Journal of Food Properties* 18 (2015) 1046–1058.

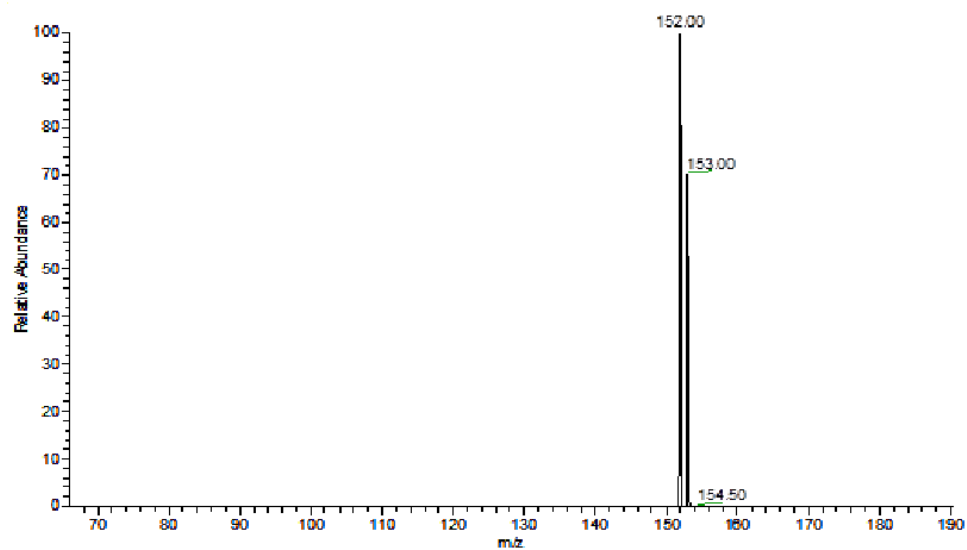
Young I.S., Woodside J.V., Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology* 54 (2001) 176–186.

Yahyaa M., Bar E., Dubey N.K., Meir A., Davidovich-Rikanati R., Hirschberg J., Aly R., Tholl D., Simon P.W., Tadmor Y., Lewinsohn E., Ibdah M., Formation of norisoprenoid flavor compounds in carrot (*Daucus carota* L.) roots: characterization of a cyclic-specific carotenoid cleavage dioxygenase 1 gene, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(2013) 12244–12252.

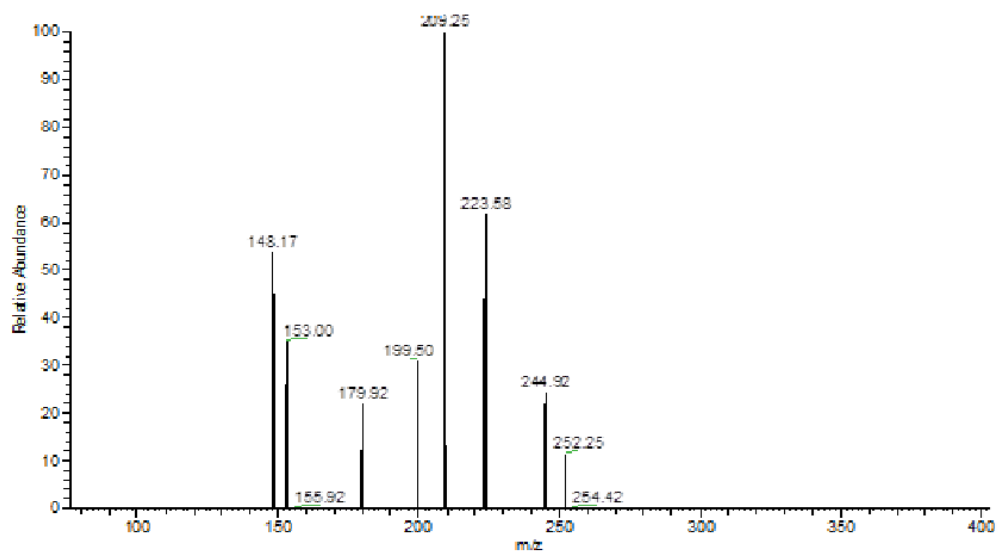
## PRILOG



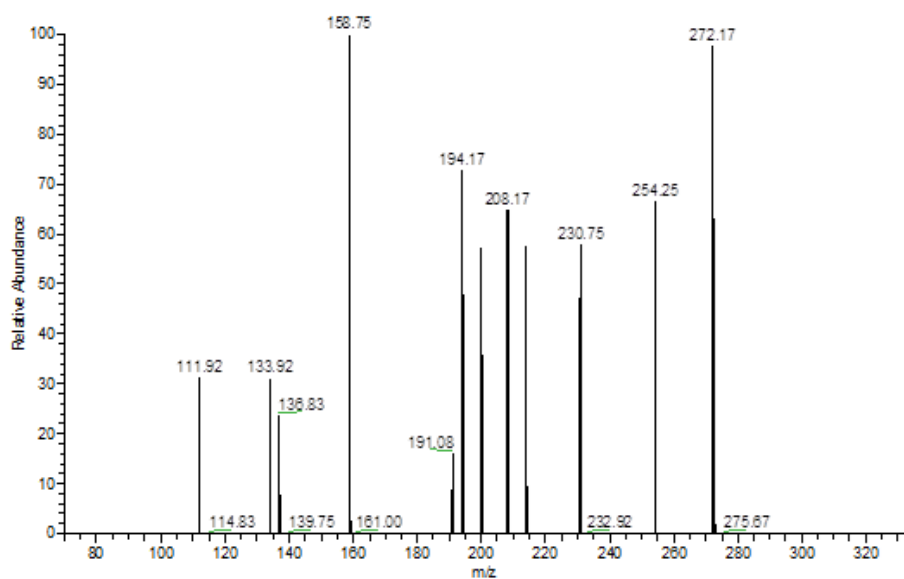
Slika 1. MS/MS spektar luteolin-glikozida m/z 285



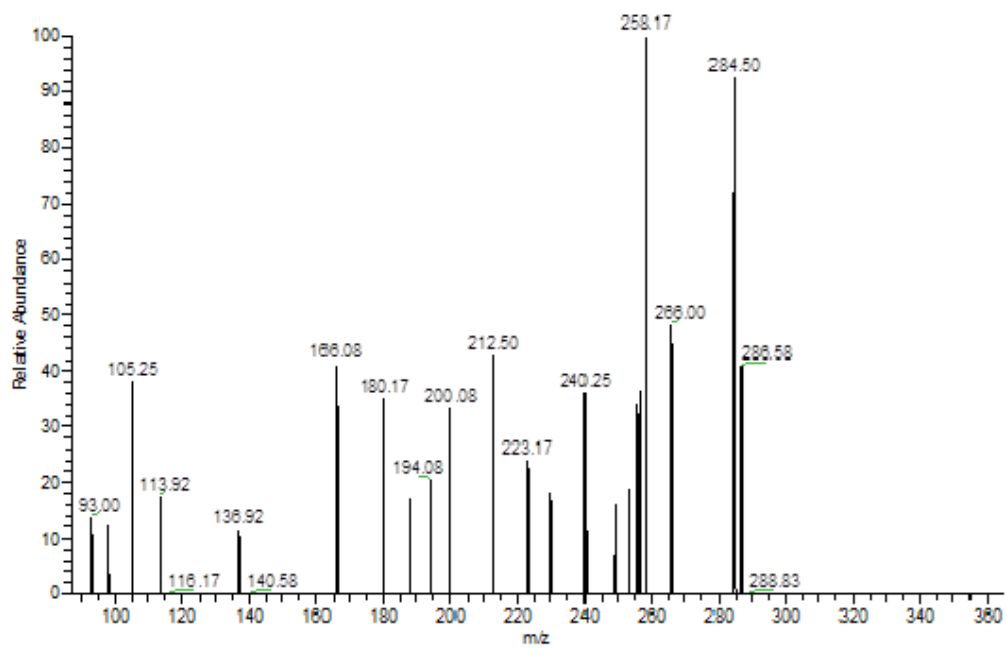
Slika 2. MS/MS spektar galne kiseline m/z 170



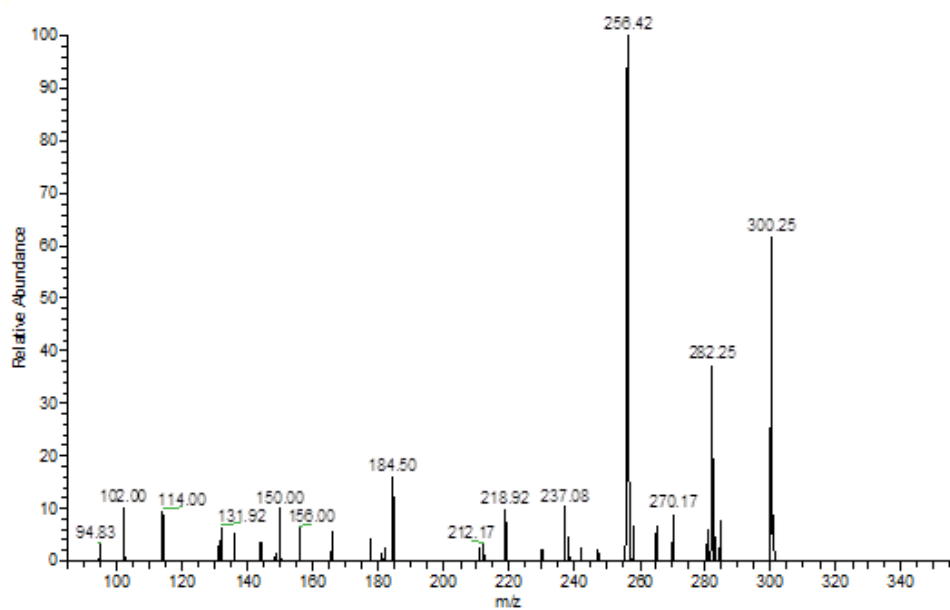
Slika 3. MS/MS spektar apigenina m/z 270



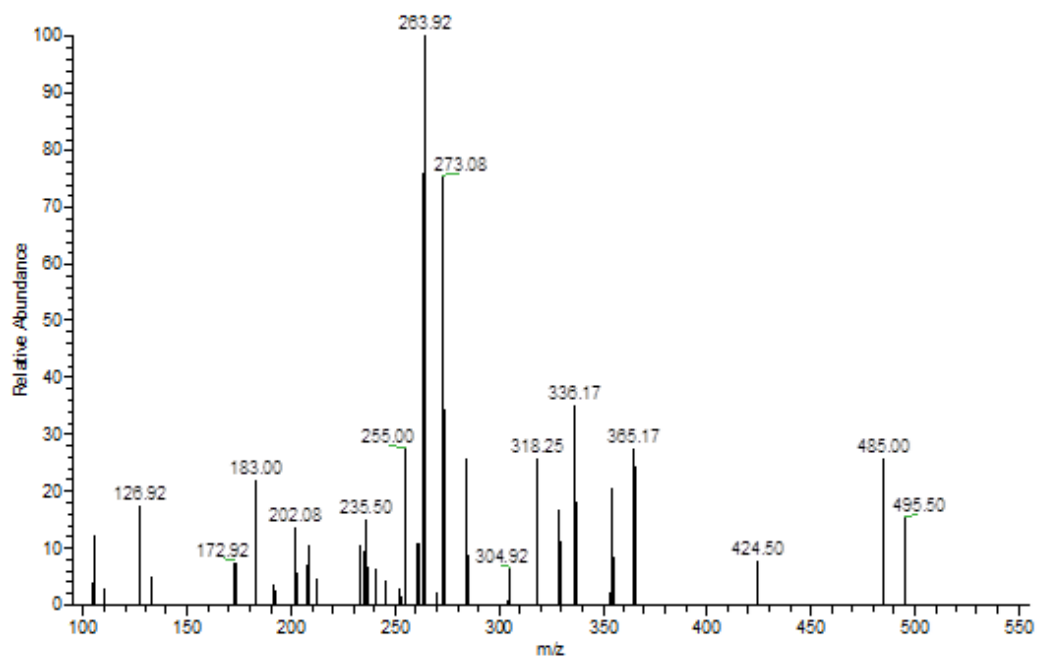
Slika 4. MS/MS spektar naringenina m/z 271



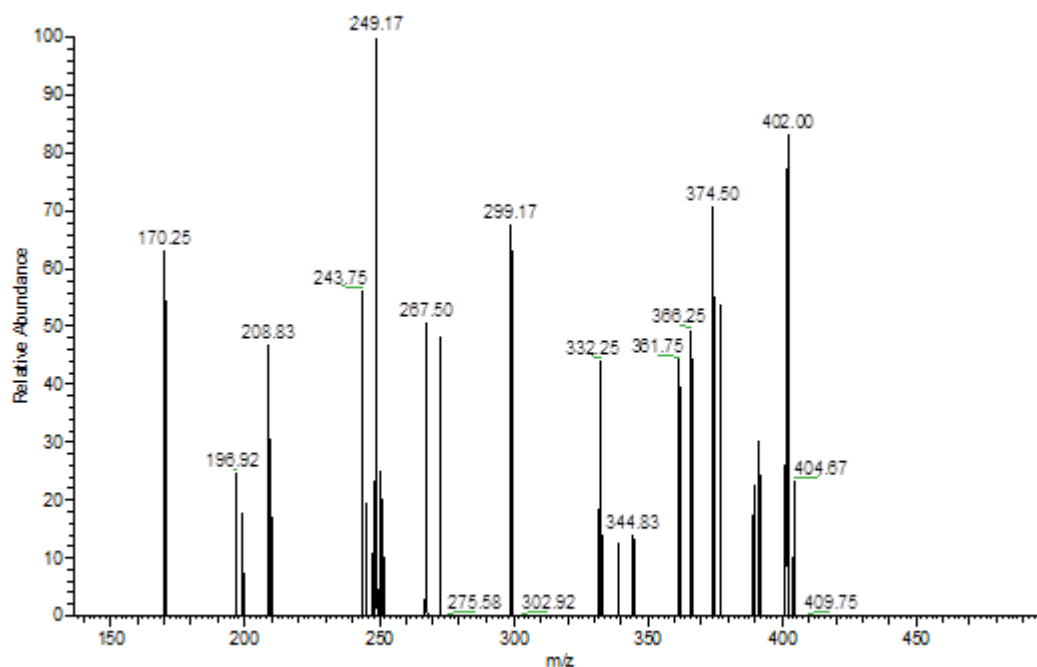
Slika 5. MS/MS spektar kvercetina m/z 302



Slika 6. MS/MS spektar miricetina na m/z 318

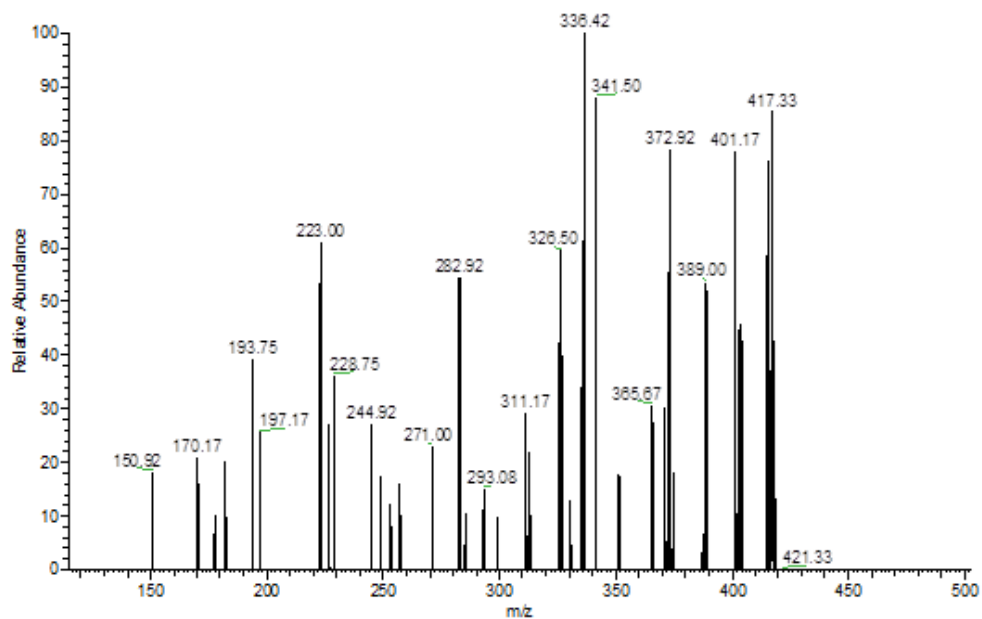


Slika 7. MS/MS spektar hlorigenske kiseline na m/z 354

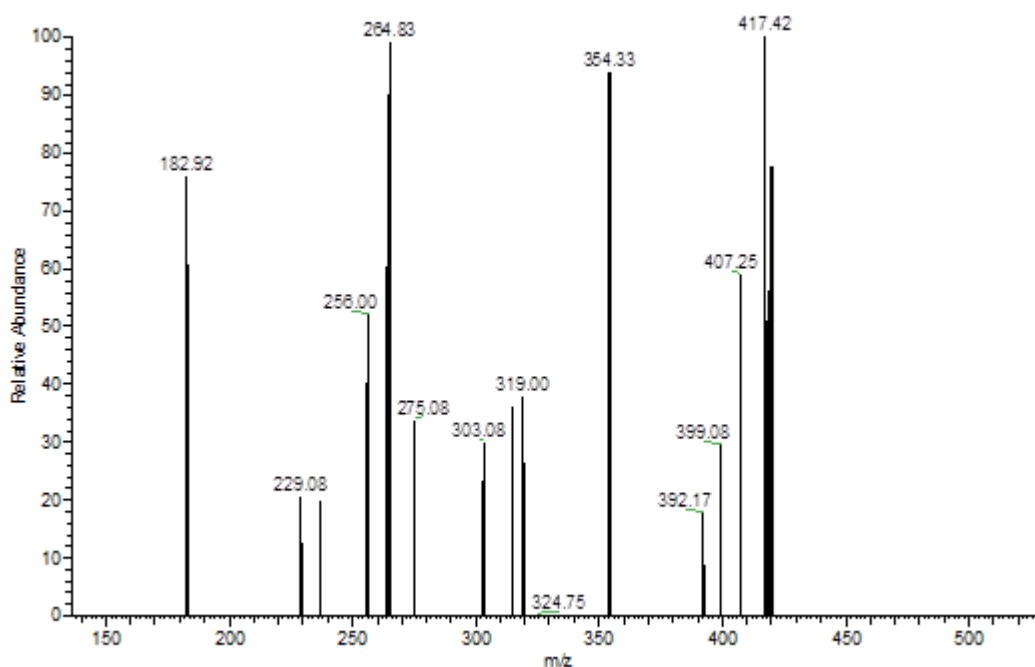


Slika 8. MS/MS spektar cijanidin-3-arabinozida na m/z 419

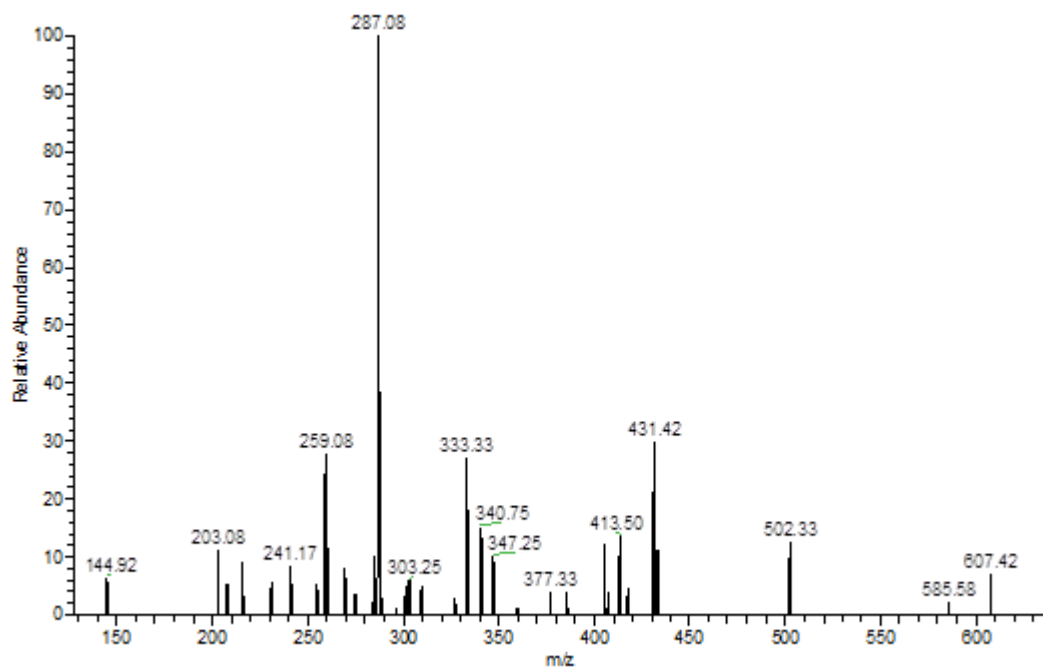




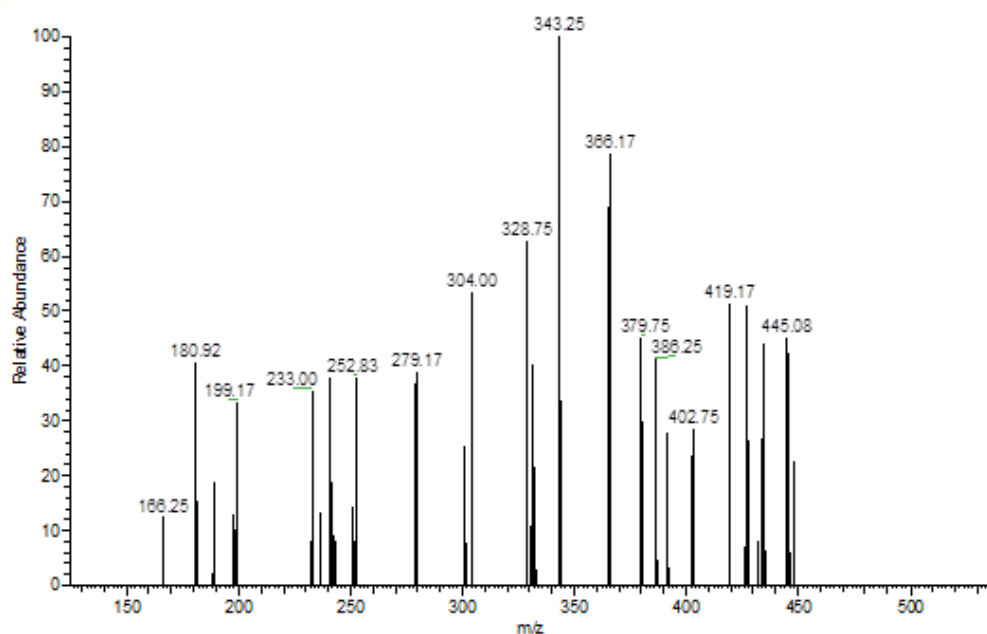
Slika 9. MS/MS spektar peonidin-3-arabinozida na m/z 433



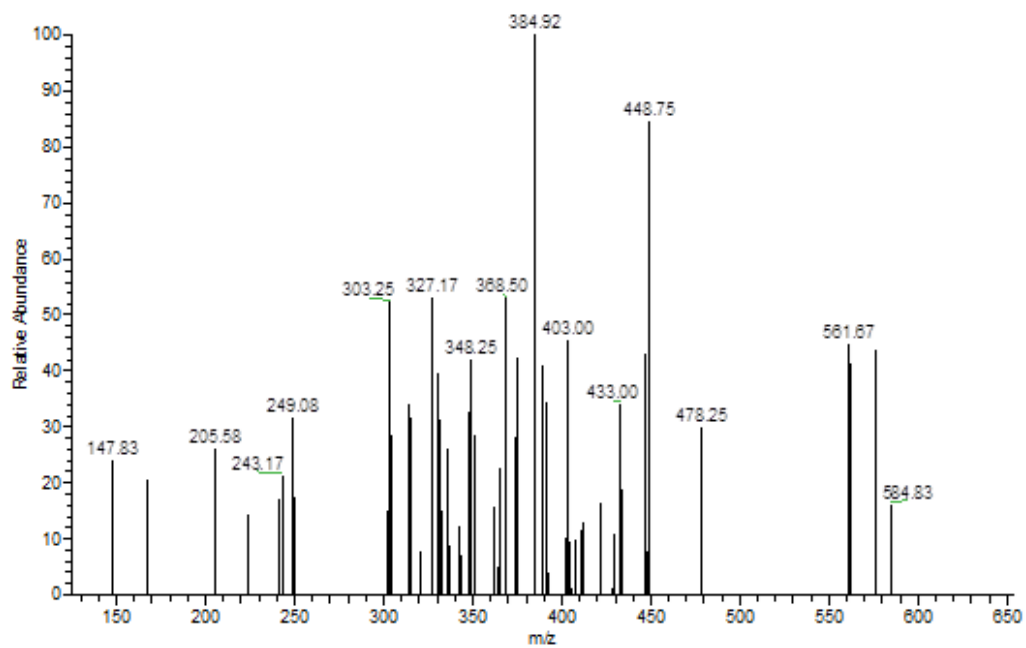
Slika 10. MS/MS spektar delfinidin-3-arabinozida na m/z 435



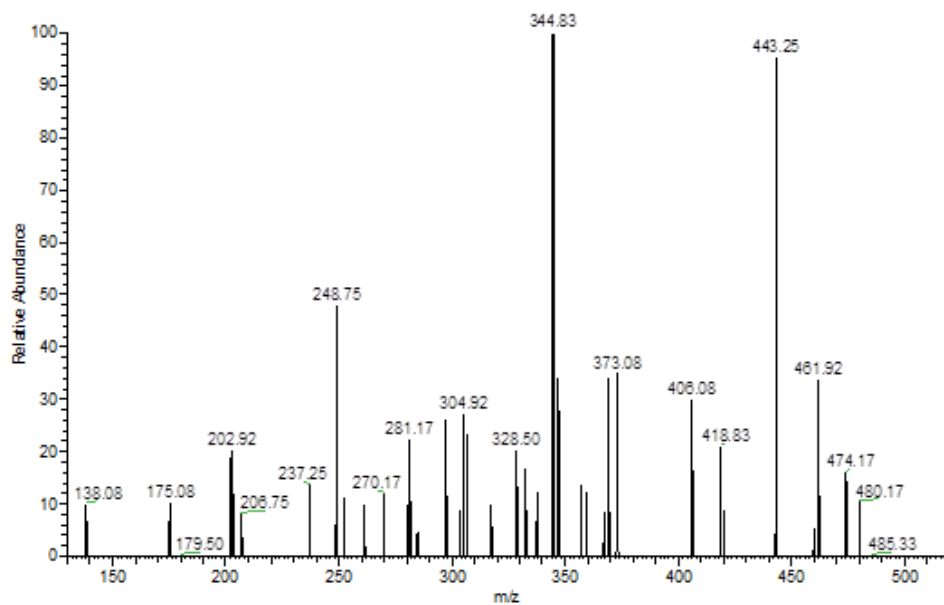
Slika 11. MS/MS spektar cijanidin-3-galaktozida ili glukozida na m/z 449



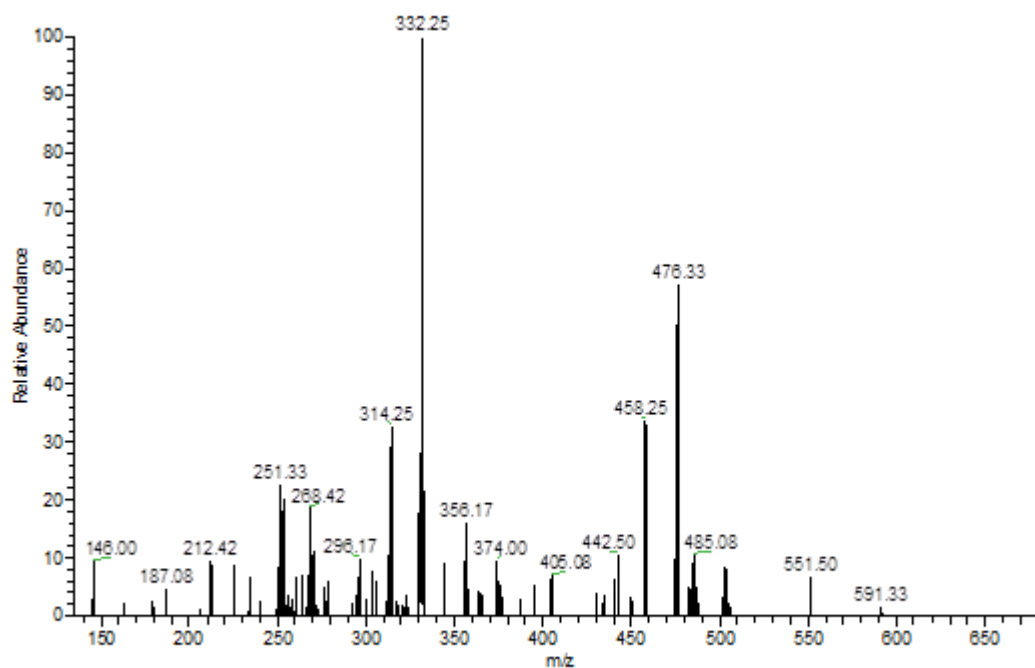
Slika 12. MS/MS spektar malvidin-3-arabinozida na m/z 463



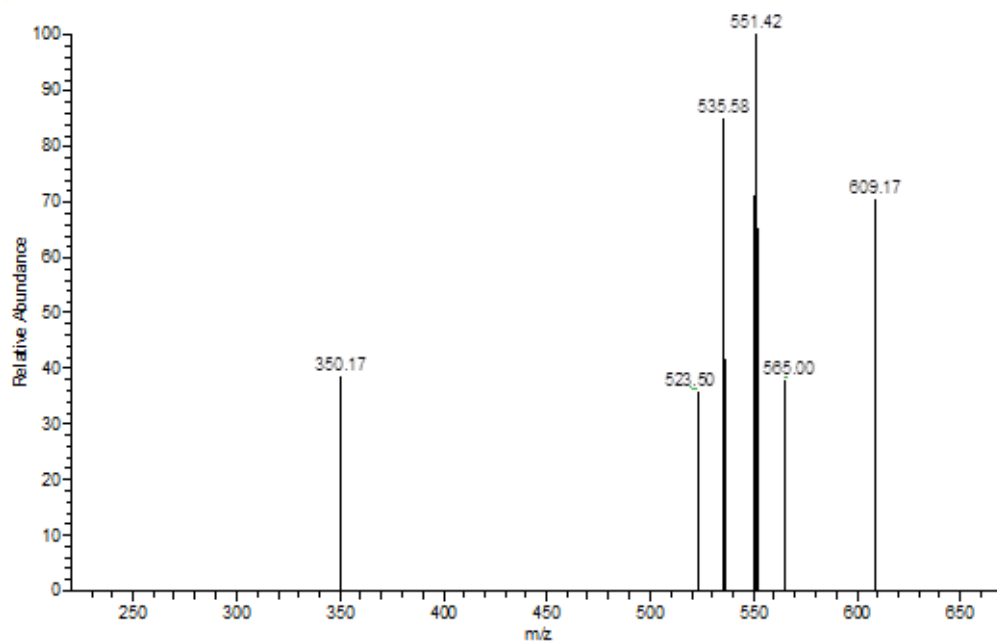
Slika 13. MS/MS spektar delfinidin-3-glukozida ili galaktozida na m/z 465



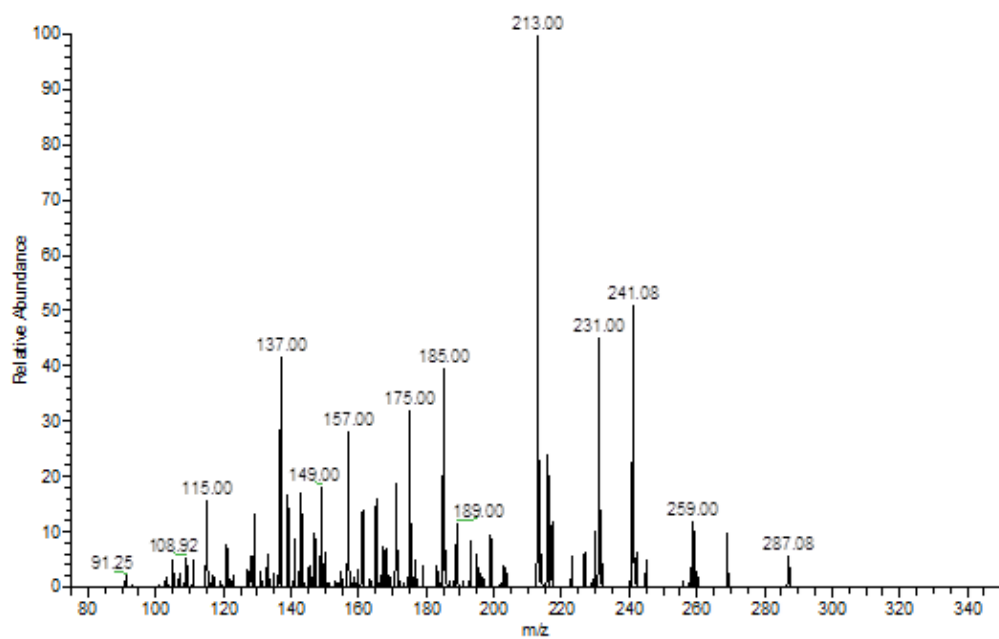
Slika 14. MS/MS spektar petunidin-3-glukozida, galaktozida ili arabinosida na m/z 479



Slika 15. MS/MS spektar malvidin-3-glukozi ili galaktozi na m/z 494



Slika 16. MS/MS spektar rutina na m/z 610



Slika 17. MS/MS spektar luteolina na m/z 287

## **BIOGRAFIJA**

Vojkan Miljković, rođen 6. aprila 1986. godine u Nišu, od majke Milene Miljković i oca Milisava Miljkovića, završio je Osnovnu školu „Vožd Karadžić“ sa prosečnom ocenom 5,00 i srednju medicinsku školu Dr Milenko Hadžić smer farmaceutski tehničar sa prosečnom ocenom 5,00. Studije farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu upisao je 2005/2006. godine, Diplomirao je 07.02.2011. godine sa prosečnom ocenom 8,71 i ocenom 10,00 na diplomskom ispitu, čija je tema „Interakcije lekova sa metronidazolom“ na predmetu Farmakologije i stekao zvanje diplomirani farmaceut. Za vreme studiranja bio je stipendista Ministarstva prosvete i nauke. Državni stručni ispit položio je nakon obavljenog farmaceutskog staža 29.03.2012. pred Ministarstvom Zdravlja Republike Srbije.

Bio je u organizacionom odboru 32. Balkanske medicinske nedelje održane u Nišu, 21-23. septembar 2012. Posедуje sertifikat o završenoj obuci za Savetnika za hemikalije. Školske 2012/2013. upisao je doktorske akademske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu studijski program Tehnološko inženjerstvo. Takođe, iste školske godine je upisao doktorske akademske studije Medicinskog fakulteta u Nišu studijski program Toksikologija. Radio je u Apoteci Prokuplje “Apoteka Blace” i ZUA “NINI”. Na sednici održanoj 04.02.2016. god. reizabran je u istraživačko zvanje istraživač saradnik u naučnoj oblasti tehničko-tehnoloških nauka. Od 01.02.2013. god. član je projekta Tehnološkog fakulteta u Leskovcu (TR34012) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Odlično govori engleski jezik i završio je početni 1 napredni nivo kineskog jezika.

## BIBLIOGRAFIJA

Vojkan M. Miljković je do sada objavio: 7 radova u međunarodnom časopisu (kategorije M23); 7 saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini (kategorije M33); 11 saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (kategorije M34); 5 radova u časopisunacionalnog značaja (kategorije M52); 7 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (kategorije M64) i 1 tehničko rešenje (M83).

Naučni rezultati koji su proistekli iz doktorske disertacije obeleženi su zvezdicom (\*)

### Radovi u međunarodnim časopisima sa SCI liste (M23)

1. Stojiljkovic S., Stamenkovic M., Kostic D., Miljkovic M., Arsic, Savic I., Savic I., **Miljkovic V.**, The influence of organic modification on the structural and adsorptive properties of bentonite clay and its application for the removal of lead, *Science of Sintering* 45(3) (2013) 363-376.
2. **Miljković V.**, Kostić D., Bojanić Z., Kaličanin B., Kocić G., Development and application of kinetic spectrophotometric method for the determination of metronidazole, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13(3) (2014) 417-422.
3. Stojiljković S., **Miljković V.**, Nikolić G., Kostić D., Arsić B., Barber J., Savić I., Savić I., The influence of the addition of polymers on the physico-chemical properties of bentonite suspensions, *Science of Sintering* 46(1) (2014) 65-73.
4. **Miljković V.**, Arsić B., Bojanić Z., Nikolić G., Nikolić LJ, Kaličanin B., Savić V., Interactions of metronidazole with other medicines: a brief review, *Die Pharmazie* 69 (2014) 571-577.
5. Miljković M., Đorđević D., **Miljković V.**, Stamenković M., Stepanović J., The influence of pH adjusted with different acids on the dyeability of polyester fabric, *Polish Journal of Chemical Technology* 16(1) (2014) 1-5.

6. \***Miljković V.**, Nikolić LJ, Radulović N., Arsić B., Nikolić G., Kostić D., Bojanić Z., Zvezdanović J., Flavonoids in mulberry fruit-identification of nonanthocyanin phenolics in some mulberry fruit species (*Morus alba* L., *Morus rubra* L. and *Morus nigra* L.), *Agro FOOD Industry Hi Tech* 26(3) (2015) 38-41.
7. \*Radulović N.S., **Miljković V.M.**, Mladenović M.Z., Nikolić G.S., Essential oils of *Morus alba* and *M. nigra* leaves: Effect of drying on the chemical composition, *Natural Product Communications* 1(12) 2017 115-118.

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. Miljkovic M., Arsic B., **Miljkovic V.**, Radulovic N., Djordjevic N., Savic V., Djordjevic D., Chemical compounds based on rosin for paint restoration process, 10<sup>th</sup> Conference of chemists, technologists and environmentalists of Republic of Srpska, 15-16<sup>th</sup> November 2013, Proceedings, p. 472-476, Bosnia, University of Banja Luka, Faculty of Technology.
2. Miljković M., Rakić V., **Miljković V.**, Arsić B., Influence of additives on absorption spectra of food dye CI Food Blue and its determination in food products, 14<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific Geoconferences, Albena-Bugarska, 17-26 June 2014., Conference Proceedings Volume II: 359-366.
3. **Miljković V.**, Miljković M., Randelović M., Arsić B., Kostić D., Stojiljković S., Nikolić LJ, Todorović Z., Adsorption of malachite green onto bentonite modified with carboxymethyl cellulose, International Multidisciplinary Scientific Geoconferences, Albena-Bugarska, 17-26 June 2014., Conference Proceedings Volume II: 559-566.
4. Rakic V., **Miljkovic V.**, Snajder M., Miljkovic M., Poklar Ulrih N., Influence of pH value on hue angle and visible absorption maxima of cyaniding 3-O- $\beta$ -glucopyranoside in aqueous solution, International Multidisciplinary Scientific Geoconferences SGEM 2015, Albena-Bugarska, 18-24 June 2015., Conference Proceedings Volume 1: 457-463.
5. Rajkovic P., **Miljkovic V.**, Rajkovic K., On entropy of almost orthogonal polynomials of Laguerre type, International Multidisciplinary Scientific Geoconferences



SGEM 2015, Albena-Bugarska, 18-24 June 2015., Conference Proceedings Volume 1: 233-240.

6. Bojanic N., Radovic J., Cvetkovic M., Lazovic M., Milojkovic M., Dunjic O., **Miljkovic V.**, Djindjic B., Bojanic V.; Antibiotic self-medication among pharmacy students at University of Nis, 34<sup>th</sup> Balkan Medical Week Congress, Bucharest Romania, 7-8 October 2016., A65.

7. Miljković M.N., **Miljković V.M.**, Rakić V., Petrović M., The content exploration of some food additives in different samples of instant coffee 3in1 and 2in1, III International Congress "Food Technology, Quality and Safety" Novi Sad Serbia 25-27.10.2016., 321-325.

#### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

1. Bojanic Z., Bojanic V., Bojanic N., **Miljkovic V.**, Milojkovic M., Djindjic B., Ilic-Tasic S., Effects of methylprednisolone therapy on the oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis, 18<sup>th</sup> Sesion of the Balkan Medical Days, Scripta Scientifica Medica, vol 43(6), p. 53, 2011.

2. Rakic V., **Miljkovic V.**, Sokolovic D., Bojanic Z., Bojanic V., Bojanic N., Quantitative analysis method use for the determination of food dye e110 in some foodstuffs, 18<sup>th</sup> Sesion of the Balkan Medical Days, Scripta Scientifica Medica, vol 43(6), P-27, p. 78, 2011.

3. **Miljkovic V.**, Bojanic Z., Bojanic V., Sokolovic D., Bojanic N., A spectrophotometric method for determination of metronidazole in pharmaceutical samples, 18<sup>th</sup> Sesion of the Balkan Medical Days, Scripta Scientifica Medica, vol 43(6), P-28, p. 78, 2011.

4. **Miljkovic V.**, Bojanic V., Bojanic Z., Sokolovic D., Kostic D., Rakic V., The application of new kinetic-spectrophotometric method for determination of metronidazole in pharmaceutical formulation, 32<sup>nd</sup> Balkan medical week, Niš, P67, 21-23. September 2012.

5. \***Miljković V.**, Nikolić LJ., Radulović N., Arsić B., Nikolić G., Kostić D., Zvezdanović J., Bojanić Z., Flavonoids from mulberry fruit (*Morus alba* L., *Morus rubra* L. and *Morus nigra* L.), Archives of the Balkan Medical Union The Official Journal of the Balkan Medical Union, Celsius Publishing House, 2014., Supplement 1, Volume 49: A110, P-62.
6. Kostić D., **Miljković V.**, Arsić B., Bojanić N., Bojanić V., Nikolić LJ., Determination of chemical composition and antioxidative activity of the extracts from *Calendula officinalis* L., Archives of the Balkan Medical Union The Official Journal of the Balkan Medical Union, Celsius Publishing House, 2014., Supplement 1, Volume 49: A105-A106, P-52.
7. **Miljkovic V.**, Nikolic LJ., Nikolic G., Arsic I., Bojanic V., La possibilité de remplacer le saccharose par stevioside E960 dans quelques produits alimentaires, La XX-ème Session des Journées Médicales Balkaniques, Archives de l'Union Medicale Balkanique, Supplement I (2015), Celsius Publishing House, Academie Nationale de Medecine de France, 16, rue Bonaparte, Paris, Paris les 21-22. Septembre 2015., T3-CL-12, p. A47-A48.
8. \***Miljkovic V.M.**, Nikolic G., Nikolic LJ., Zvezdanovic J., Bojanic N., Miljkovic M.N., Antioxidant activity of dry methanol extracts of fruits of black (*Morus nigra* L.) and white mulberry (*Morus alba* L.) and bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the estimation of their application as antioxidant agents. 34<sup>th</sup> Balkan Medical Week Congress, Bucharest Romania, 7-8 October 2016., A68.
9. \***Miljković V.M.**, Mladenović M.Z., Nikolić G., Radulović N.S., Effect of drying on the volatile profile of *Morus alba* L. and *M. nigra* L. leaves, 47<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, Nice, France, 11-14 September 2016., 103.
10. \***Miljkovic V.M.**, Nikolic G., Nikolic LJ., Pavlovic A., Determination of the content of microelements in fruit and leaf of black and white mulberry with the aim to estimate the quality for human use, 34<sup>th</sup> Balkan Medical Week Congress, Bucharest Romania, 7-8 October 2016., A68.

11. Miljković M.N., **Miljković V.M.**, Rakić V., Petrović M., The conten exploration of some food additives in different samples of instant coffee 3in1 and 2in1, III International Congress“ Food Technology, Quality and Safety“ Novi Sad, Serbia, 25-27.10.2016., 139.

#### **Radovi u časopisima nacionalnog značaja (M52)**

1. Rakić V., **Miljković V.**, Momčilović M., Sokolović D., Bojanić N., Uticaj nekih prehrambenih aditiva na spektrofotometrijsko određivanje boje Ponceau 4R, *Savremene tehnologije* 1(2) (2012) 71-76.

2. Pavlović A., Mitić S., Tošić S., Micić R., Rašić I., Mitić M., **Miljković V.**, Određivanje salicilne kiseline u vinu na osnovu reakcije izmene liganada, *Savremene tehnologije* 3(1) (2014) 11-15.

3. Miljković M., Đokić M., **Miljković V.**, Paunović V., Đorđević D., Stamenković M., Identifikacija veziva i pigmenata u slikarskim bojama savremenim instrumentalnim metodama, *Savremene tehnologije* 3(1) (2014) 72-76.

4. \***Miljković V.**, Nikolić G., Nikolić LJ., Arsić B., *Morus* species through centuries in pharmacy and as food, *Advanced technologies* 3(2) (2014) 111-115.

5. \***Miljkovic V.M.**, Nikolic G., Mihajlov-Krstev T., Arsic B., Antibacterial activities of fruits extracts of three mulberry species (*Morus Alba* L., *Morus Rubra* L. and *Morus Nigra* L.) and bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), *ActaMedica Medianae* ( potvrda o prihvatanju rada.

#### **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. Kostić D., Miljković M., Randjelović S., Stamenković M., **Miljković V.**, Content of heavy metals in medicinal plants from southeast serbia, 22<sup>th</sup> Congress of Chemists and technologists of Macedonia, 5-9. September 2012., Ohrid, Book of abstracts, p. 215, EN-45.

2. **Miljković V.**, Pavlović M., Kaličanin B., Determining of the lead and cadmium content in the kidneys and liver of rats, 20<sup>th</sup> Congress of Chemists and technologists of Macedonia, 17-20. September 2012., Ohrid, p. 93, ACE-23-E.
3. \***Miljkovic V.**, Nikolic LJ., Nikolic G., Dimitrijevic D., Randelovic S., The composition, antioxidative and antimicrobial activity of fresh fruit extracts of *Morus alba* L., 10<sup>th</sup> Symposium “Novel Technologies and Economic Development”, 22-23<sup>rd</sup> October 2013., p. 130, Serbia, Faculty of Technology Leskovac.
4. **Miljkovic V.**, Nikolic LJ., Nikolic G., Arsic I., Savic V., Stanković M., The interaction of metronidazole with other medicines, 10<sup>th</sup> Symposium “Novel Technologies and Economic Development”, 22-23<sup>rd</sup> October 2013, p. 129, Serbia, Faculty of Technology Leskovac.
5. \***Miljković V.**, Nikolić G., Nikolić LJ., Mihajlov-Krstev T., Antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta ploda crnog duda (*Morus nigra* fructus), Zbornik izvoda radova, XI Simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj”, 23-24. Oktobar 2015., p. 53, Tehnološki fakultet, Leskovac.
6. Miljković M., Paunović V., **Miljković V.**, Djokić M., The qualitative analysis of dyes in the picture „Lunar phases” by the author Peđa Milosavljević, Zbornik izvoda radova, XI Simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj”, 23-24. Oktobar 2015., p. 119, Tehnološki fakultet, Leskovac.
7. Rakić V., **Miljković V.**, Šnajder M., Miljković M., Poklar Ulrih N., The influence of 3-glucosidic substitution of cyanidin on the hue angle and visible absorption maximum positions, Zbornik izvoda radova, XI Simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj”, 23-24. Oktobar 2015., p. 100, Tehnološki fakultet, Leskovac.

## **Tehničko rešenje novi tehnološki postupak (M83)**

1. \***Miljković V.**, Nikolić G., Cekić N., Tasić Kostov M., Formulacije bioaktivnog U/V emulzionog sistema na bazi ekstrakata ploda belog i crnog duda, Tehničko rešenje (M83) – Novi tehnološki postupak, Ev. br. 06-1412/1, 29.08.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac. Usvojeno na NNV 26.09.2016. (Odluka br. 04-4/85-XVII).



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

„Развој фитопрепарата за дерматолошку примену на бази екстраката плода и листа биљних врста рода *Morus* L. (Moraceae)“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

Војкан М. Миљковић

Потпис докторанда:

Војкан Миљковић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Војкан Миљковић

Студијски програм:

Технолошко инжењерство

Наслов рада:

„Развој фитопрепарата за дерматолошку примену на бази екстраката плода и листа биљних врста рода *Morus L.* (Moraceae)“

Ментор:

проф. др Горан С. Николић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум**

**Универзитета у Нишу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са 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, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

Војкан М. Миљковић

Потпис докторанда:

Војкан Миљковић



### Прилог 3.

### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

„Развој фитопрепарата за дерматолошку примену на бази екстраката плода и листа биљних врста рода *Morus L.* (Moraceae)“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату, 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 одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је наставку текста).

У Нишу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

Војкан М. Миљковић

Потпис докторанда:

Војкан Миљковић



## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

③ Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).