



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Драгана С. Стојиљковић

***In vitro* и *in vivo* карактеризација
емулзија са екстрактима плода дивље јабуке
(*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae)
стабилизваних конвенционалним и
биодеградабилним мешаним емулгаторима**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Dragana S. Stojiljković

***In vitro* and *in vivo* characterization of
emulsions with extracts of wild apple fruit
(*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae)
stabilized with conventional and
biodegradable mixed emulsifiers**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Ивана Арсић, ванредни професор,
Медицински факултет, Универзитет у Нишу

Наслов:

In vitro и *in vivo* карактеризација емулзија са екстрактима плода дивље јабуке (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима

Резиме:

Циљ докторске дисертације био је формулација емулзија стабилованих конвенционалним-КЕ и биодеградабилним-БЕ мешаним емулгаторима, као носача за екстракте плода дивље јабуке-ЕПДЈ (*Malus sylvestris fructus* (L.) Mill., Rosaceae) и испитивање њихове структуре, стабилности, безбедности и ефикасности у циљу развоја производа за превенцију и/или третман оштећења и промена на кожи насталих деловањем оксидативног стреса, за хидратацију и/или за посветљивање хиперпигментација коже. У процесу реализације израђени су ЕПДЈ различитим методама (мацерација, дигестија, перколација, Soxhlet и ултразвучна екстракција) и употребом следећих екстрагенаса: 70% етанол, 45% пропиленгликол-ПГ, 80% ПГ, пречишћена вода, маслиново и сунцокретово уље. Екстракти су окарактерисани *in vitro* (органолептичка анализа, рН вредност, индекс рефракције, релативна густина, идентификација и садржај полифенола-ПФ и воћних киселина-ВК, антиоксидативна активност-АА, као и безбедност и ефикасност примене). Екстракти задовољавајуће стабилности, најбогатији ПФ и ВК, као и најбољом АА инкорпорирани су у концентрацији од 6% у емулзије стабиловане КЕ и БЕ. Извршена је *in vitro* карактеризација емулзија: органолептичка анализа, рН вредност, електрична проводљивост, структурна анализа и стабилност, идентификација и

одређивање садржаја ПФ и ВК, као и АА. *In vivo* карактеризација је обухватила испитивање иритационог потенцијала, испитивање ефикасности хидратације, трансепидермалног губитка воде, рН вредности, еритем и меланин индекса коже пре и након апликације емулзија на кожу здравих испитаника (краткотрајна и дуготрајна студија), као и испитивање способности емулзија за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација коже. БЕ са 6% ЕПДЈ добијеним ултразвучном екстракцијом уз коришћење пречишћене воде, 70% етанола, односно 45% ПГ као екстрагенса показале су *in vivo* најбољу ефикасност (уз добар безбедносни потенцијал, АА и задовољавајућу стабилност) па се могу сматрати погодним за потенцијалну примену у превенцији и/или третману оштећења и промена на кожи насталих деловањем оксидативног стреса, за хидратацију и за посветљивање хиперпигментација коже. Истраживања представљају научни допринос проучавању природних ресурса Србије (плод дивље јабуке) и испитивању могућности њиховог коришћења у производњи савремених, безбедних (дермо)козметичких производа стандардизованог квалитета и дефинисане ефикасности.

Научна област:

Медицинске науке, Фармација

Научна
дисциплина:

Козметологија

Кључне речи:

екстракти плода дивље јабуке, екстракционе методе и екстрагенси, (дермо)козметичке емулзије, конвенционални и биодеградабилни мешани емулгатори, полифенолна једињења, воћне киселине, антиоксидативна активност, стабилност, безбедност и *in vivo* ефикасност (хидратантни ефекат и ефекат посветљивања коже)

УДК:

615.451.2:634.12

CERIF
класификација:

В 740 - Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација,
токсикологија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

dr Ivana Arsić, associate professor,
Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

In vitro and *in vivo* characterization of emulsions with extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) stabilized with conventional and biodegradable mixed emulsifiers

Abstract:

The aim of PhD Thesis was formulation of emulsions stabilized with conventional-CE and biodegradable-BE mixed emulsifiers, as carriers for extracts of wild apple fruit-EWAF (*Malus sylvestris fructus* (L.) Mill., Rosaceae) and investigation of their structure, stability, safety and efficiency in order to develop products for the prevention and/or treatment of skin damage and changes caused by oxidative stress, for skin hydration and/or lightening of skin hyperpigmentation. During realization process, EWAF were made by different extraction methods (maceration, digestion, percolation, Soxhlet and ultrasonic extraction) and using following solvents: 70% ethanol, 45% propyleneglycol-PG, 80% PG, purified water, olive and sunflower oil. Extracts were characterized *in vitro* (organoleptic analyzes, pH values, refractive index, relative density, identification and content of polyphenol-PP and fruit acid-FA, antioxidant activity-AA, as well as the safety and efficiency after application). Extracts with satisfactory stability, the richest in PP and FA, and with the best AA were incorporated, in concentration of 6%, into emulsions stabilized with CE and BE. *In vitro* characterization of emulsions was carried out: organoleptic analysis, pH values, electrical conductivity, structural analysis and stability, identification and determination of content of PP and FA, as well as AA. *In vivo* characterization included the investigation of irritation potential, hydration efficiency, transepidermal water loss, the pH values, erythema and melanin index of the skin before and after emulsions application on

the skin of healthy volunteers (short-term and long-term study), as well as investigation of emulsions potential for lightening of artificially induced skin hyperpigmentation. BE with 6% of EWAF obtained by ultrasonic extraction and purified water, 70% ethanol, or 45%PG as solvents have shown the best *in vivo* efficiency (with good safety potential, AA and satisfactory stability) and might be considered for potential use in the prevention and/or treatment of skin damage or changes caused by oxidative stress, for skin hydration and/or lightening of skin hyperpigmentation. Research represent scientific contributions to the study of natural resources of Serbia (wild apple fruit) and investigation of the possibilities of their use in the production of modern, safe (dermo)cosmetic products with standardized quality and defined efficiency.

Scientific
Field:

Medical science, Pharmacy

Scientific
Discipline:

Cosmetology

Key Words:

wild apple fruit extracts, extraction methods and solvents, (dermo)cosmetic emulsions, conventional and biodegradable mixed emulsifiers, polyphenolic compounds, fruit acids, antioxidant activity, stability, safety and *in vivo* efficiency (hydrating and lightening effects)

UDC:

615.451.2:634.12

CERIF
Classification:

B 740 - Pharmacological science, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Аутор:

Име и презиме: Драгана Стојиљковић, дипл. фарм.

Датум и место рођења: 23.02.1983. год., Ниш, Србија

Докторска дисертација:

Наслов: *In vitro* и *in vivo* карактеризација емулзија са екстрактима плода дивље јабуке (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) стабилованих конвенционалним и биодиградабилним мешаним емулгаторима

Научна област: Медицинске науке, Фармација

Ментор: др Ивана Арсић, ванредни професор

Број страна: 213

Број табела: 18

Број слика: 23

Број графикана: 17

Број библиографских података: 189

Оцена и одбрана

Датум одобрења теме за израду докторске дисертације: 04.03.2016. год.

Број одлуке: 06-ФТ-11/09

Датум прихватања извештаја о урађеној докторској дисертацији: 02.04.2018. год.

Број ННВ: 06-ФТ-11/09-10-3087-3

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

др Ивана Арсић, ванредни професор - ментор и члан,

Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Стево Најман, редовни професор - председник,

Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Снежана Савић, редовни професор - члан,

Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду

др Вања Тадић, научни саветник - почасни члан,

Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду

Датум одбране:

Author:

Name and last name: Dragana Stojiljković, mag. pharm.

Date and place of birth: 23.02.1983. year, Niš, Serbia

Doctoral dissertation:

Title: *In vitro* and *in vivo* characterization of emulsions with extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) stabilized with conventional and biodegradable mixed emulsifiers

Scientific field: Medical science, Pharmacy

Mentor: dr Ivana Arsić, associate prof.

Number of pages: 213

Number of table: 18

Number of pictures: 23

Number of charts: 17

Number of bibliographic data: 189

Assessment and defense

Date of approval of title for doctoral dissertation creating: 04.03.2016. years

Number of decision: 06-ΦT-11/09

Date of acceptance of completed doctoral dissertation: 02.04.2018. years

Number of decision: 06-ΦT-11/09-10-3087-3

Commission for assessment and defense of doctoral dissertation:

dr Ivana Arsić, associate professor - mentor and member,

Faculty of Medicine, University of Niš

dr Stevo Najman, full professor - president,

Faculty of Medicine, University of Niš

dr Snežana Savić, full professor - member,

Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

dr Vanja Tadić, scientific adviser - honorable member,

Institute for Medicinal Plant Research „Dr Josif Pančić“, Belgrade

Date of defense:

Научни допринос докторске дисертације
Scientific contribution of doctoral dissertation

1. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тадић В. Extracts of Wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind. Crop Prod.* 2016; 80: 165-176. (M21).
2. **Стојиљковић Д.,** Тадић В., Станковић М., Наумовић С. и Арсић И. Standardized extract of wild apple fruit in alkyl-polyglucoside-based cosmetic cream - estimation of stability, safety, antioxidant activity and efficiency. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2018. DOI: 10.1111/ics.12462 (*In Press*). (M23).
3. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тадић В. Oil extracts of wild apple fruit as active substances in UV protection preparations. *Radiat. Applic. J.* 2016; 1(3): 187-192. (M33).
4. **Стојиљковић Д.,** Рогановић С., Станковић М., Живковић Ј., Сунарић С., Тадић В. и Арсић И. Stability study of wild apple fruit extract: phenolic and flavonoid content. 51th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book.* 2017; (*In Press*). (M34).
5. **Стојиљковић Д.,** Арсић И., Рогановић С. и Тадић В. Investigation of antioxidant stability of wild apple fruit extracts. The International Bioscience Conference and the 6th international PSU-UNS Bioscience Conference – IBCS, Novi Sad, Serbia. *Book of abstracts.* 2016: 327-328. (M34).
6. **Стојиљковић Д.,** Рогановић С., Станковић М., Тадић В. и Арсић И. Antioxidant activity and polyphenolic content of water extracts of wild apple fruit. 50th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book.* 2016; 77. (M34).
7. **Стојиљковић Д.,** Тасић Костов М., Станковић М., Арсић И. и Тадић В. Water extracts of wild apple fruit as a source of antioxidant substances for use in food industry. 49th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book.* 2015; 53. (M34).
8. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тадић В. The antioxidant potential of propylene-glycol extracts of wild apple fruit. 11th Symposium „Novel technologies and economic development with international participations“, Leskovac, Serbia, *Book of abstracts.* 2015; БФТ-2: 40. (M34).

9. **Стојиљковић Д.,** Наумовић С., Живковић Ј., Станковић М., Тадић В. и Арсић И. Wild apple fruit: Characterization of extracts for use in cosmetic products. VI Serbian Congress of pharmacy with international participations, Belgrade, Serbia. *Abstract Book*. 2014; 373-374. (M34).
10. **Стојиљковић Д.,** Наумовић С., Станковић М., Савић В., Тадић В. и Арсић И. Extracts of wild apple fruit as a source of antioxidant substances. IV Congress of food supplements with international participation, Belgrade, Serbia. *Abstract Book* (додатак без нумерисане стране). 2013. (M34).

*Искрену и највећу захвалност
за израду ове докторске дисертације дугујем свом
ментору, проф. др Ивани Арсић,
на несебичној помоћи, саветима, разумевању, подрици,
поверењу и датој слободи током свих година
заједничког рада и мог стручног и научног усавршавања.
Својим знањем, стручним саветима и људским квалитетима
допринела је да сарадња са њом постане привилегија.*

*Велику захвалност дугујем
др Вањи Тадић
на непрестаној и стручној подрици, вредним саветима и мишљењима
које ми је пружила од почетка мог истраживачког рада и
тима значајно допринела мом научном усавршавању и изради ове дисертације.*

*Захваљујем се
проф. др Стеви Најману и
проф. др Снежани Савић
на сарадњи, пруженом времену, знању, сугестијама, саветима,
као и на учешћу у оцени ове дисертације.*

*Захваљујем се свим колегиницама и колегама и свима запосленима на
Медицинском факултету у Нишу,
пријатељима, колегиницама са посла, као и свима који су
на било који начин учествовали у овом истраживању и
без чијег доприноса не би било могуће израдити ову дисертацију.*

*Истраживање је подржано од стране
Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије,
у оквиру Пројекта бр. III 45017.*

Аутор

Изнад свега,

*најискреније од срца се захваљујем својим породицама
на љубави, разумевању, стрпљењу и пруженој подрици
у мом приватном животу као и у научном и пословном животу.*

*Захваљујем се својим
родитељима, Славици и Славиши,
брату Горану и својим највољенијима
на пруженој љубави, разумевању, подрици и подстреку
увек када је то било потребно.
Бескрајно сам им захвална због свега што су учинили за мене,
због њиховог давања себе и вере у мене током целог мог живота,
због чега и јесу један од мојих ослонаца у животу.*

*Посебну и највећу захвалност дугујем свом
сину Борђу и
супругу Игору
на огромном стрпљењу, разумевању, пажњи, снази и подрици.
Посебно сам им захвална на несебичној љубави,
коју су ми пружали током свих заједно проведених година,
на свим љубавима које ћемо заједно имати, неговати и проживети,
на љубави која је била, јесте и биће заувек
мој главни ослонац и покретач у животу.*

Ваша Драгана



***Нема ствари која би била тако вредна проучавања као
природа.***

Никола Тесла

Ако следимо природу као вођу, никада нећемо залутати.

Цицерон

***И када бих знао да ће се свет сутра распасти на комадиће,
опет бих данас посадио моје дрво јабуке.***

Мартин Лутер

Једна јабука на дан, доктор из куће ван

народна пословица

***Јабука у хришћанском свету представља симбол знања,
потпуности, апсолутности и јединствености,
љубави, плодности, бесмртности, здравља и вечне младости.***

***Јабука је једино воће које има свој светски дан и
обележава се 20. октобра,
са циљем указивања на велики значај овог воћа***



Листа скраћеница:

AA	антиоксидативна активност
АПГ	алкил полиглукозиди
ВНТ	бутил хидрокситолуен (енг. <i>butylated hydroxytoluene</i>)
СЕ	катехин еквивалент (енг. <i>catechin equivalents</i>)
ДНА	дихидроксиацетон (енг. <i>dihydroxyacetone</i>)
DMEM	енг. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
DPPH	енг. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
ЕС	електрична капацитативност (енг. <i>electrical capacitance</i>)
ЕЕ емулзије	емулзије стабилизоване конвенционалним (<i>EmulgadeSE</i>) емулгатором
ЕИ	индекс иритације коже (енг. <i>erythema index</i>)
ЕПДЈ	екстракт плода дивље јабуке
FCR	енг. <i>Folin Ciocalteu reagens</i>
ФГС	фетални говеђи серум
FRAP	енг. <i>Ferric reducing antioxidant power</i>
GA	гална киселина (енг. <i>gallic acid</i>)
HPLC	течна хроматографија под високим притиском.(енг. <i>High pressure liquid chr.</i>)
КАС	козметички активна супстанца
МЕ емулзије	емулзије стабилизоване биодеградабилним (<i>MontanovTM</i>) емулгаторима
MI	меланин индекс (енг. <i>melanin index</i>)
МТТ	<i>3-(4,5-dimethyliazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid</i>
ОС	оксидативни стрес
ПГ	пропиленгликол
ПДЈ	плод дивље јабуке
ПОЕ	полиоксиетилен
ПФ	полифеноли
RE	рутин еквивалент (енг. <i>rutin equivalent</i>)
РКВ	реактивне кисеоничне врсте
RSC	способност хватања слободних радикала (енг. <i>radical scavenging capacity</i>)
SC	површински слој коже (енг. <i>starum corneum</i>)
SD	стандардна девијација (енг. <i>standard deviation</i>)
с.д.	свежа дрога
ТА	укупни садржај антоцијана (енг. <i>total anthocyanin content</i>)
TEWL	трансепидермални губитак воде (енг. <i>transepidermal water loss</i>)
TFC	укупни садржај флавоноида (енг. <i>total flavonoid content</i>)
TPC	укупни садржај фенола (енг. <i>total phenol content</i>)
TPTZ	<i>2,4,6-tripyridyl-s-triazin</i>
ТТ	укупни садржај танина (енг. <i>total tannin content</i>)
УВ	ултравиолетно
у/в	уље / вода
ВК	воћна киселина

Листа табела:

Табела 1. Дивља јабука у систематици биљака	1
Табела 2. Најважнији реактивни облици кисеоника	7
Табела 3. Компоненте коже: функција и промене услед оксидативног оштећења	8
Табела 4. Одбрамбени механизми у заштити коже од ОС	9
Табела 5. Глогови (енг. Glogau) типови фотоостареле коже услед деловања ОС	14
Табела 6. Критеријуми за избор носача за локалну примену	20
Табела 7. Преглед супстанци коришћених за израду испитиваних емулзија са ЕПДЈ ..	27
Табела 8. Обележавање израђених ЕПДЈ применом различитих екстрагенаса и различитих метода екстракције	29
Табела 9. Квалитативни и квантитативни састав емулзија са ЕПДЈ и плацебо узорака	40
Табела 10. Органолептичке карактеристике течних ЕПДЈ (непосредно по изради и након 60, 180 и 365 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$	53
Табела 11. Индекс преламања светлости и густина испитиваних ЕПДЈ 7 дана након израде и након 60 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$	56
Табела 12. Квалитативни и квантитативни садржај ПФ једињења у ЕПДЈ: а) након израде; б) након две године чувања	65
Табела 13. Квалитативни и квантитативни садржај ВК у ЕПДЈ након израде и након две године чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$	76
Табела 14. Корелација између АА и главних ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ	87
Табела 15. Органолептичке карактеристике испитиваних емулзија са одабраним ЕПДЈ након израде (и након 60, 180 и 365 дана чувања)	96
Табела 16. Величина капи узорака измерена након израде и након 180 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, као и након центрифугирања и теста убрзаног старења	120
Табела 17. Квалитативни и квантитативни садржај ПФ једињења у емулзијама са ЕПДЈ: а) након израде	123
Табела 18. Квалитативни и квантитативни садржај воћних киселина у емулзијама са ЕПДЈ након израде и након годину дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$	127

Листа слика:

Слика 1. Дивља јабука - дрво (<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill., Rosaceae)	1
Слика 2. Плод дивље јабуке (<i>Malus sylvestris fructus</i> (L.) Mill., Rosaceae)	2
Слика 3. Молекуларна структура полифенолних једињења најчешће присутних у плоду дивље јабуке	4
Слика 4. Молекуларна структура воћних киселина најчешће присутних у плоду дивље јабуке	5
Слика 5. Главни извори слободних радикала у кожи и последице њиховог деловања ...	7
Слика 6. Антиоксидативни системи одбране	10
Слика 7. Мерење биофизичких параметара и мерне сонде апарата	46
Слика 8. Течни екстракти ЕПДЈ.....	53
Слика 9. Хроматограми идентификованих ПФ једињења	71
Слика 10. Спектри и структурне формуле идентификованих ПФ једињења у ЕПДЈ	74
Слика 11. Хроматограми идентификованих ВК након израде у ЕПДЈ	80
Слика 12. Емулзије са ЕПДЈ стабилизоване биодеградабилним и конвенционалним мешаним емулгаторима.	96
Слика 13. Органолептичко поређење узорака са истим инкорпорираним ЕПДЈ, а стабиловани различитим емулгаторима	97
Слика 14. Светлосне микрографије узорака 7 дана након израде	102
Слика 15. Поларизационе микрографије узорака 7 дана након израде	103
Слика 16. Светлосне микрографије узорака 180 дана након израде	106
Слика 17. Поларизационе микрографије узорака 180 дана након израде	107
Слика 18. Светлосне микрографије узорака након центрифугирања	111
Слика 19. Поларизационе микрографије узорака након центрифугирања	112
Слика 20. Светлосне микрографије узорака након теста убрзаног старења	117
Слика 21. Поларизационе микрографије узорака након теста убрзаног старења	118
Слика 22. Хроматограми идентификованих ПФ једињења након израде у емулзијама са ЕПДЈ	126
Слика 23. Хроматограми детектованих ВК након израде у емулзијама са ЕПДЈ.....	128

Листа графикана:

Графикон 1. рН вредности испитиваних ЕПДЈ.....	54
Графикон 2. Укупан садржај: а) фенола (ТРС); б) флавоноида (ТФС); в) танина (ТТ); г) антоцијана (ТА) у испитиваним ЕПДЈ.....	59
Графикон 3. Антиоксидативна активност ЕПДЈ: а) DPPH тест (%RSC); б) FRAP тест (mM Fe ²⁺); в) тест са линолном киселином (%AOA).....	83
Графикон 4. Корелација између: а)ТРС и %RSC, б)ТРС и mM Fe ²⁺ , в)ТРС и %AOA; г)ТФС и %RSC, д)ТФС и mM Fe ²⁺ , ђ)ТФС и %AOA; е)ТТ и %RSC; ж)ТТ и mM Fe ²⁺ , з)ТТ и %AOA; и)ТА и %RSC, ј)ТА и mM Fe ²⁺ , к)ТА и %AOA у испитиваним ЕПДЈ.....	86
Графикон 5. Корелација између ТРС и %RSC у испитиваним 70Ет-ЕПДЈ.....	88
Графикон 6. Антиоксидативна активност испитиваних ЕПДЈ након 180 дана чувања.	89
Графикон 7. Ефекат ЕПДЈ на вијабилност фибробласта L929 ћелијске линије.....	93
Графикон 8. рН вредност емулзија са ЕПДЈ у функцији времена.....	98
Графикон 9. Електрична проводљивост емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодиградабилним мешаним емулгаторима у функцији времена	100
Графикон 10. рН вредност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодиградабилним мешаним емулгаторима након центрифугирања.....	110
Графикон 11. рН вредност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодиградабилним мешаним емулгаторима након теста убрзаног старења.....	115
Графикон 12. Антиоксидативна активност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодиградабилним емулгаторима након 7 и 180 дана израде.....	131
Графикон 13. <i>In vivo</i> одређени иритациони потенцијал, тј. безбедносни профил испитиваних емулзија са ЕПДЈ.....	135
Графикон 14. <i>In vivo</i> ефикасност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) у краткотрајној студији.....	141
Графикон 15. <i>In vivo</i> одређена ефикасност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) у дуготрајној студији од 28 дана.....	148
Графикон 16. <i>In vivo</i> одређена способност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи.....	156
Графикон 17. <i>In vivo</i> одређен потенцијал иритације у студији испитивања способности испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи.....	160

Садржај:

1. У В О Д.....	1
1.1. ДИВЉА ЈАБУКА - <i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill., Rosaceae	1
1.1.1. Плод дивље јабуке - хемијски састав и примена.....	3
1.2. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И КОЖА	5
1.2.1. Слободни радикали.....	6
1.2.2. Механизам оксидативног оштећења и промене на кожи	7
1.2.3. Одбрамбени механизми у заштити коже од оксидативног стреса.....	9
1.2.4. Антиоксиданси - антиоксидативни и прооксидативни потенцијал	10
1.3. СУВА КОЖА - СТРУКТУРНЕ, ФУНКЦИОНАЛНЕ И ЕСТЕТСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	11
1.4. (ДЕРМО)КОЗМЕТИЧКИ ПРОИЗВОДИ АНТИОКСИДАТИВНОГ И ХИДРАТАНТНОГ ДЕЛОВАЊА.....	15
1.4.1. Полифенолна једињења као козметички активне супстанце	15
1.4.2. Воћне киселине као козметички активне супстанце	16
1.4.3. Емулзиони носачи за биљне екстракте	19
2. Ц И Љ И С Т Р А Ж И В А Њ А.....	23
3. М А Т Е Р И Ј А Л И И М Е Т О Д Е	26
3.1. МАТЕРИЈАЛИ	26
3.1.1. Биљни материјал.....	26
3.1.2. Хемикалије.....	26
3.2. ИЗРАДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ	28
3.2.1. Методе за екстракцију	28
3.2.1.1. Екстракција поларним екстрагенсима.....	28
3.2.1.2. Екстракција неполарним екстрагенсима.....	29
3.2.2. Методе за <i>in vitro</i> физичко-хемијску карактеризацију испитиваних ЕПДЈ... 30	
3.2.3. Методе за <i>in vitro</i> испитивање полифенолног садржаја ЕПДЈ.....	30
3.2.3.1. Одређивање укупног садржаја фенола у ЕПДЈ.....	30
3.2.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида у ЕПДЈ.....	30
3.2.3.3. Одређивање укупног садржаја кондензованих танина у ЕПДЈ.....	31
3.2.3.4. Одређивање укупног садржаја антоцијана у ЕПДЈ	31

3.2.4. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у ЕПДЈ	32
3.2.5. Методе за <i>in vitro</i> испитивање антиоксидативне активности ЕПДЈ	33
3.2.5.1. Одређивање капацитета „хватања“ слободних радикала ЕПДЈ	33
3.2.5.2. Одређивање укупне антиоксидативне активности ЕПДЈ - FRAP тест ...	34
3.2.5.3. Одређивање способности заустављања липидне пероксидације ЕПДЈ - тест са линолном киселином	34
3.2.6. Методе за <i>in vitro</i> испитивање ефеката и безбедности примене ЕПДЈ на културама ћелија	35
3.2.6.1. Култивисање ћелија	35
3.2.6.2. Пасажа ћелија	35
3.2.6.3. Одређивање густине ћелија	36
3.2.6.4. Есеј вијабилности/цитотоксичности	36
3.2.6.5. МТТ тест	37
3.2.6.6. Светлосна микроскопија	38
3.2.7. Статистичка анализа	38
3.3. ФОРМУЛАЦИЈА, ИЗРАДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕМУЛЗИЈА СА ЕПДЈ	39
3.3.1. Методе за <i>in vitro</i> физичко-хемијску карактеризацију испитиваних емулзија	41
3.3.1.1. Органолептичка анализа испитиваних емулзија са одабраним ЕПДЈ	41
3.3.1.2. Физичко-хемијска испитивања емулзија са одабраним ЕПДЈ	41
3.3.1.2.1. Одређивање рН вредности испитиваних емулзија са ЕПДЈ	41
3.3.1.2.2. Мерење електричне проводљивости испитиваних емулзија са ЕПДЈ	41
3.3.2. Методе за испитивање стабилности и структуре испитиваних емулзија са ЕПДЈ	42
3.3.2.1. Поларизациона и светлосна микроскопија	42
3.3.2.2. Испитивање физичке стабилности методом центрифугирања	43
3.3.2.3. Испитивање стабилности - тест убрзаног старења	43
3.3.2.4. Испитивање стабилности емулзија – тест дуготрајне стабилности	43
3.3.3. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у емулзијама са ЕПДЈ	43
3.3.4. Методе за <i>in vitro</i> испитивање антиоксидативне активности емулзија са ЕПДЈ	44
3.3.4.1. Одређивање капацитета „хватања“ слободних радикала емулзија са ЕПДЈ	44

3.3.5. Методе за <i>in vivo</i> карактеризацију емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе .	45
3.3.5.1. Методе за <i>in vivo</i> испитивање иритационог потенцијала и безбедности примене емулзија са ЕПДЈ – биофизичке методе	47
3.3.5.2. Методе за <i>in vivo</i> испитивање ефикасности примене емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе.....	48
3.3.5.2.1. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – краткотрајна студија	48
3.3.5.2.2. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – дуготрајна студија	49
3.3.5.3. Методе за <i>in vivo</i> испитивање способности емулзија са ЕПДЈ за посветљивање вештачки изазваних хиперпигментација на кожи - биофизичке методе.....	49
3.3.6. Статистичка анализа.....	50

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....52

4.1. ЕКСТРАКТИ ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ - КАРАКТЕРИЗАЦИЈА	52
4.1.1. ЕПДЈ - екстракционе методе и екстрагенси	52
4.1.2. <i>In vitro</i> физичко-хемијска карактеризација испитиваних течних ЕПДЈ	52
4.1.2.1. Органолептичка карактеризација ЕПДЈ.....	52
4.1.2.2. Анализа физичко-хемијских карактеристика испитиваних ЕПДЈ	54
4.1.2.2.1. <i>pH</i> вредност испитиваних ЕПДЈ.....	54
4.1.2.2.2. Индекс преламања светлости испитиваних ЕПДЈ	55
4.1.2.2.3. Густина испитиваних ЕПДЈ.....	56
4.1.3. Анализа полифенолног садржаја у испитиваним ЕПДЈ.....	57
4.1.4. HPLC анализа и стандардизација садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у ЕПДЈ.....	62
4.1.4.1. HPLC анализа и стандардизација садржаја ПФ једињења у ЕПДЈ	62
4.1.4.2. HPLC анализа и стандардизација садржаја ВК у ЕПДЈ.....	75
4.1.5. Анализа <i>in vitro</i> испитивања антиоксидативне активности ЕПДЈ	81
4.1.6. Ефикасност и безбедност примене ЕПДЈ на културама ћелија	90
4.2. ЕМУЛЗИЈЕ СА ЕКСТРАКТИМА ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ	95
4.2.1. <i>In vitro</i> физичко-хемијска карактеризација емулзија са ЕПДЈ.....	95
4.2.1.1. Органолептичка анализа испитиваних емулзија са ЕПДЈ	95
4.2.1.2. Физичко-хемијске карактеристике испитиваних емулзија са ЕПДЈ	97

4.2.1.2.1. Одређивање рН вредности испитиваних емулзија са ЕПДЈ	97
4.2.1.2.2. Мерење електричне проводљивости испитиваних емулзија.....	99
4.2.2. Физичка стабилност и структурно уређење емулзија са ЕПДЈ.....	100
4.2.2.1. Поларизациона и светлосна микроскопска анализа	100
4.2.2.2. Метода центрифугирања емулзија са ЕПДЈ.....	109
4.2.2.3. Метода теста убрзаног старења емулзија са ЕПДЈ	113
4.2.2.4. Величина капи испитиваних емулзија са ЕПДЈ.....	119
4.2.3. НРРС анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ	121
4.2.3.1. НРРС анализа садржаја ПФ једињења у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ, стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима.....	121
4.2.3.2. НРРС анализа садржаја воћних киселина у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ, стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима.....	127
4.2.4. <i>In vitro</i> антиоксидативна активност емулзија са ЕПДЈ	130
4.2.5. <i>In vivo</i> карактеризација емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе	133
4.2.5.1. Испитивање иритационог потенцијала емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе.....	133
4.2.5.2. Процена ефикасности емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе	138
4.2.5.2.1. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – краткотрајна студија	138
4.2.5.2.2. <i>In vivo</i> испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – дуготрајна студија	145
4.2.5.3. Испитивање способности емулзија са ЕПДЈ за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи.....	154

5. ЗАКЉУЧЦИ..... 161

ЛИТЕРАТУРА..... 170

1. У В О Д

1.1. ДИВЉА ЈАБУКА - *Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae

Дивља јабука (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) је листопадно дрво које расте висине и до 10m, широке, неправилне и доста густе крошње (Табела 1, Слика 1). Може бити и жбун висине до 4 m. Расте по шумама или шикарама. Гранчице су длакаве са густим гранама на младом дрвећу, а када расте у облику жбуна, више или мање су покривене трњем, које добро штити лишће. Листови су углавном наспрамно распоређени, елипсастог до срцастог облика, зашиљени, са израженим врхом и назубљеном ивицом. Цветови су ружичасте (почетком цветања) или беле боје, појединачни или по 2-3 заједно, специфичног мириса. Јабука цвета од априла до маја. Лековити део дивље јабуке је плод. Лоптастог је облика, црвене до жуте боје, варира у пречнику од 6 до 8 cm код већине дивљих врста (Слика 2). Плод сазрева крајем лета и током јесени када се бере (Петровић, 2010).



Слика 1. Дивља јабука - дрво
Malus sylvestris (L.) Mill., Rosaceae

Табела 1. Дивља јабука у систематици биљака

Дивља јабука у систематици биљака	
Латински назив	<i>Malus sylvestris</i> L.
Народни синоними	Дивља јабука, шумска јабука, киселица
Лековити део биљке	fructus – плод
Царство	Plantaea – биљке
Ред	Rosales – руже
Породица	Rosaceae – руже
Род	<i>Malus</i> Miller – јабука

Дивље сорте јабука углавном нису погодне за велику производњу и за јело, јер не задовољавају стандарде у погледу изгледа, укуса и мириса због чега су економски

мање значајне у односу на гајене сорте (Goland и Bauer, 2004). Због тога је далеко мање студија које испитују карактеристике плодова јабуке аутохтоних врста, посебно дивљих врста јабука са територије Србије (Lesjak и сар., 2011; Stojiljković и сар., 2016a); Šavikin и сар., 2014; Žugić и сар., 2014). Са друге стране, истраживања која су рађена су показала да је боље, у циљу већег уноса антиоксидативних материја и других биоактивних супстанци, користити локалне аутохтоне, дивље врсте јабука у односу на гајене домаће врсте (Altisent и сар., 2014; Cekic и Ozgen, 2010; Begić-Akagić и сар., 2011; Kubola и сар., 2011; Šavikin и сар., 2014; Wojdyło и сар., 2008).



Слика 2. Плод дивље јабуке (*Malus sylvestris fructus* (L.) Mill., Rosaceae)

Дивља јабука се од давнина користила у традиционалној медицини као лековито средство за лечење гастроинтестиналних тегоба: чира, улкуса, гастритиса, у случајевима атеросклерозе, хипертензије, гојазности, анемије, хипергликемије, хиперхолестеролемије, као профилакса грипозних стања, код реуматизма, уринарних инфекција, мигрена, за јачање умне активности и издржљивости (Петровић, 2010; Сарић, 1989; Sivaci, 2006; Туцаков, 1997).

Плод дивље јабуке улази у састав и разних чајева (чај за добар сан, против хроничног замора, тровања, високог притиска, несвестице, против анемије, претеране гојазности, главобоље, мигрене, пролива, повраћања, вртоглавице, болести грла, окоштавање зглобова, перутавог ексема, импетига, проширених вена, огреботина од отровног бршљана, опстипације, ишијаса). Сиров или печен плод дивље јабуке може да олакша варење. Његова блага опорост и киселина олакшавају варење, неутралишу штетно деловање несварене хране и лече констипацију. Од плода дивљих јабука се прави и јабуково сирће које је, у разним комбинацијама, најчешће са медом и водом, вишеструко делотворан лек и окрепљујуће средство за људски организам (Петровић, 2010).

Нарендан плод дивље јабуке се користи код кожных упала, раница, опекотина, одеротина. Јабучна пулпа делује благотворно на кожу, освежава је, храни и благо затеже, а користи се и код фототоксичних промена на кожи, екцема, дерматитиса. Од давнина плод дивље јабуке се користио и за улепшавање. Козметичке маске од киселог плода дивље јабуке лако посветљују тен, а посебно се препоручују за уморну и масну кожу (Петровић, 2010; Sivaci, 2006; Туцаков, 1997).

1.1.1. Плод дивље јабуке - хемијски састав и примена

Дивља јабука представља биомаркер поднебља Србије (Сарић, 1989; Sivaci, 2006; Туцаков, 1997). Плод дивље јабуке (ПДЈ) је вредан извор биоактивних супстанци, које не само да утичу на хранљиву вредност, изглед, укус, боју и текстуру самог плода и хране у чији састав улазе, већ могу позитивно утицати и на здравље људи (Mendoza-Wilson и сар., 2016).

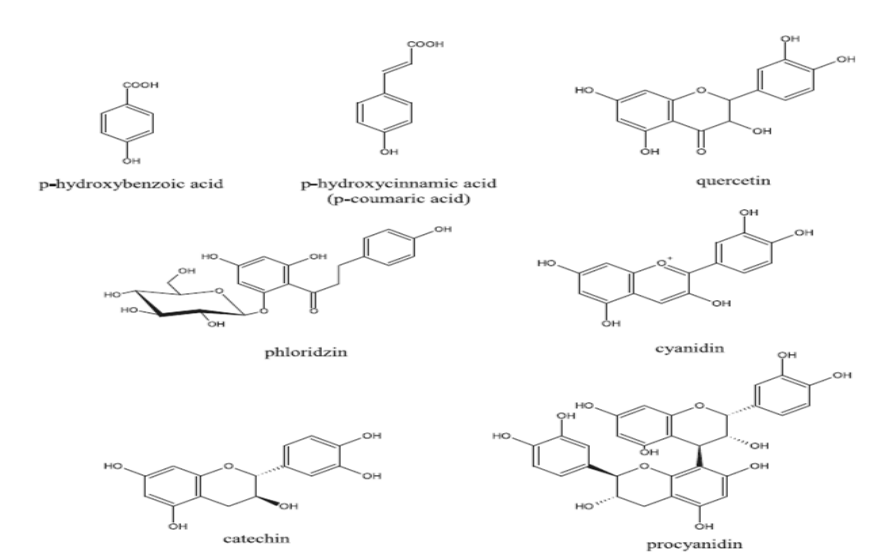
ПДЈ је богат минералима (калијум, калцијум, магнезијум, гвожђе, фосфор, цинк, јод), витаминима (витамин Ц, А, Б1, Б2, Б3, Б5, Б6, Б9 и бета каротен) као и биљним влакнима (целулоза) и шећерима (посебно фруктоза, глукоза, галактоза и сукроза) (Ма В и сар., 2015). Пектин кога ПДЈ садржи у великој количини чисти тело од тешких метала (олова, живе, арсена, радиоактивних елемената), спречава ресорпцију холестерола у танком цреву, успорава усвајање шећера и угљених хидрата (Петровић, 2010).

ПДЈ садржи различита полифенолна (ПФ) једињења са антиоксидативним деловањем (феноли, флавоноиди, танини, антоцијани) (Amzad Hossain и сар., 2009; Jakobek и сар., 2013; Maria Joh и сар., 2014; Schiberг и сар., 2001; Stojiljković и сар., 2016a); Šavikin и сар., 2014; Xiaoqian и сар., 2014). Ови молекули су секундарни метаболити биљака и учествују у њиховој заштити од ултравиолетног (УВ) зрачења и напада патогених микроорганизама. ПФ једињења показују способност да инхибирају стварање реактивних кисеоничних врста (РКВ), да буду њихови „хватачи“ (енг. *scavengers*), да појачавају резистентност липопротеина мале густине према оксидацији, да редукују продор УВ зрака до осетљивих ткива и неутралишу слободне радикале (Kohen, 1999). Флавоноиди испољавају антибактеријску, антиалергијску, антимуtagenу, антивирусну, антинеопластичну, антитромботичну и вазодилататорну активност, при чему је најизраженији њихов антиоксидативни и антиинфламаторни ефекат. Антоцијани су одговорни за боју плода дивље јабуке и показују, такође, добар

антиоксидативни потенцијал (Fine, 2000; Hagena и сар., 2007; Manach и сар., 2004; Šavikin и сар., 2014).

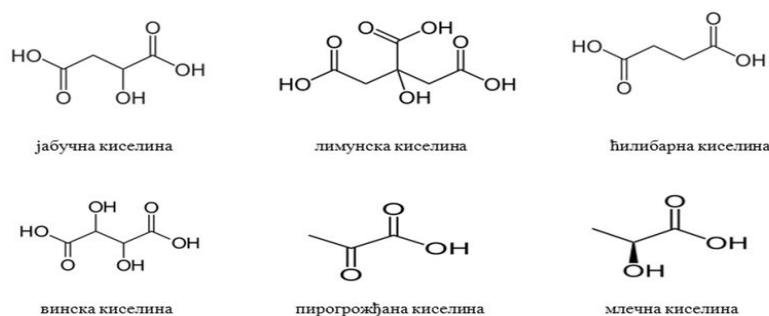
ПФ једињења која су најчешће присутна у плоду дивље јабуке се могу поделити у неколико група: деривати хидроксибензојеве киселине (прокатехинска, гална, сиригинска и гентизинска киселина), хидроксицинаминска киселина и њени деривати (*p*-кумарна киселина, кафена, ферулна и хлорогенска киселина), флавоноли (кверцетин присутан у облику глукозида, хиперозид, рутин, синенсетин), дихидрохалкони (флоридзин и његови деривати), антоцијанидини (цијанидин и његови глукозиди), мономерни флаваноли (епикатехин и катехин), олигомерни флаваноли (процијанидини) (Kalinowska и сар., 2014) (Слика 3).

Најчешће присутна фенолна киселина у ПДЈ је хлорогенска киселина која има велику способност „хватања“ слободних радикала. У поређењу са другим природним антиоксидансима, укључујући кверцетин, галну киселину и α -токоферол, хлорогенска киселина и хиперозид поседују највећу антиоксидативну активност (АА). Флавоноиди и хлорогенска киселина су веома битни за квалитет плода дивље јабуке. Цијанидин-3-галактозид је превасходно одговоран за црвену боју ПДЈ, а браон боја услед стајања, сечења, цеђења или прављења сока настаје услед оксидације хлорогенске киселине. Процијанидини, који су присутни углавном у кожи ПДЈ, су веома битни због свог позитивног антиоксидативног ефекта на здравље људи (Amzad Hossain и сар., 2009; Jakobek и сар., 2013; Maria Joh и сар., 2014; Mendoza-Wilson и сар., 2016; Schiber и сар., 2001; Šavikin и сар., 2014).



Слика 3. Молекуларна структура полифенолних једињења најчешће присутних у плоду дивље јабуке

ПДЈ садржи воћне киселине (ВК) из групе α -хидрокси киселина. Најчешће ВК присутне у ПДЈ су јабучна, лимунска, винска, ћилибарна, млечна, оксална, L-аскорбинска, пирогрођана, хининска и бадемова киселина (Слика 4). Присуство ВК утиче и на укус саме јабуке. Дивља јабука је далеко киселија од домаће, култивисане сорте, вероватно као последица присуства веће количине ВК. ВК дају опорост плоду и олакшавају варење „тешке“ хране (Ма В и сар., 2015; Zhang и сар., 2010). Осим што показују добар антиоксидативни ефекат ове природне ВК могу показати позитивне ефекте након примене на кожу (убрзавају десквамацију коже, хидратишу кожу, регулишу рН вредност коже, посветљују хиперпигментације коже) што доводи до побољшања општег стања и изгледа здраве коже. Безбедносни профил ових органских киселина природног порекла иде у прилог све чешћој примени ових ВК у производима намењеним за примену на кожу (Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010). Јабучна киселина је једна од најбитнијих ВК присутних у ПДЈ (Ма В и сар., 2015; Zhang и сар., 2010).



Слика 4. Молекуларна структура воћних киселина најчешће присутних у плоду дивље јабуке

1.2. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И КОЖА

Оксидативни стрес (ОС) представља дисбаланс између ћелијске продукције РКВ и способности ћелија да их неутрализују. Врло је тешко успоставити равнотежу између производње и неутрализације слободних радикала активацијом антиоксидативних механизма. Кумулативно формирање слободних радикала и њихов неповољан утицај на биолошке системе у ћелијама коже доводи до старења коже, до многих нежељених промена на кожи, као и до обољења коже. ОС игра важну улогу у модулирању обима инфламаторног одговора и последичног ткивног оштећења, односно до појаве разних структурних, функционалних и естетских промена на кожи (Carocho и Ferreira, 2013; Miyachi, 1995).

ОС значајно доприноси развоју и погоршању свих инфламаторних обољења у организму (артритис, васкулитис, гломерулонефритис, лупус), исхемијских обољења (болести срца, мождани удари, интестинална исхемија), гастричног улцера, хипертензије и прееклампсије, неуролошких обољења (мултипле склерозе, амиотрофичне латералне склерозе, мишићне дистрофије, Алцхајмерове болести, Паркинсонове болести), алкохолизма, имуносупресије, дијабетеса, опадања косе, болести повезаних са пушењем и многих других. Разлог што је хиперпродукција РКВ узрок тако широког спектра обољења је то што је оксидативни метаболизам нераскидиви део метаболизма сваке ћелије. Када је ћелија повређена или оболела то резултира митохондријалним оштећењем (инфлукс калцијума, цепање мембрана и сл.), чиме расте производња супероксида (McCord, 2008).

Интензивно излагање УВ зрачењу, загађење животне средине и хране, примена лекова, стрес, убрзани начин живота, доводе до интензивне продукције РКВ и последичног ОС. Као резултат овог стреса ћелије реагују на УВ оштећење модификованом експресијом гена, оштећењем дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК), што на крају резултује абнормалном ћелијском морфологијом, ћелијском апоптозом или некрозом и старењем и оштећењем коже (Scharffetter-Kochanek и сар., 1997).

Кожа као највећи људски орган и веома добро метаболичко ткиво је главни кандидат и мета ОС. Она је богата липидима, протеинима, угљеним хидратима и ДНК и сви ови молекули су веома осетљиви на деловање РКВ-а насталих услед ОС-а (Stadtman, 2006).

1.2.1. Слободни радикали

Кисеоник је од виталне важности за све живе аеробне организме. Парадокс аеробног начина живота је управо оксидативно оштећење кључних биолошких молекула, које угрожава структуру и функционисање живог организма (Carocho и Ferreira, 2013). Метаболички путеви поседују свега пар ензима који реагују са молекулом кисеоника, иако снабдевање енергијом комплетно зависи од преноса електрона кисеонику као акцептору (Benzie, 2003; McCord, 2008).

Постоји много врста слободних радикала, али се највише пажње (пошто су најважнији у патолошким поремећајима) посвећује кисеоничним радикалима. Термин РКВ укључује не само кисеоничне радикале, већ и неке нерадикалске деривате

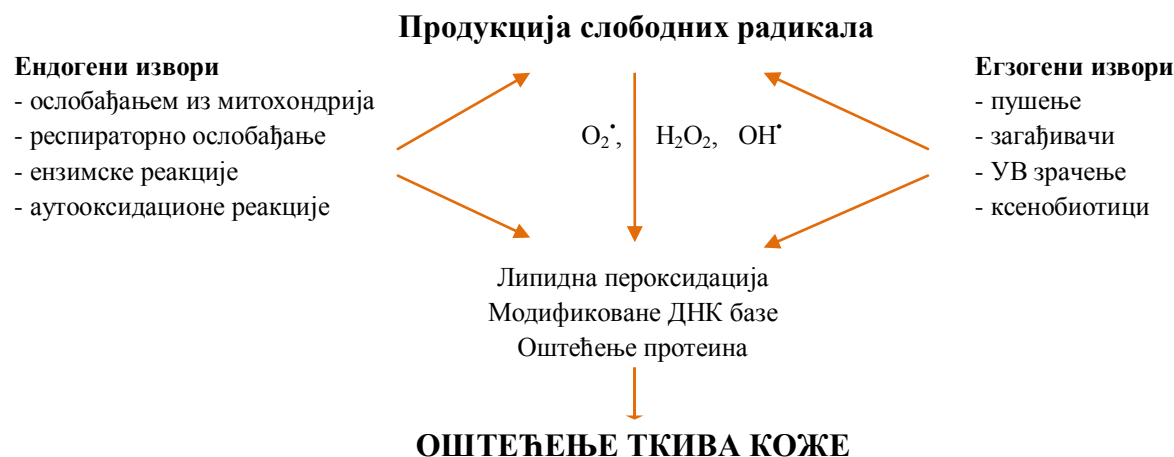
кисеоника (McCord, 2008). Међу битнијим кисеоничним метаболитима, који могу довести до биолошких оштећења на кожи или иницирати стварање реактивнијих метаболита, спадају супероксид радикал, водоник пероксид, хипохлорна киселина, хидроксил радикал, азот оксид радикал и кисеоник (Kohen, 1999) (Табела 2).

Табела 2. Најважнији реактивни облици кисеоника

(Преузето од Кохен и МекКорд, са модификацијама) (Kohen, 1999; McCord, 2008)

Радикалски облик	Не-радикалски облик
Супероксидни анјон - $O_2^{\cdot-}$	Синглет кисеоник - O_2
Пероксидни анјон - HO_2^{\cdot}	Водоник пероксид - H_2O_2
Хидроксидни анјон - HO^{\cdot}	Органски пероксид - $ROOH$
Алкоксил - RO^{\cdot}	Озон - O_3
Пероксил - ROO^{\cdot}	Хипохлорна киселина - $HOCl$

Слободни радикали могу настати ендогено (ослобађањем из митохондрија, у ензимским или аутооксидационим реакцијама) као и егзогено (УВ зрачење, примена ксенобиотица, пушење, загађено окружење). На Слици 5. су приказани извори слободних радикала у кожи и последице њиховог деловања (Young и сар., 2001).



Слика 5. Главни извори слободних радикала у кожи и последице њиховог деловања

1.2.2. Механизам оксидативног оштећења и промене на кожи

РКВ настале услед ОС-а могу иницирати липидну пероксидацију (углавном се дешава у ћелијским мембранама) и/или оксидативну модификацију протеина (Peres и

сар., 2011; Stadtman., 2006) (Слика 5). Овај процес може довести до промена у флуидности мембрана ћелија и ослобађања структурних и функционалних молекула мембрана, као и последично, до дисфункције ћелијских мембрана. РКВ такође могу директно инактивирати ензиме и проузроковати деградацију протеина. Деловањем РКВ на ДНК може доћи до хемијске модификације и прекида ДНК што може довести до разних штетних последица, чак и до појаве карцинома (Kohen, 1999; Stadtman, 2006; Stojiljković и сар., 2014) (Слика 5). Услед константног деловања РКВ на ћелије долази до постепеног пада нивоа активности антиоксидативних ензима и способности антиоксидативне одбране, што доводи до стварања и нагомилавања слободних активних радикала, као и до нагомилавања штетних продуката оксидативног оштећења (модификовани липиди, протеини, ДНК). Настали штетни продукти ОС могу иницирати и/или убрзати имуномодулацију и појаву меланома и карцинома (Peres и сар., 2011; Rattan, 2006).

Услед деловања РКВ и ОС може доћи до развоја многих кожних болести, као и до убрзаног старења коже при чему долази до прогресивних физиолошких промена на кожи. Долази до губитка поларности епидермиса и поремећаја физиолошког сазревања кератиноцита. Ћелије остарелог дермиса се мењају: фибробласти се продужавају и пропадају, постају хиперпластични и инфилтрирани инфламацијом, еластин квантитативно опада са годинама, и то пропорционално количини ОС (Kligman, 1989). Оштећење настало услед ОС се манифестује примарно као дезорганизација колагена фибробласта, који чини везивно ткиво (Табела 3) (Rabe и сар., 2006).

Табела 3. Компоненте коже: функција и промене услед оксидативног оштећења (Преузето од Рабе и сар., са модификацијама) (Rabe и сар., 2006).

Компонента	Функција	Промене услед ОС
Кератиноцити	Баријерна функција, механичка заштита, продукција цитокина	↓ баријерне функције ↓ пролиферација и диференцијација
Меланоцити	Синтеза пигмента за заштиту од УВ зрачења	↓ број меланоцита ↓ животни век
Фибробласти	Синтеза и деградација ЕЦМ	↓ броја фибробласта
Колаген	Компонента ЕЦМ	↓ биосинтеза ↑ стабилност и отпор ензимској деградацији
Еластин	Компонента ЕЦМ	↓ микрофибрилног садржаја Порозан, нејасан и фрагментован

ЕЦМ-екстрацелуларни матрикс; УВ-ултравиолетно зрачење

1.2.3. Одбрамбени механизми у заштити коже од оксидативног стреса

Механизам одбране коже од ОС је врло комплексан, због чега постоји неколико подела одбрамбених механизма у заштити коже од ОС-а. Да би се кожа изборила са сталним и претераним рефлуксом РКВ и како би смањила ОС и одржала редокс баланс ћелија, постоји неколико линија одбране: стабилизација, превенција, антиоксидативна одбрана и репарација (Benzie, 2003; Kohen, 1999). Као најважнији одбрамбени механизам сматра се антиоксидативна одбрана при чему ензими и „хватачи“ директно реагују са РКВ чиме их спречавају да дођу до биолошких мета (Shindo и сар., 1993). Различити одбрамбени механизми и примери антиоксиданаса су приказани у Табели 4.

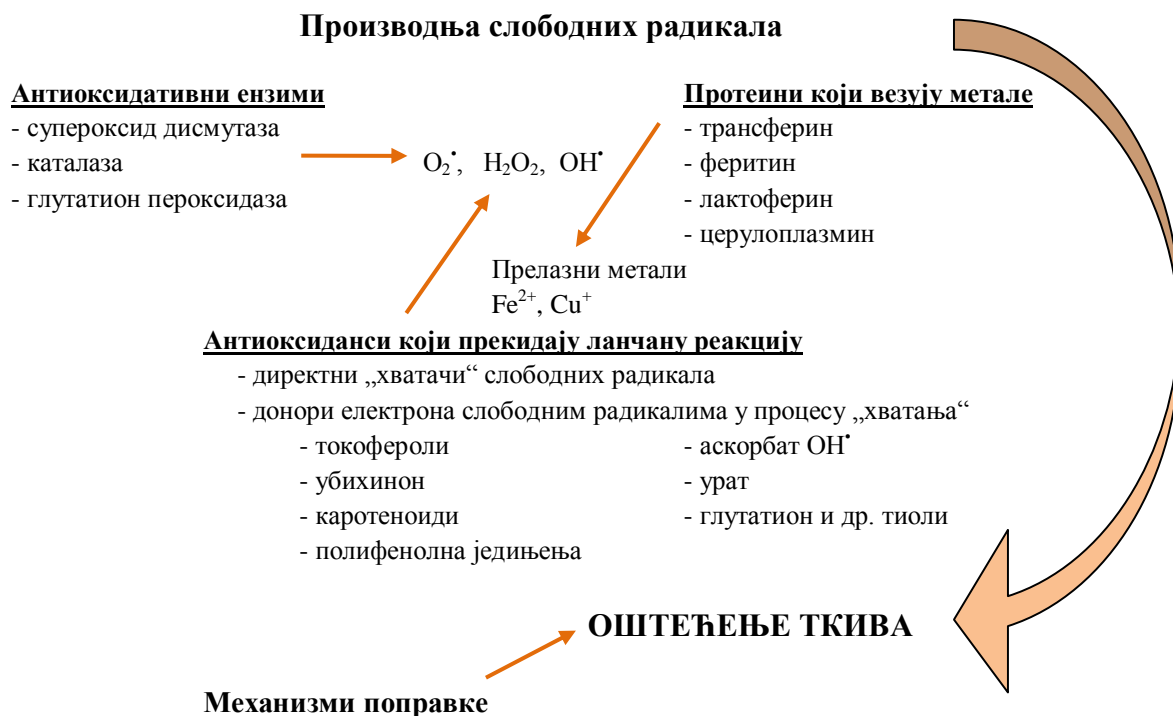
Табела 4. Одбрамбени механизми у заштити коже од ОС
(Подаци преузети од Бензе и Кохен, са модификацијама) (Benzie, 2003; Kohen, 1999)

ОДБРАМБЕНИ МЕХАНИЗМИ	
Физичка одбрана	- УВ филтри, меланин - стабилизација биолошких места (ћелијских мембрана)
Превентивни механизми	- хелирајући агенси (превенција продукције РКВ)
Антиоксидативна одбрана	- ензими, - „хватачи“ (нпр. полифенолна једињења, воћне киселине, витамин Ц, токофероли, каротеноиди...)
Систем репарације	- репарациони ензими (нпр. супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион редуктаза...)

Антиоксидативна једињења која учествују у одбрани коже од ОС-а се могу поделити на „ендогене“ (саставни део организма) и „егзогене“ (унети храном или локалном применом), а постоје и „поправни“ антиоксиданси (способни да поправе настало оштећење које РКВ направе, и то су углавном протеазе, липазе, трансферазе и ензими који поправљају оштећења настала на ДНК (Pietta., 2000).

Антиоксидативни системи одбране се, према другој групи аутора (Young и сар., 2001), могу поделити у три главне групе: група антиоксидативних ензима, група протеина који везују прелазне метале и група антиоксиданса који прекидају ланчану реакцију липидне пероксидације (Слика 6). Антиоксидативни ензими катализују неутралисање слободних радикала. Протеини који везују прелазне метале спречавају њихову интеракцију са водоник пероксидом и супероксидом што иначе доводи до настанка високо реактивних хидроксил радикала. Антиоксиданси који прекидају ланчану реакцију су снажни доноси електрона који реагују са слободним радикалима

пре него што се оштете циљни молекули, сами се оксидују и морају бити регенерисани или замењени. Радикалски облик антиоксиданаса који прекидају ланчану реакцију су нереактивни и не могу да реагују и активирају друге молекуле у ћелијама коже (Young и сар., 2001).



Слика 6. Антиоксидативни системи одбране

1.2.4. Антиоксиданси - антиоксидативни и прооксидативни потенцијал

Антиоксиданси се дефинишу као „било која супстанца која одлаже, превенира и уклања оксидативно оштећење настало на циљаном молекулу“ (Halliwell, 2007; 2008). Антиоксидативна једињења учествују у редокс реакцијама у којима могу да се понашају и као антиоксиданси (електрон доноси) и као прооксиданси (електрон акцептори) у зависности од њиховог окружења или примењене количине. С тога, постоји могућност да, у неком окружењу, антиоксиданси (ПФ једињења као природни антиоксиданси) који показују различит степен антиоксидативне и прооксидативне активности могу довести до различитих повољних и/или неповољних ефеката на кожи (Carocho и Ferreira, 2013; Choueiri и сар., 2012).

Антиоксидативна једињења могу директно да „хватају“ РКВ, да активирају антиоксидативне ензиме, да хелирају метале, редукују α -токоферол радикале, инхибирају оксидазе и спречавају ОС изазван азот оксидом. Својим антиоксидативним деловањем могу да учествују у превенцији, смањењу и уклањању штетних последица ОС (Royer и сар., 2013; Stojiljković и сар., 2016a); Šavikin и сар., 2014; Žugić и сар., 2014). Примена природних антиоксидативних једињења (пре свега ПФ једињења) у превенцији и/или терапији промена на кожи насталих као последица деловања ОС и РКВ додатно обезбеђује и појачава антиоксидативну заштиту коже и представља секундарну превенцију у заштити коже од ОС (Almeida и сар., 2008; Khan и сар., 2013).

Антиоксидативна једињења (од којих и ПФ једињења) се, под одређеним условима, могу понашати и као прооксиданси и иницирати оксидацију других једињења. Они могу показати директну прооксидативну активност а могу довести и до оксидације помоћу фенокси радикала и помоћу пероксидаза (Procházková и сар., 2011). Многи флавоноиди могу показати различите степене антиоксидативне и прооксидативне активности. Неки од њих су епигалокатехин-галат, кверцетин, генистеин, таксифолин који при високим дозама могу показати и нежељне ефекте (Choueiri и сар., 2012). Не мора значити да прооксидативна активност увек доводи до неповољних ефеката. Прооксидативна активност ПФ може бити и корисна, јер могу довести до ниског степена ОС што је у неким случајевима потребно. Својим прооксидативним дејством антиоксидативну одбрану и биотрансформацију ензима могу да подигну на виши ниво, што све води ка ћелијској заштити. Њихово прооксидативно дејство је управо повезано са ћелијском сигнализацијом због чега полифеноли могу координирати у ћелијској функцији. Такође, метаболизам ПФ као ксенобиотика је веома брз у организму услед чега се врло брзо уклањају из циркулације и на тај начин могу извршити детоксикацију ензима и заштити организам од мутација и канцерогенезе, а не довести до штетних ефеката (Procházková и сар., 2011).

1.3. СУВА КОЖА - СТРУКТУРНЕ, ФУНКЦИОНАЛНЕ И ЕСТЕТСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ

Кожа, као највећи орган, има многобројне функције: регулисање телесне температуре, спречавање прекомерног губитка воде у спољашњу средину, имунолошка

и ендокрина функција. Главна функција коже је пре свега заштитна, при чему кожа представља баријеру за спољашње физичке и хемијске агенсе, али спречава и губитак воде и електролита из организма. Спољашњи слој епидермиса (енг. *stratum corneum* (SC)) представља слој са највећом водоотпорношћу и штити организм од различитих спољашњих утицаја. Он спречава ослобађање воде из дубљих слојева коже и презасићење коже водом из спољашње средине (Harding, 2004). Вода долази до површине коже кроз знојне канале као и пасивном дифузијом кроз епидермис, при чему интегритет SC-а одређује степен трансепидермалног губитка воде (ТЕГВ). Баријерна функција коже зависи од садржаја и структуре липида у SC-у, степена влажности коже, величине корнеоцита и дебљине SC-а и може да утиче и на механичка својства SC-а. Механичке особине SC-а у великој мери зависе од влажности коже у SC, док влажност коже у великој мери зависи од релативне влажности ваздуха. Молекулска маса и липофилност биоактивне супстанце су важни фактори који одређују степен пенетрације биоактивних супстанци у/кроз кожу (Berardesca и сар., 1999).

Готово 10% SC-а представљају липиди који су распоређени двослојно чинећи тзв. структуру течних кристала и имају важну улогу у спречавању дехидратације коже. Када садржај воде у кожи падне испод одређеног нивоа, структура течних кристала се нарушава (Лукић, 2014; Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007). Да би кожа била мека и одржала своју еластичност, садржај воде у SC-у мора бити најмање 10-15%, при чему се код нормалне коже ниво влажности постепено смањује од дубљих ка површинским слојевима коже. Нормално унутар коже постоје супстанце које задржавају воду и спречавају губитак течности из њених дубљих слојева кроз епидермис. Природни масни филм на површини коже створен од себума и мртвих, одбачених, рожнатих ћелија, такође, битно успорава испаравање. Хидратација коже може бити под утицајем фактора спољашње средине и локално примењених влажећих и/или оклузивних производа (Draelos, 2010; ElGammal и сар., 1996; Лукић, 2014; Pons-Guiraud, 2007; Rawlings и сар., 2006; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007). Код особа које су генетски предиспониране и имају атопијску конституцију, баријерна функција коже је значајно умањена, што се манифестује повећањем ТЕГВ и њеним додатним исушивањем. Код тих особа јавља се недостатак одређених категорија липида у SC-у. Сува кожа може бити узрокована и себостазом (умањеном активношћу лојних жлезда) или смањењем капацитета SC-а да

везује и складишти воду, често због недостатка природног влажећег фактора (Loden, 2003; Marty, 2002; Васиљевић и сар., 2009; 2007).

Кожа поседује добар пуферски капацитет којим, услед нарушавања рН вредности коже деловањем разних егзогених и ендогених фактора, регулише физиолошку рН вредност (Giacomoni и сар., 2009; Тасић-Костов, 2013). Просечне вредности рН здраве коже се крећу у границама од 4,60 до 5,80 (мерено на кожи унутрашње стране подлактице) (Ehlers и сар., 2001; Jacobi и сар., 2005). Локална примена (дермо)козметичких производа рН вредности између 3 и 4 убрзава десквамацију на површини SC-а (чиме се делимично може објаснити механизам деловања производа са ВК), рН вредност између 4 и 7 обезбеђује и одржава адекватну рН вредност коже (што иде у прилог производима биљног порекла који садрже ПФ једињења), док у случају производа високе рН вредности (око 8) чак долази до пролазног оштећења баријерне функције SC-а (Giacomoni и сар., 2009).

Сува кожа представља стање коже са смањеном количином и/или квалитетом воде/влаге и липида у кожи. Она представља чест (дермо)козметички проблем, који варира од физиолошки суве (здраве коже) до патолошки суве (дерматолошки оболеле) коже, а чији изглед може значајно да се разликује у зависности од стања у коме се кожа налази (Caussin и сар., 2007; Pons-Guiraud, 2007). Разликују се бар четири предиспонирајућа фактора за појаву овог стања: недостатак влаге у SC-у, епидермална хиперпролиферација, неадекватна синтеза интерцелуларних липида SC-а, оштећење баријере деловањем егзогених фактора (најчешћи РКВ). Исушивање коже је начешће покренуто или често погоршано егзогеним или ендогеним факторима. У егзогене факторе се убрајају климатски услови (изложеност сунцу, тј. деловање ОС и насталих РКВ, топлота, сув и хладан ваздух), различити животни услови и личне навике (употреба средстава за одржавање личне хигијене и различитих козметичких производа). Ендогени фактори укључују лекове и хормонске дисбалансе (ElGammal и сар., 1996; Pons-Guiraud, 2007).

Сува кожа се карактерише grubим изгледом, перутањем, губитком тургора и смањеном еластичношћу, што се процењује биофизичким методама. Објективна дијагностика суве коже подразумева мерење садржаја влаге у кожи (хидратисаности SC-а), одређивање ТЕГВ-а, еластичности и вискоеластичности коже и сјаја, мерење рН вредности коже, степена иритације и/или меланин индекса. Субјективна процена указује на осећај пецкања и затезања, што може бити изоловано на појединим

деловима тела (Loden, 2003; Naik и сар., 1999; Rawlings и Harding, 2004; Rogiers, 2004; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007).

Кожа која стари хронолошки, тј. која није била континуирано изложена деловању РКВ и ОС је глатка и без изражених флека (хипер и хипопигментације), са нормалним рељефом, углавном са израженим мимичним борама и линијама. Код такве коже углавном се манифестује атрофија епидермиса и дермиса, заравнавање епидермиса, смањење броја фибробласта и маст ћелија и пораста броја колагених влакана (Baumann, 2007) (Табела 5). Кожа особе која је била хронично изложена деловању РКВ и ОС (лице, врат, деколте, спољашње површине коже руку) карактерише се великим бројем знакова оксидативног оштећења коже, као што су пигментне лезије (лентиго), губитак тонуса и еластичности, повећана фрагилност, слабост крвних капилара – видљиве кератозе. Запажају се еластозе у дермису, атрофија епидермиса, јасне промене у изгледу колагених и еластичних влакана (фрагментисани колаген и већи садржај раствореног колагена). Еластична влакна су такође фрагментисана, неправилно умрежена и калцификована. Према интензитету промена и година старости, направљена је Глогова скала која даје четири типа коже, што је приказано у Табели 5 (Baumann, 2007).

Табела 5. Глогови (енг. *Glogau*) типови фотоостареле коже услед деловања ОС (Преузето од Бауман, са модификацијама) (Baumann, 2007)

Тип коже	Видљиве промене	Кератозе	Боре	Године
Тип I „без бора“	благе пигментне	нема	минималне	млађе особе 20-30 год.
Тип II „боре у кретању – мимичне“	рани сенилни лентиго	опипљиве, али нису видљиве	паралелне линије осмеха бочно од усана	касне 30-те или 40-те
Тип III „боре у одмору“	очигледна дисхромија	видљиве	присутне и у мировању	50-те или старије особе
Тип IV „само боре“	жуто-сива боја	претходи малигним променама на кожи	потпуно наборана, нема нормалне коже	6. или 7. деценија

Промене настале на кожи услед интензивног деловања ОС и дехидратације не могу се увек физиолошки компензовати па захтевају додатну примену (дермо)козметичких производа или појединачних компоненти, које могу да утичу на

пластичност и хидратисаност коже (Савић, 2004). Због тога огрубела, наборана, сува и оштећена кожа представља проблем који је и (дермо)козметичкој индустрији предмет посебне пажње и интересовања.

1.4. (ДЕРМО)КОЗМЕТИЧКИ ПРОИЗВОДИ АНТИОКСИДАТИВНОГ И ХИДРАТАНТНОГ ДЕЛОВАЊА

Козметички производ се, према важећим законским прописима на територији Европске Уније (ЕУ) – Уредба ЕУ о козметичким производима – Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, која је ступила на снагу јула 2013. год., дефинише као *"било која супстанца или производ намењен контакту са различитим спољашњим деловима људског тела (епидермис, коса, нокти, усне и спољашњи генитални органи), или са зубима и слузокожом усне дупље, са циљем да их штите, парфимишу, мењају њихов изглед и/или коригују мирисе тела и/или штите, односно одржавају их у добром стању"*.

Постоји све веће интересовање научне јавности за проучавањем природних извора (пре свега биљних) козметички активних супстанци (КАС), као замена синтетским, које би се могле користити у формулацији (дермо)козметичких производа, са циљем ефикасније одбране коже од ОС и боље хидратисаности коже (Rouyer и сар., 2013; Stojiljković и сар., 2016a); Šavikin и сар., 2014; Žugić и сар., 2014).

1.4.1. Полифенолна једињења као козметички активне супстанце

Примена антиоксиданаса природног порекла (ПФ једињења) у (дермо)козметичким производима (производи за превенцију и успоравање процеса старења коже (енг. *anti-age* производи), за заштиту коже од ОС, за негу коже након сунчања, код превенције одређених стања/болести коже) има све више оправдања и све више је заступљена, управо због ефикасности коју прозводи са овим биљним антиоксидансима испољавају, нешкодљивости и безбедности коју показују, ови производи су пријатни за кожу а истовремено естетски и еколошки прихватљиви (Almeida и сар., 2008; Stojiljković и сар., 2016a), 2014; Tasić-Kostov и сар., 2012; Žugić и сар., 2014; Wojdyło и сар., 2008). ПФ једињења (феноли, флавоноиди, танини, антоцијани) показују добру АА. Они могу директно да „хватају“ слободне радикале, показујући висок афинитет за РКВ, могу да их ибирају стварање РКВ, да активирају

антиоксидативне ензиме, да хелирају прооксидативне јоне метала, редукују α -токоферол радикале, инхибирају оксидазе и неутралишу слободне радикале. Они прекидају ланац липидне пероксидације, спречавају оштећења липида, протеина и ДНК у кожи па су веома битни као саставни део производа намењених за превенцију старења коже, као и производа за превенцију и/или третман болести насталих услед ОС (Stojiljković и сар., 2018; 2014; Šavikin и сар., 2014; Žugić и сар., 2014). Флавоноиди као полифенолна мултиактивна једињења имају вишеструку примену (Arct и Rytkowska, 2008). Они показују неспецифичну физичко-хемијску активност и афинитет за велики број рецептора у ткивима. Њихова биолошка активност се огледа кроз: антирадикалску активност, комплексирање метала, везивање протеина, антиинфламаторну и антимикуробну активност, протективни ефекат на зидове крвних судова, утицај на неутрофилне гранулоците, заштиту витамина Ц, инхибицију оксидације адреналина, инхибицију хијалуронидазе и медијатора инфламације, инхибицију синтезе фибрина и ослобађања хистамина (Arct и Rytkowska, 2008; Procházková и сар., 2011). ПФ једињења могу деловати различитим механизмима у истом систему у различитим стадијумима процеса оксидације или се један механизам дејства може разликовати у зависности од реакционог система. ПФ чак могу на различите начине да одговоре на различите РКВ или изворе оксиданаса. Сам ефекат на кожи може бити удружен са деловањем и других активних биљних изолата, па се код биљних КАС може говорити и о потенцијалном синергизму активних материја (Arsić и сар., 2011; Žugić и сар., 2014). Позитивне ефекте ПФ једињења показују и на културама ћелија, при чему доводе до повећања вијабилности и пролиферације ћелија у култури (Procházková и сар., 2011; Savić и сар., 2015).

Својим деловањем ПФ једињења могу да превенирају, смање или отклоне штетне последице деловања ОС и доведу до побољшања функције и структуре коже, као и естетског изгледа (Royer и сар., 2013; Stojiljković и сар., 2016a); Šavikin и сар., 2014; Žugić и сар., 2014). Погодан безбедносни профил ПФ једињења као биоактивних супстанци из биљних екстраката у складу је и са данашњим потребама и очекивањима савременог потрошача/корисника (Almeida и сар., 2008; Khan и сар., 2013).

1.4.2. Воћне киселине као козметички активне супстанце

Ефекти примене на кожу различитих производа који садрже ВК из групе α -хидрокси киселина као КАС познати су вековима уназад и временом су нашле своју

примену у локалном третману суве и грубе коже, перути, акни, кератоза, ожиљака, бора и фотоостареле коже (Al-Bawab и Friberg, 2004; Berardesca и сар., 1997; Briden, 2004; Rogiers, 2004; Smith, 1994; Van Scott и сар., 2004; 1996). Ове киселине имају епитет природних КАС („воћне“ киселине) и већина њих може се наћи у плодовима неких биљака (Green и сар., 2009; Stojiljković и сар., 2018; Yu и Van Scott, 2004). Типични представници ВК, најчешће коришћених као КАС, су јабучна, млечна, лимунска, винска, ћилибарна, пирогрождјана, малеинска киселина и др. Бројна стања коже која се успешно могу третирати производима са ВК у суштини су повезана са дехидратацијом коже, неравномерном десквамацијом, ретенцијом корнеоцита или поремећајем епидермалне баријере (Yu и Van Scott, 2004).

Продужена примена производа са малим концентрацијама ВК као КАС има вишеструко позитивно дејство на кожу. Може довести до убрзане десквамације, стимулације синтезе хијалуронске киселине и колагених влакана, регулације рН вредности и пластификацију, односно, бубређе SC-а. Примена ВК на нивоу епидермиса слаби кохезионе силе између корнеоцита при чему долази до смањења броја дезмозома. На тај начин долази до измене кератинизације и ћелијског ремоделовања у најдубљим слојевима SC-а (Yu и Van Scott, 2004). Неке од ВК могу показати и хидротропно дејство и довести до нарушавања структуре фазе течних кристала (Al-Bawab and Friberg, 2004). С обзиром да је извесно да је структурна организација липида SC-а слична структури фазе течних кристала (McIntosh, 2003; Norlén, 2003), могуће је да локална апликација ВК доводи и до промена у структури липидног матрикса SC-а што може свакако представљати један од потенцијалних механизма деловања производа са ВК. Повећање рН коже углавном прати ретенција корнеоцита у SC-у, и као последица могу се јавити нека патолошка стања. Нижа рН вредност у дубљим слојевима је неопходна за нормалну ексфолијацију, па примена производа са ВК може показати позитивне ефекте на кожи, с обзиром да продужена примена ових производа доводи и до смањења (нормализације) рН вредности (Nachem и сар., 2003; Тасић-Костов, 2013). (Дермо)козметички производи са ВК на нивоу дермиса доводе до стимулације активности фибробласта тј. повећане биосинтезе колагених влакана и хијалуронске киселине. То резултује повећањем укупне дебљине коже након дуготрајног третмана, ублажавањем постојећих и спречавањем стварања нових манифестација старења коже, пре свега бора (Van Scott и сар., 1996; Yu и Van Scott, 2004).

Треба нагласити способност производа са ВК да ефикасно хидратишу кожу, нарочито јако суву (Al-Bawab и Friberg, 2004; Berardesca и сар., 1997; Briden, 2004; Smith, 1994; Rogiers, 2004, Van Scott и сар., 2004; 1996). Сматра се да влажеће дејство ВК на кожи потиче не само од хумектантног деловања, већ и од нормализације, кератинизације и пластификације SC-а коју ове α -хидрокси киселине врше након дуготрајније апликације на кожи (Tasić-Kostov и сар., 2012; Yu и Van Scott, 2004). Производи са ВК се могу користити и као адјувантна локална терапија у третману неких патолошких стања коже, као што су акне, фотостарење, ихтиозе, хиперкератозе, као и стања везана са патолошки исушеном кожом, па чак и у третману псоријазе и тако побољшати ефекат саме терапије (Fluhr и сар., 2008; Green и сар., 2009). Ефекат бељења/посветљивања хиперпигментација на кожи (како здраве тако и коже са поремећајем пигментације), које ове воћне киселине могу да покажу, је углавном последица измене епидермиса (Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2010; Тасић-Костов, 2013; Usuki и сар., 2003).

Као резултат свеукупног деловања производа са ВК, долази до побољшања општег стања и изгледа здраве коже, јер уједначавањем текстуре, кожа делује свежије и светлије услед повећања влажности у SC-у; смањује се интензитет хиперпигментација и број хиперкератотичних лезија, укључујући и оне у изводним каналима лојних (себацеалних) жлезда. Такође, као последица смањења дубине бора и уједначавања текстуре коже, она делује глатко и затегнуто (Green и сар., 2009; Yu и Van Scott, 2005; 2004).

Зог овако широке примене, производи који садрже ВК представљају једну од значајних група (дермо)козметичких производа (Al-Bawab и Friberg, 2004; Berardesca и сар., 1997; Briden, 2004; Harold, 2005; Rogiers, 2004; Smith, 1994; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2010; Van Scott и сар., 2004; 1996). За остваривање њихових ефеката неопходно је да ВК буду у недисосованом облику да би стигле до места деловања. Кисела природа ВК сужава избор помоћних супстанци и стабилних носача за ове КАС (Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Остали фактори који утичу на ефикасност производа са ВК су врста и концентрација ВК, носач, време изложености коже деловању ВК и тип коже на коју се примењује (Al-Bawab и Friberg, 2004; Harold, 2005; Ramos-E-Silva, 2001; Тасић-Костов, 2013).

1.4.3. Емулзиони носачи за биљне екстракте

При формулацији носача за биљне екстракте као КАС, требало би узети у обзир одабир емулгатора као стабилизатора емулзионог система, затим емолијенаса, који репарирају баријерну функцију коже, истовремено омекшавају кожу и утичу на њену влажност, конзерванса (сходно препорукама прописа ЕУ (Regulation (EC) No 1223/2009)), хумектанса као и средстава за модификацију вискозитета. Носач може да интерагује са КАС и делује синергистички, али и да умањи њену ефикасност; може да јача баријерну функцију коже, али и да индукује иритације и алергијске реакције (Epstein, 2009; Klein, 2005; Savić и сар., 2014; 2010; Тасић-Костов, 2013). Из тог разлога при одабиру и формулацији носача за (дермо)козметичке производе треба узети у обзир опште захтеве који се тичу безбедносног профила производа, физичко-хемијских карактеристика и евентуалних ефеката самог носача на кожу, али и посебне захтеве који се тичу физичко-хемијских карактеристика саме КАС и њене компатибилности са одабраним носачем. Са еколошким освешћивањем широког круга потрошача јавља се и потреба за природним, „зеленим“, биодеградабилним сировинама (Лукић, 2014; Савић, 2004; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013; Von Rybinski, 1996).

И поред великог броја различитих носача који су данас доступни, емулзије остају далеко најпопуларније и најкоришћеније у свим производима намењеним локалном третману коже (Klein, 2005; Tasić-Kostov и сар., 2014). Разлози су бројни: елегантност производа, лакоћа примене, пријатан осећај на кожи након наношења, позитивна реакција од стране потрошача-корисника, а као врло битно треба истаћи и инхерентну способност ових система да делују емолијентно и додатно хидрирају кожу (Al-Bawab и Friberg, 2006). Такође, хидратација повољно утиче на дерматитис који је пратећи симптом фотоостареле или коже оштећене утицајем ОС-а. Међутим, набројане позитивне особине емулзија као носача могу се испољити само уколико је задовољена физичко-хемијска стабилност. Ако узмемо у обзир чињеницу да су емулзије термодинамички нестабилни системи, формулисање стабилних емулзионих носача претходно наведених особина представља прави изазов (Eccleston, 1997а); 1997б)). Осим наведених општих захтева које треба испоштовати при формулисању емулзионих носача за (дермо)козметичке производе, у случају биљних екстраката треба имати у виду њихове особине које могу утицати на квалитет и карактеристике финалне емулзије. (Дермо)козметички производи који садрже биљне екстракте богате

ПФ једињењима и ВК-ма, су врло често намењени апликацији на кожу са нарушеном баријерном функцијом, па носач не сме додатно да оштећује, иритира и исушује кожу, да не ремети рН вредност, пожељно је да смањује ТЕГВ и да уједно хидратише кожу (Al-Bawab и Friberg, 2006; Tasić-Kostov и сар., 2012; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2014).

Избор носача је један од најважнијих корака за повећање ефикасности КАС. Код производа за примену на кожу носач може да утиче на ослобађање биоактивне супстанце, пропустљивост коже, побољшање или смањење перкутане пенетрације. Ослобађање биоактивне супстанце из носача је први веома значајан корак у постизању локалног ефекта. Терапијска ефикасност биљних екстраката може да зависи и од физичко-хемијског састава носача (Rougier и сар, 2002; Savić и сар., 2015; Савић, 2004; Smith и сар, 2002). Идеалан носач за КАС би требало да испуни више различитих функција: козметичку прихватљивост, биокомпатибилност, хемијску, микробиолошку и физичку стабилност и способност да лако ослободи биоактивну супстанцу у SC-у (Табела 6).

Табела 6. Критеријуми за избор носача за локалну примену
(Преузето од Савић и Смит, са модификацијама) (Савић, 2004; Smith и сар., 2002)

Фармацеутско-технолошки критеријуми
<ul style="list-style-type: none">- стабилност активне супстанце и стабилност компоненти подлоге- реолошка својства – конзистенција, моћ истискивања- губитак воде и других испарљивих састојака- фазне промене – хомогеност/фазна сепарација, цурење- величина капи/честица и дистрибуција величине капи/честица- рН вредност- олакшано/побољшано ослобађање активне супстанце из подлоге
Козметички и критеријуми везани за примену носача на кожу
<ul style="list-style-type: none">- визуелни изглед производа, мирис, боја,- лакоћа којом се производ истискује из контејнера- апликативне карактеристике, текстура (чврстина, хомогеност, масноћа, адхезивност)- резидуални осећај након примене, задржавање на кожи
Биофармацеутски критеријуми
<ul style="list-style-type: none">- олакшано ослобађање активне супстанце и задржавање у кожи- контролисано ослобађање активне супстанце и задржавање у кожи- циљано ослобађање активне супстанце и задржавање у кожи

За стабилност емулзија стабилованих мешаним емулгаторима одговорно је формирање специфичних ламеларних фаза (течно-кристалних и гел), које су у стању да инкорпорирају велике количине воде (Junginger, 1997). Теорија гелске мреже објашњава феномен стабилизације емулзионих система помоћу мешаних емулгатора (Eccleston, 2010; 2001; 1997a); Junginger, 1997). Течне кристале карактерише веома организована микроструктура, која је даље способна да формира мултиламеларне структуре, које могу да се понашају као специфични модулатори задржавања воде у SC-у. У зависности од његове колоидне структуре носач може утицати на влажност коже контролисањем начина дистрибуције воде унутар система. Зато је за добру структурацију и стабилизацију емулзија као носача активних биљних екстраката врло битно правилно одабрати емулгатор. Од емулгатора се очекује и да није агресиван, да не исушује кожу, не отклања липиде са површине коже и не ступа у интеракције са протеинима коже (Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Савић, 2015; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007).

Конвенционални (нејонски) мешани емулгатори су дуго били најчешће коришћени емулгатори за стабилизацију емулзија, како због добре физичке стабилности и компатибилности са већином активних супстанци, тако и због умањеног иритационог потенцијала у поређењу са јонским емулгујућим восковима (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Savić и сар., 2015; Савић, 2015; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013). Од нејонских површински активних материја, у поменуте сврхе углавном се користе оне које у свом хидрофилном делу садрже велики број полиоксиетиленских (ПОЕ) група. Ланци ПОЕ, због јаке хидрофилности, интензивно везују воду и у току складиштења емулзија, па долази до накнадне структурације (промене конзистенције очвршћавањем) (Eccleston, 1997a); 1997b)) што некада може резултовати лошијим апликативним и естетским особинама емулзија. Емулзије стабиловане кисело-стабилним конвенционалним емулгаторима, који у свом молекулу садрже велики број ПОЕ група, некада могу довести до иритације коже и повећати ТЕГВ, па је потребан опрез при формулацији, да би се добио производ оптималних апликативних особина и прихватљивог безбедносног профила (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Савић, 2015, Тасић-Костов, 2013; Yu и Van Scott, 2005).

За стабилизацију емулзија се, поред традиционалних конвенционалних, мешаних емулгатора, све више користе емулгатори природног порекла (алкил полиглукозиди (АПГ)), који су биодеградабилни и доброг безбедносног профила. АПГ

емулгатори, тзв. „шећерни“ сурфактанати показују предност у односу на традиционално коришћене ПОЕ деривате пре свега у погледу компатибилности са кожом (сличност са структуром коже) и животном околином (Geetha и Tyagi, 2012; Holmberg, 2001; Pantelić и Cucković, 2014; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2014; Savić и сар., 2010; Stubenrauch, 2001; Tasić-Kostov и сар., 2012). Формулисане емулзије стабилизоване фазом течних кристала, која је слична и компатибилна са структуром липида у SC-у поседују потенцијал за инкорпорирање и хидрофилних и липофилних супстанци (Макаи и сар., 2003; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013), при чему пружају могућност контролисане хидратације коже (Junginger, 1997; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013). Могућност добијања из обновљивих природних извора, биодеградабилност као и мултифункционалност (коришћење у производњи детерџента, прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији) условиле су статус АПГ као истакнутог представника шећерних емулгатора. Потенцијал примене ових емулгатора у козметологији је све већи с обзиром да нису токсични, да не изазивају алергијске реакције и иритације (Geetha и Tyagi, 2012; Pantelić и Cucković, 2014; Savić и сар., 2014; 2011; Tadros, 2005; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010), као и потенцијал да, због присуства великог броја хидроксилних група у молекулу, могу додатно да утичу на влажење коже (Junginger, 1997; Лукић, 2014; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013).

2. ЦИЉ И СТРАЖИВАЊА

Циљ докторске дисертације био је формулација емулзија стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима, као носача за екстракте плода дивље јабуке (ЕПДЈ), *Malus sylvestris fructus* (L.) Mill., Rosaceae, као природног извора биоактивних супстанци, и испитивање њихове структуре, стабилности, безбедности и ефикасности у циљу развоја производа за превенцију и/или третман оштећења и промена на кожи насталих деловањем оксидативног стреса, за хидратацију и/или за посветљивање хиперпигментација коже. У складу са наведеним, постављени циљ у оквиру докторске дисертације остварује се у више фаза:

- 1. Оптимизација екстракције ПДЈ:** екстракција биоактивних супстанци из ПДЈ коришћењем различитих метода екстракције (мацерација, дигестија, перколација, Soxhlet и ултразвучна екстракција) и различитих средстава за екстракцију (70% етанол, 45% пропиленгликол, 80% пропиленгликол, пречишћена вода, хладно цеђено маслиново уље и сунцокретоно уље).
- 2. Карактеризација израђених ЕПДЈ *in vitro*:** одређивање органолептичких и физичко-хемијских параметара (рН вредност, индекс рефракције и релативна густина), одређивање укупног садржаја ПФ једињења (феноли, флавоноиди, танини и антоцијани) и идентификација и стандардизација садржаја (HPLC анализом) ПФ компоненти и ВК (јабучне, лимунске, винске, млечне, ћилибарне, пирогрожђане и др.), као и одређивање антиоксидативне активности *in vitro* тестовима (DPPH тест, FRAP тест и тест са линолном киселином), у циљу одабира погодне екстракционе методе и средства за екстракцију који ће дати екстракте са најбољим карактеристикама и са највећим садржајем биоактивних ПФ једињења и ВК и највећу АА у циљу њиховог инкорпорирања у емулзионе системе (кремове типа емулзија у/в (уље/вода)) стабиловане конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима.
- 3. Испитивање безбедности и ефикасности примене израђених ЕПДЈ тестовима *in vitro*:** утицај на вијабилност фибробластних ћелија L929 ћелијске линије; очекује се да ЕПДЈ неће деловати цитотоксично на ћелије одабране ћелијске линије.
- 4. Формулација и израда емулзија у/в типа са одабраним ЕПДЈ:** инкорпорирање одабраних ЕПДЈ, са најбољим карактеристикама, у физички стабилне емулзије у/в

типа (стабилизоване конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима); очекује се да се изврши формулација физички стабилних емулзија са одабраним ЕПДЈ.

- 5. Карактеризација формулисаних емулзија у/в типа са одабраним ЕПДЈ:** одређивање органолептичких и физичко-хемијских карактеристика (рН вредност и електрична проводљивост), испитивање стабилизације формулисаних емулзија испитиваним мешаним емулгаторима (ламеларном фазом течних кристала), идентификација и стандардизација садржаја ПФ компоненти и ВК (HPLC анализа), утврђивање АА емулзија у *in vitro* условима (DPPH тест). Утврдиће се и физичка стабилност емулзија са ЕПДЈ (испитивање стабилности након теста убрзаног старења и центрифугирања и стабилност у периоду од 6 месеци чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$); очекује се да се потврди задовољавајућа стабилизација испитиваних емулзија (идентификација фазе течних кристала), добра стабилност и константна рН вредност која одговара производима намењеним за примену на кожу као и добра и стабилна електрична проводљивост. Очекује се да емулзије покажу и добар и константан садржај ПФ једињења и ВК, као и добру и стабилну АА.
- 6. Испитивање иритационог потенцијала и безбедност примене плацебо емулзија у/в (подлоге) и емулзија са одабраним ЕПДЈ, стабилизоване конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима тестовима *in vivo*:** испитивања након апликације на здраву кожу испитаника и оклузије коже од 24 сата, мерењем електричне капацитивности (енг. *electrical capacitance* (EC)), трансепидермалног губитка воде (енг. *transepidermal water loss* (TEWL)), рН коже и еритема индекса (енг. *erythema index* (EI)) пре апликације и након примене под оклузијом; очекује се да испитиване емулзије не покажу нежељене ефекте на кожи и да не поседују иритациони потенцијал, што је један од показатеља безбедне примене испитиваних емулзија са ЕПДЈ.
- 7. Испитивање влажећег потенцијала формулисаних емулзија у *in vivo* студији** на здравим добровољцима, мерењем биофизичких параметара коже испитаника пре и након апликације емулзија у одређеним временским интервалима (након једнократне примене током 180 минута и вишекратне примене емулзија у току 28 дана). Мере ефикасности емулзија: EC, TEWL, рН коже, EI и меланин индекса (енг. *melanin index* (MI)); очекује се да се утврди добра ефикасност испитиваних емулзија са ЕПДЈ у смислу влажења коже.

8. **Испитивање утицаја емулзија са одабраним ЕПДЈ на посветљивање хиперпигментација коже** (вештачки изазваних деловањем хемијских агенаса на кожу), мерењем МI и ЕI коже испитаника, пре и након вишеструке апликације емулзија са ЕПДЈ у току 7 дана (*in vivo* студија); очекује се добар ефекат посветљивања.

Специфична испитивања у оквиру експерименталног дела ове докторске дисертације изведена су у складу са законским смерницама које поставља Уредба ЕУ 1223/2009 о козметичким производима, а тичу се обавезних испитивања безбедности примене на кожи (у смислу процене потенцијала за појаву локалних нежељених ефеката) и потврде декларисаних ефеката (Regulation (EC) No 1223/2009). *In vivo* испитивања су одобрена од стране Етичког Комитета Медицинског факултета у Нишу, Србија, број 12-12123-3.

Екстракција биоактивних супстанци из ПДЈ, карактеризација, испитивање садржаја биоактивних једињења, испитивање стабилности, иритационог потенцијала и безбедности примене као и АА израђених ЕПДЈ, њихово инкорпорирање у емулзије израђене применом конвенционалних и нових (биодеградабилних) мешаних емулгатора, испитивање стабилности, безбедности и ефикасности ових емулзија са ЕПДЈ, јесте начин да се научно потврди исправност традиционалне примене ове биљне сировине.

Наведена истраживања представљају научни допринос проучавању природних ресурса Србије (плод дивље јабуке), испитивању ЕПДЈ као потенцијалног природног извора биоактивних супстанци и испитивању могућности њиховог коришћења у производњи савремених, нешкодљивих (дермо)козметичких производа дефинисаног, стандардизованог квалитета, потврђене безбедности и дефинисане ефикасности.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛИ

3.1.1. Биљни материјал

Плод дивље јабуке (*Malus sylvestris fructus* (L.) Mill., Rosaceae) је коришћен као биљни материјал за истраживање. Плод дивље јабуке (ПДЈ) је сакупљан у месецу септембру 2012. године на обронцима планине Копаоник, Куршумлија, село Перуника, јужна Србија. Након што је одстрањено семе из плода, плод је исечен на танке делове (степен устињавања - 5 mm), а затим је сушен три недеље на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Пре екстракције, дрога је пулверизована два минута помоћу млина (ИКА – Werke, Staufen, Немачка) и степен уситњавања је смањен на 1 mm. Коришћени биљни материјал је заведен на Катедри за ботанику Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, Србија, под бројем 3709НФФ.

3.1.2. Хемикалије

Екстрагенци коришћени за израду ЕПДЈ били су: поларни екстрагенци: 70% етанол (v:v (енг.- *volume:volume*)), 96% етанол (v:v) - Хемос (Србија), 45% пропиленгликол (ПГ) (m:m (eng. *mass:mass*)) и 80% ПГ - Центрохем доо (Србија), пречишћена вода - Медицински факултет у Нишу (Србија); и неполарни екстрагенци: хладно цеђено маслиново уље - Medsol (Италија) и сунцокретово уље - Сунце (Србија).

Реагенси коришћени у различитим методама испитивања били су: *Folin–Ciocalteus* реагенс (FCR), DPPH радикал (*1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl*) и линолна киселина - Sigma–Aldrich (САД). Ванилин реагенс и ТРТЗ реагенс (*2,4,6-tripyridyl-s-triazin*) су од Merck-chemicals (Немачка). Натријум карбонат (Na_2CO_3), алуминијум хлорид (AlCl_3), калијум ацетат (К-ацетат), хлороводонична киселина (HCl), ацетатни пуфер, гвожђе (III) хлорид (FeCl_3), фосфатни пуфер и амонијум тиоцијанат - Центрохем доо (Србија). Апсолутни метанол је од Analag Normapur, VWR International SAS (Француска). Калијум хидроген фосфат, фосфорна киселина су набављени од Sigma-Aldrich (САД).

Стандарди: гална киселина, рутин, катехин, БХТ (енг. *butylated hydroxytoluene*-ВНТ) и α -токоферол су набављени од Sigma–Aldrich (САД), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ од Merck-

chemicals (Немачка), док су стандарди јабучна, млечна, лимунска, ћилибарна, винска, пирогрожђана, *L*-аскорбинска, оксална, хининска и бадемова киселина, као и гална киселина, пирогалол, протокатехинска киселина, катехин, хлорогенска киселина, процијанидин Б2, кафена киселина, епикатехин, *p*-кумарна киселина, скополетин, синапинска киселина, елагинска киселина, хиперозид, изокверцетин, етил етар протокатехинске киселине, нарингин, кемферол-3-*O*-глукозид, флоридзин, кверцетин, флоретин, сиригинска киселина набављени од Sigma–Aldrich (САД) или од Extrasynthese (Француска). Њихова чистоћа је била HPLC квалитета, заснована на произвођачкој високо-квалитетној HPLC методи и била је виша од 99%.

За израду у/в емулзија са ЕПДЈ коришћене су сировине наведене у Табели 7.

Табела 7. Преглед супстанци коришћених за израду испитиваних емулзија са ЕПДЈ

Супстанца INCI назив	Функција у емулзији	Трговачки назив	Произвођач
<i>Cetareth-12, cetareth-20, cetaryl alcohol, cetyl palmitate, glyceryl stearate</i>	Примарни емулгатор	Emulgade SE	Cognis, Немачка
<i>Coco glucoside & Cetaryl alcohol</i>	Примарни емулгатор	Montanov™82	Seppic, Француска
<i>Myristyl alcohol and myristyl glucoside</i>	АПГ коемулгатор	Montanov™14	Seppic, Француска
<i>Cetaryl alcohol</i>	Липофилни коемулгатор	Lanette 0	Cognis, Немачка
<i>Isopropyl miristate</i>	Емолијенс	Isopropyl miristate	Unichemcom, Аустрија
<i>Caprylic-capric triglycerides</i>	Емолијенс	Myritol™318	Henkel, Немачка
<i>Glycerin</i>	Хумектанс	Glycerin	BASF, Немачка
<i>Sodium benzoate</i>	Конзерванс	Натријум бензоат	Здравље, Србија
<i>Water (Aqua)</i>	Водена фаза	Пречишћена вода	Медицински факултет Ниш, Србија

Ефекат различитих ЕПДЈ, као мултифункционалних биоактивних супстанци, погодних за примену у прехранбеној, фармацеутској као и у козметичкој индустрији (Stojiljković и сар., 2018; 2016а)), испитиван је на ћелијама фибробласта L929 ћелијске линије (ATCC, Rockwile, САД). L929 ћелије су адхерентне ћелије изоловане из

поткожног везивног ткива миша. За разблаживање ЕПДЈ коришћене су следеће супстанце: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 g/L glucose, Biological Industries), раствор антибиотик-антимикотик (Biological Industries), L-глутамин и 10% раствор феталног говеђег серума - FBS (Biological Industries).

3.2. ИЗРАДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ

3.2.1. Методе за екстракцију

Течни ЕПДЈ су припремљени коришћењем поларних и неполарних екстрагенаса у дрога:екстракт (Д:Е) односу 1:5 (*m:m*). Сви екстракти су чувани на тамном месту заштићеном од директне сунчеве светлости, на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и коришћени су као течни екстракти. Обележавање израђених ЕПДЈ је дато у Табели 8.

3.2.1.1. Екстракција поларним екстрагенсима

Течни ЕПДЈ са поларним екстрагенсима (70% етанол, 45% ПГ, 80% ПГ, пречишћена вода) су припремљени екстракционим методама: мацерација, перколација, Soxhlet екстракција и ултразвучна екстракција према Југословенској Фармакопеји (Ph Jug IV, 1984).

Осушен и пулверизован ПДЈ је мацериран са 5 делова поларног екстрагенса током 5 дана у добро затвореном ерленмајеру, заштићен од директног сунца, на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, са повременим мућкањем. Мацерат је одвојен од дроге цеђењем и накнадним пресовањем и остављен да стоји два дана на хладном месту заштићен од сунца. Током перколације, осушен и пулверизован ПДЈ је најпре наквашен екстрагенсом и остављен да бубри најмање два сата. Затим је пренесен у перколатор који је напуњен екстрагенсом (коначни однос 1:5 - *m:v*) и дрога је мацерирана 12 сати на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ са протоком од 1 ml/min до добијања прописане запремине перколата. Током Soxhlet екстракције осушен и пулверизован ПДЈ је стављен у хилзну, затим у Soxhlet апарат и натопљен са 2,5 дела капацитета Soxhlet апарата екстрагенсом и остављен да стоји током ноћи на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Затим је загреван на температури кључања екстрагенса и екстрахован у Soxhlet апарату четири циклуса до обезбојавања (трајање једног циклуса 1 сат; укупни екстракциони период 4 сата). Током ултразвучне екстракције осушен и пулверизован ПДЈ је натопљен екстрагенсом у ерленмајеру и остављен у ултразвучном купатилу под

радним условима: време – 30 минута, температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и снага од 160W. Након свих екстракционих метода извршено је филтрирање.

3.2.1.2. Екстракција неполарним екстрагенсима

Течни ЕПДЈ са неполарним екстрагенсима (хладно цеђено маслиново уље и сунцокретово уље) су припремљени мацерацијом и дигестијом са уљем. Осушен и пулверизован ПДЈ је мацериран са 5 делова уља у воденом купатилу током четири сата у добро затвореном ерленмајеру, заштићеном од директног сунца, на температури од $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, са повременим мућкањем. Током дигестије ПДЈ је претходно мацериран са три дела 96% етанола током 24 сата у добро затвореном ерленмајеру, заштићен од директног сунца, на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Затим је настављена мацерација са 5 делова уља. Уљани екстракт је одвојен од дроге цеђењем и накнадним пресовањем.

Табела 8. Обележавање израђених ЕПДЈ применом различитих екстрагенаса и различитих метода екстракције

Израђени ЕПДЈ екстрагенс – метода	Обележавање ЕПДЈ
Поларни екстрагенси	
70% Етанол – мацерација	70ЕтМ - ЕПДЈ
70% Етанол – перколација	70ЕтП - ЕПДЈ
70% Етанол - Soxhlet екстракција	70ЕтС - ЕПДЈ
70% Етанол - ултразвучна екстракција	70ЕтУ - ЕПДЈ
45% ПГ – мацерација	45ПГМ - ЕПДЈ
45% ПГ – перколација	45ПГП - ЕПДЈ
45% ПГ - Soxhlet екстракција	45ПГС - ЕПДЈ
45% ПГ - ултразвучна екстракција	45ПГУ - ЕПДЈ
80% ПГ – мацерација	80ПГМ - ЕПДЈ
80% ПГ – перколација	80ПГП - ЕПДЈ
80% ПГ - Soxhlet екстракција	80ПГС - ЕПДЈ
80% ПГ - ултразвучна екстрак.	80ПГУ - ЕПДЈ
вода – мацерација	ВМ - ЕПДЈ
вода – перколација	ВП – ЕПДЈ
вода - Soxhlet екстракција	ВС – ЕПДЈ
вода - ултразвучна екстракција	ВУ – ЕПДЈ
Неполарни екстрагенси	
Маслиново уље – мацерација	МуМ - ЕПДЈ
Маслиново уље – дигестија	МуД - ЕПДЈ
Сунцокретово уље – мацерација	СуМ - ЕПДЈ
Сунцокретово уље – дигестија	СуД - ЕПДЈ

3.2.2. Методе за *in vitro* физичко-хемијску карактеризацију испитиваних ЕПДЈ

In vitro карактеризација израђених ЕПДЈ обухватала је испитивање органолептичких карактеристика визуелним прегледом (одређивање боје, мириса, бистрине, присуства евентуалних механичких нечистоћа) након 7, 30, 60, 180 и 365 дана под нормалним условима чувања и физичко-хемијских параметара: рН вредности екстраката (потенциометријском методом, директним урањањем електроде рН-метра (HI 8417, Hanna Instruments, Woonsocket, RI) у узорке), индекса рефракције и релативне густине (Ph Jug IV, 1984), 7 дана након израде екстраката као и након 30 и 60 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ на тамном месту.

3.2.3. Методе за *in vitro* испитивање полифенолног садржаја ЕПДЈ

Испитивање ПФ садржаја у ЕПДЈ обухватило је одређивање укупног садржаја фенола, укупног садржаја флавоноида, укупног садржаја кондензованих танина и укупног садржаја антоцијана. Сва испитивања урађена су одмах након израде екстраката. Сва спектрофотометријска читавања су вршена на уређају Evolution 60 UV/VIS spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, САД).

3.2.3.1. Одређивање укупног садржаја фенола у ЕПДЈ

Укупан садржај фенола (енг. *Total Phenolic Content* - ТРС) у испитиваним ЕПДЈ је одређиван помоћу колориметријске методе према *Folin-Ciocalteu*, са мањим модификацијама (Singleton и Rossi, 1965). Реакциона смеша је направљена мешањем 0.1 ml испитиваног течног ЕПДЈ, 7.9 ml пречишћене воде, 0.5 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса и 1,5 ml 20% раствора Na_2CO_3 . Након 2 сата стајања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, апсорбанца је читавана на 765 nm. Гална киселина - ГК (енг. *gallic acid* - GA) је коришћена као стандард (0,01–0,1 mg/ml), а резултати су приказани као милиграм еквивалента галне киселине на 100 g суве дроге (mg ГКЕ/100 g с.д.) (једначина калибрационе криве: $y = 1,281x + 0,020$).

3.2.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида у ЕПДЈ

Одређивање укупног садржаја флавоноида (енг. *Total Flavonoids Content* - TFC) у ЕПДЈ је извршено коришћењем *Markham*-ове методе, са мањим модификацијама (Ordon-ez и сар., 2006). Испитивани течни ЕПДЈ (0,5ml) је помешан са 1,5 ml метанола,

100 μ l 10% AlCl_3 , 100 μ l 1M К-ацетата и 2,8 ml пречишћене воде. Након 30 минута инкубације на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$ мерена је апсорбанца на таласној дужини од 420 nm. Рутин је коришћен као стандард (0,05–0,35 mg/ml) а резултати су исказани као рутин еквивалент (енг. *rutin equivalents* - RE), тј. као mg RE/100 g с.д. (сува дрога) (једначина калибрационе криве: $y = 3,397x + 0,039$).

3.2.3.3. Одређивање укупног садржаја кондензованих танина у ЕПДЈ

Садржај кондензованих танина (енг. *Total Tannins* - TT) је одређен ванилин тестом (Price и сар., 1978), са мањим модификацијама. По 1.0 ml течног ЕПДЈ је пребачено у две епрувете, тако да сваки узорак има своју слепу пробу. По 0,5 ml ванилиног реагенса (1% ванилин у метанолу: 8% HCl у метанолу = 1:1 (V:V)) је додат у први сет епрувета, а раствор је припремљен непосредно пре одређивања. По 0,5 ml 0,4% HCl у метанолу је додат у други сет епрувета. Између додавања ових реагенаса не сме да прође више од 1 минут. Епрувете су инкубиране 20 мин у воденом купатилу ($30 \pm 2^\circ\text{C}$). Вредности апсорбанце узорака се такође мере у једноминутном интервалу на таласној дужини од 500 nm у односу на слепу пробу. Апсорбанца слепе пробе (течни екстракт без ванилин реагенса, а садржи 4% HCl у метанолу) се одузима од апсорбанце узорака који садржи ванилин реагенс. Катехин је коришћен као стандард (0,05–0,3 mg/ml), а резултати су приказани као катехин еквивалент (енг. *catechin equivalents* - CE), тј. као mg CE/100 g с.д. (сува дрога) (једначина калибрационе криве: $y = 0,055x + 0,004$).

3.2.3.4. Одређивање укупног садржаја антоцијана у ЕПДЈ

Процентуални садржај укупних антоцијана (енг. *Total Anthocyanins* - TA) у испитиваним ЕПДЈ је одређен према Европској Фармакопеји (Ph Eur 6.0, 2008). Процентуални садржај укупних антоцијана је исказан преко цијанидин-3-глукозид хлорида (енг. *cyandin-3-glucoside chloride*) и израчунат коришћењем следеће једначине:

$$\% \text{ TA} = (A \times 5000) / (718 \times m)$$

A - апсорбанца узорака на 528 nm,

m - маса испитиване дроге у грамима.

3.2.4. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у ЕПДЈ

“*Fingerprinting*” испитиваних екстраката ПДЈ је добијен на Agilent Technologies 1200 HPLC апарату, употребом Synergi™ 4 μ m Hydro-RP 80 Å колоне, применом изократног режима елуирања; употребљена мобилна фаза била је 20mM калијумски пуфер (pH = 2,9) при протоку од 0,7 mL/мин, са фотодиодном детекцијом (УВ на 210 nm), током 30 мин. HPLC анализа је спроведена према поступку који су описали Pereira и сар. (2010) са мањим модификацијама, као што је претходно описано. Узорци ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима за HPLC анализу нису захтевали претходну припрему, док је за уљане екстракте одрађена претходна припрема. 50 mL уљаног ЕПДЈ је реекстраховано три пута са по 50 mL метанола. Метанолни екстракти су спојени и извршено је упаривање до 10 mL на вакуум упаривачу на температури испод 50°C. Припремљени узорци за HPLC анализу су затим филтрирани кроз 0,45 μ m PTFE филтер пре убризгавања. Испитивање је рађено одмах након израде екстраката као и две године након чувања на температури од 22 \pm 2°C.

Стандарди који су коришћени у анализи садржаја ПФ једињења у израђеним ЕПДЈ одређених концентрација били су: гална киселина (конц. 1,14 mg/mL), пирогалол (0,50 mg/mL), протокатехинска киселина (0,34 mg/mL), катехин (0,45 mg/mL), хлорогенска киселина (0,96 mg/mL), процијанидин Б2 (0,40 mg/mL), кафена киселина (0,52 mg/mL), епикатехин (0,40 mg/mL), *p*-кумарна киселина (0,74 mg/mL), скополетин (0,38 mg/mL), синапинска киселина (0,38 mg/mL), елагинска киселина (0,52 mg/mL), хиперозид (0,25 mg/mL), изокверцетин (0,22 mg/mL), етил етар протокатехинске киселине (0,52 mg/mL), нарингин (0,56 mg/mL), кемферол-3-*O*-глукозид (0,28 mg/mL), флоридзин-дихидрат (0,46 mg/mL), кверцетин (0,36 mg/mL), флоретин (0,46 mg/mL), сиригинска киселина (0,46 mg/mL) који су припремљени у метанолу. Очитавања за пирогалол, хлорогенску киселину, процијанидин Б2, кафену киселину и епикатехин су вршена на 325 nm, за хиперозид, изокверцетин, кемферол-3-*O*-глукозид и кверцетин на 360nm док су за сва остала једињења очитавања вршена на 260nm.

Стандарди који су коришћени у анализи садржаја ВК били су: јабучна киселина (конц. 2,38 mg/mL), лимунска (0,15 mg/mL), винска (1,04 mg/mL), ћилибарна (1,10 mg/mL), пирогрођана (1,00 mg/mL), млечна (2,16 mg/mL), *L*-аскорбинска (1,06 mg/mL), оксална (1,02 mg/mL) и бадемова киселина (2,24 mg/mL) који су припремљени у апсолутном метанолу. Очитавања за све ВК су вршена на 260nm.

Запремина раствора стандарда која се убризгава, као и запремина испитиваних ЕПДЈ, је била 4 μL . Идентификација је била заснована на ретенционим временима и УВ спектрима, поређеним са одговарајућим стандардима. Уколико се ретенционо време и УВ спектар испитиваног једињења у ЕПДЈ подудара са стандардом резултати се потврђују помоћу такозваних пик тестова чистоће (енг. *peak purity test*). Пикови који нису испунили наведене услове нису квантификовани. Све методе спроведене су на Институту за проучавање медицинског биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду.

3.2.5. Методе за *in vitro* испитивање антиоксидативне активности ЕПДЈ

За испитивање *in vitro* антиоксидативне активности ЕПДЈ примењена су три теста: DPPH тест, FRAP тест и тест са линолном киселином. Испитивања су урађена одмах након израде екстракта, док је DPPH тест урађен и након 180 дана чувања ЕПДЈ на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (заштићено од светлости у тамним и добро затвореним стакленим боцама). Сва спектрофотометријска читавања су вршена на уређају Evolution 60 UV/VIS spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, САД).

3.2.5.1. Одређивање капацитета „хватања“ слободних радикала ЕПДЈ

За одређивање способности „хватања“ слободних радикала (енг. *Radical Scavenging Capacity (RSC)*) испитиваних ЕПДЈ коришћен је DPPH (енг. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) тест, са мањим модификацијама (Brand-Williams и сар., 1995). Испитивани течни ЕПДЈ (Д:Е=1:5) (100 μl) је помешан са 900 μl свеже припремљеног 0,04 mg/ml метанолног раствора DPPH радикала. Радна и слепа проба (проба без ЕПДЈ) су инкубиране 20 минута на тамном месту на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Апсорбанца је читана на 517 nm са метанолом као референтним раствором. Синтетички антиоксиданс бутил хидрокситолуен је коришћен као позитивна контрола у концентрацијама од 0,08, 0,2 и 1,0 mg/ml. Резултати су приказани као процентуална инхибиција редукације DPPH радикала, тј. као % RSC и израчунати коришћењем једначине:

$$\% \text{ RSC} = [(\text{Asp} - \text{Au}) / \text{Asp}] \times 100$$

% RSC - способност „хватања“ слободних радикала (изражена у %), тј. процентуална инхибиција,

Asp - апсорбанца слепе пробе (проба која садржи 100 μl метанола уместо узорка),

Au - апсорбанца испитиваног узорка.

3.2.5.2. Одређивање укупне антиоксидативне активности ЕПДЈ - FRAP тест

За одређивање укупне антиоксидативне активности ЕПДЈ коришћен је FRAP тест (енг. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), као директни метод за мерење укупне антиоксидативне снаге екстраката, са мањим модификацијама (Benzie и Strain, 1996). FRAP реагенс је припремљен мешањем 10 ml раствора 300 mmol/l ацетатног пуфера, рН 3,6, са 1 ml раствора 10 mmol/l TPTZ (енг. *2,4,6-tripyridyl-s-triazin*) у 40 mmol/l HCl и 1 ml раствора 20 mmol/l FeCl₃. 20 µl испитиваног течног ЕПДЈ (Д:Е=1:5) је помешано са 1,5 ml свеже припремљеног FRAP реагенса и инкубирано 10 минута на температури од 22±2°C. Апсорбанца је читана на 593 nm. Водени раствор FeSO₄×7H₂O (100–1000 µM) је коришћен за калибрацију а резултати су приказани као FRAP вредности (mM Fe²⁺) узорака (једначина калибрационе криве: $y = 0,377x + 0,006$).

3.2.5.3. Одређивање способности заустављања липидне пероксидације ЕПДЈ - тест са линолном киселином

За одређивање способности ЕПДЈ да инхибирају липидну пероксидацију коришћена је линолна киселина и тиоцијанатни метод, са мањим модификацијама (Gordon и Maisuthisakul, 2009). Раствор линолне киселине (0,5 ml) је помешан са 0,5 ml раствора 0,05 M фосфатног пуфера (рН=7), затим је додато 100 µl испитиваног течног ЕПДЈ (Д:Е=1:5) и 150 µl пречишћене воде и добијена смеша је инкубирана 24 сата на температури од 40±2°C. Раствор линолне киселине је припремљен тако што је најпре направљен 60% раствор линолне киселине у апсолутном етанолу, а затим је од тог раствора одмерено 4,56 ml у суд од 200 ml и суд је допуњен са 90% етанолом. Након инкубације, одмерено је 100 µl инкубиране микстуре и помешано са 9,7 ml раствора 75% метанола, 100 µl 30% раствора амонијум тиоцијаната и 100 µl 0,02 M FeCl₃ у 3,5% раствору HCl. Иста процедура је изведена и без инкубације. Апсорбанца је читана на 500 nm. Као контрола коришћен је раствор α-токоферола у етанолу у концентрацијама од 5,5, 11, 22, 44 и 66 µg/ml. Антиоксидативна активност, тј. степен инхибиције пероксидације линолне киселине је израчунат помоћу једначине:

$$\% \text{AOA} = [(\Delta A_k - \Delta A_u) / \Delta A_k] \times 100$$

% AOA - антиоксидативна активност (изражена у %),

ΔA_k - разлика у измереним апсорбанцама контролног узорка (микстура без узорка) без и са инкубацијом,

ΔA_u - разлика у измереним апсорбанцама испитиваних узорака без и са инкубацијом.

3.2.6. Методе за *in vitro* испитивање ефеката и безбедности примене ЕПДЈ на културама ћелија

ЕПДЈ представљају добар извор биоактивних једињења (ПФ једињења и воћне киселине), и због својих многобројних ефеката се могу користити као активне супстанце у производима различитих намена (прехранбеним, фармацеутским, дерматолошким и/или (дермо)козметичким) (Amzad Hossain и сар., 2009; Arct и Rytkowska, 2008; Green и сар., 2009; Jakobek и сар., 2013; Maria Joh и сар., 2014; Procházková и сар., 2011; Stojiljković и сар., 2018; 2016a); Šavikin и сар., 2014; Xiaoqian и сар., 2014; Yu и Van Scott, 2004). Ефекат мултиактивних ЕПДЈ израђених применом поларних екстрагенаса испитиван је на фибробластима L929 ћелијске линије. L929 ћелије су адхерентне ћелије изоловане из поткожног везивног ткива миша и често се користе као модел за испитивање ефеката различитих биоактивних супстанци на кожи (Savić и сар., 2015; Савић, 2015).

Сви ЕПДЈ су пре испитивања на ћелијама разблаживани у одговарајућем медијуму DMEM (енг. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 g/L glucose, Biological Industries*). Финалне испитиване концентрације екстраката којима су ћелије третиране, биле су (вол%): 5%, 2%, 0,5%, 0,2%, 0,05%.

In vitro део испитивања ЕПДЈ на ћелијским културама је спроведено у Одељењу за ћелијско и ткивно инжењерство, Научноистраживачког Центра за биомедицину Медицинског факултета Универзитета у Нишу.

3.2.6.1. Култивисање ћелија

Ћелије L929 су гајене у хранљивом медијуму за култивацију ћелија DMEM. Комплетан медијум је добијен додатком L-глутаминa (2 mM), 10% феталног говеђег серума (ФГС) и раствора антибиотик-антимикотик. Замена медијума рађена је на свака 2–3 дана, у асептичним условима, у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха. При замени медијума стављано је 5 ml свежег медијума по фласку у којем су ћелије гајене (површине 25 cm²; Greiner Bio-One, Немачка). Ћелијске културе су гајене у инкубатору у атмосфери засићеној влажношћу, у присуству 5% CO₂, на температури од 37°C.

3.2.6.2. Пасажа ћелија

Пресађивање (пасажа) ћелија је рађена при конфлуентности ћелија од око 80%. Пасажа је рађена тако што је ћелијама прво уклоњен медијум, затим им је додато 2-3

ml 0,25% трипсин-ЕДТА раствора (Biological Industries) и инкубиране су око 5 мин у инкубатору на 37°C. Након одлепљивања ћелија, процес трипсинизације је прекинут додатком 5 ml комплетног свежег медијума. Ћелије су затим ресуспендоване и ћелијска суспензија је у стерилној епрувети центрифугирана 10 минута на +4°C и 1200 rpm.

3.2.6.3. Одређивање густине ћелија

Потребна густина ћелија подешена је применом методе Trypan Blue Dye Exclusion Test која подразумева бојење ћелија трипан плавим (0,4% Trypan Blue Exclusion Dye, Gibco). Трипан плаво селективно боји мртве ћелије у плаво, јер је њихова мембрана пропустљивија. Живе ћелије остају необојене захваљујући очуваном интегритету мембране. Бројање живих ћелија је вршено на хемоцитометријској комори по *Malasez*-у на светлосном микроскопу. Однос боје и ћелијске суспензије је био 1:1. Густина ћелија је израчуната по формули:

$$\text{бр. ћелија у } 10 \text{ поља} \times 10 \times 2 = \text{бр. ћелија у } 1 \mu\text{l} = x \times 10^3 \text{ ћелија у ml}$$

$\times 10$, јер је укупан број поља у комори 100;

$\times 2$, јер је то разблажење ћелијске суспензије, зато што је однос боја : ћелијска суспензија = 1 : 1.

Ћелије су затим у одређеној густини сађене у нове флашкове (25 cm², Greiner Bio-One) са 5 ml свежег хранљивог медијума/флашк.

На исти начин подешена је густина ћелија када су ћелије сађене у стерилне плоче и третиране испитиваним узорцима.

3.2.6.4. Есеј вијабилности/цитотоксичности

За потребе испитивања ефеката различитих узорака ЕПДЈ на вијабилност ћелија, ћелије из конфлуентне културе су одлепљене од подлоге додатком 0,25% раствора трипсин-ЕДТА, испране у медијуму и центрифугиране 10 минута на +4°C и 1200 rpm. Након тога ћелије су избројане на хемоцитометарској коморици по *Malasez*-у у раствору трипан плавог и подешена им је густина у комплетном ДМЕМ-у по већ раније објашњеном протоколу. Ћелије су затим посађене у стерилне плоче са 96 бунарчића (96 well Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One, Немачка).

У тесту вијабилности/цитотоксичности у сваки бунарчић стерилне плоче са 96 бунарчића стављано је по 2×10^4 ћелија у 100 μ l комплетног медијума. Након 24 сата култивације ћелија у инкубатору, у атмосфери засићеној влажношћу, са 5% CO₂, на 37°C, медијуми из бунарчића са ћелијама су извађени и у сваки бунарчић је додато по 100 μ l одговарајуће концентрације испитиваних екстраката. Контролну културу чиниле су ћелије које су инкубирале у комплетном DMEM-у без додатка испитиваних ЕПДЈ. Свака концентрација испитиваних ЕПДЈ, као и комплетног медијума у контролној култури, испитивана је у тетрапликату. Ћелије су инкубирале са испитиваним ЕПДЈ и комплетним медијумом као контролом, наредних 24 сата у атмосфери засићеној влажношћу и 5% CO₂, на 37°C у инкубатору, а након тога урађен је МТТ тест.

3.2.6.5. МТТ тест

МТТ тест је стандардни тест *in vitro* процене вијабилности ћелија, базиран на редукцији тетразолијумске соли МТТ (енг. *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*). Вијабилне и метаболички активне ћелије редукују жуту тетразолијумску со МТТ помоћу митохондријалних дехидрогеназа до љубичастих кристала формазана који су нерастворни у води.

Након инкубације са различитим концентрацијама испитиваних ЕПДЈ и контролним медијумом, медијум у којем су ћелије инкубирале је уклоњен из свих бунарчића и ћелије су испране са 100 μ l фосфатног пуфера (PBS). У сваки бунарчић је затим додато по 100 μ l раствора МТТ-а, концентрације 1 mg/ml (Carl Roth GmbH, Немачка). Након 2 сата инкубације ћелија са МТТ-ом на 37°C, раствор МТТ-а је уклоњен из бунарчића а настали љубичасти кристали формазана растворени су додатком 100 μ l 2-пропанола (Fisher Chemicals). Растварањем кристала формазана су добијени раствори љубичасте боје чији је интензитет мерен спектрофотометријски на таласној дужини од 540 nm на вишеканалном спектрофотометру (Multiscan Ascent, Thermo Labsystems).

Добијени резултати тумачени су након урађеног МТТ теста. Интензитет љубичасте боје настале растварањем љубичастих кристала формазана у директној је корелацији са бројем ћелија и њиховом метаболичком активношћу, јер пораст броја ћелија и пораст њихове метаболичке активности резултује порастом количине створеног формазана и порастом апсорбанце односно интензитета љубичасте боје.

Резултати МТТ теста представљени су у односу на контролну културу ћелија (ћелије инкубирале у комплетном медијуму без екстраката ПДЈ). Рачунат је проценат у

односу на контролну културу ћелија за коју је узета вредност 100% вијабилности ћелија.

Процент вијабилности ћелија је рачунат по једначини:

$$\% \text{ вијабилности} = (\text{средња вредност апсорбанце испитиване концентрације} / \text{средња вредност апсорбанце негативне контроле}) \times 100$$

Квантитативне промене вијабилности ћелија описују се као ефекти:

- нецитотоксични - ако је више од 90% вијабилних ћелија у односу на негативну контролу;
- благо цитотоксични - ако је 60-90% вијабилних ћелија у односу на негативну контролу;
- умерено цитотоксични - ако је 30-60% вијабилних ћелија у односу на негативну контролу и
- озбиљно цитотоксични - ако је мање од 30% вијабилних ћелија у односу на негативну контролу.

Вијабилност ћелија у контроли је представљена као 100%.

3.2.6.6. Светлосна микроскопија

Ћелије су током експеримента посматране на инвертном светлосном микроскопу (Carl Zeiss, Немачка) на фазном контрасту. Праћен је раст ћелија, њихова густина и промене у њиховој морфологији. Ћелије су фотографисане у неколико фаза експеримената: за време култивације, пре додавања испитиваних узорака, након завршеног периода инкубације (24 сата у есеју вијабилности) на увећањима објектива 10x и 20x.

3.2.7. Статистичка анализа

Сви резултати за испитиване параметре (pH вредност, индекс рефракције и густина ЕПДЈ, укупан садржај фенола, флавоноида, танина и антоцијана, антиоксидативна активност ЕПДЈ, садржај полифенолних једињења и воћних киселина) приказани су као средња вредност три независна мерења \pm стандардна девијација (енг. *standard deviation* - SD). Добијене вредности мерених параметара у корелацији са примењеним екстрагенсом и екстракционом методом су анализирани

једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен *Tukey's* тест, са статистичком значајношћу од $P < 0,05$ и $P < 0,01$, док је промена ових параметара у одређеним временским тачкама проверена Студент т-тестом. Линеарна регресиона анализа и корелациони коефицијент између две варијабле (укупан садржај ПФ једињења у ЕПДЈ и антиоксидативна активност ЕПДЈ) су одређени коришћењем програма MS-Windows software (Excel, 2007), са статистичком значајношћу од $P < 0,05$. Квантификација испитиваних ЕПДЈ у HPLC анализи је била изведена помоћу екстерне стандардне методе. Резултати МТТ теста добијени су мерењем вредности апсорбанци раствореног формазана. Рачунат је проценат у односу на контролну културу ћелија за коју је узета вредност 100% ћелијске вијабилности. Рачуната је SD а статистичка значајност у деловању различитих ЕПДЈ и различитих концентрација анализирана је применом једнофакторског ANOVA теста из минимум два поновљена независна експеримента. Статистичка анализа спроведена је према упутствима и ранијим научним публикацијама (Altisent и сар., 2014; Arsić и сар., 2011; Jakobek и сар., 2013; Mahrhauser и сар., 2015; Milošević и Bogdanović, 2012; Pallant, 2011; Stojiljković и сар., 2018; 2016a); Tasić-Kostov и сар., 2012; Živković, 2015).

3.3. ФОРМУЛАЦИЈА, ИЗРАДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕМУЛЗИЈА СА ЕПДЈ

У циљу испитивања могућности примене ЕПДЈ као КАС у емулзијама и њихове потенцијалне примене као стабилних, нешкодљивих (безбедних) и ефикасних (дермо)козметичких производа за негу и третман различитих стања и промена на кожи, испитивани ЕПДЈ са најбољим карактеристикама, показаним у претходним испитивањима ове докторске дисертације, су инкорпорирани у емулзионе носаче за које је већ ранијим испитивањима других аутора показано да су стабилни, нешкодљиви и безбедни за примену (Arsić и сар., 2014; 2011; Savić и сар., 2015; Савић, 2015; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). У том контексту, израђене су емулзије у/в типа са једним од два различита мешана емулгатора: конвенционални - *EmulgadeSE* (ЕЕ емулзије) и биодеградабилни – *MontanovTM* (МЕ емулзије) и једним од четири одабрана течна ЕПДЈ у концентрацији од 6%; израђени су и плацебо узорци (енг. *placebo*) (Табела 9).

Табела 9. Квалитативни и квантитативни састав емулзија са ЕПДЈ и плацебо узорака

Компоненте	МЕ емулзије					ЕЕ емулзије				
	МПл1	МЕ70ЕТУ	МЕ45ПГУ	МЕВУ	МЕСуд	ЕПл2	ЕЕ70ЕТУ	ЕЕ45ПГУ	ЕЕВУ	ЕЕСуд
	% m/m									
Масна фаза										
<i>Cetareth-12, cetareth-20, cetaryl alcohol, cetyl palmitate, glyceryl stearate</i> EmulgadeSE						5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
<i>Coco glucoside&cetaryl alcohol</i> Montanov™82	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0					
<i>Myristyl alcohol&Myristyl glucoside</i> Montanov™14	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5					
Isopropyl miristate	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
<i>Caprylic-capric triglycerides</i> Myritol™318	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<i>Cetaryl alcohol</i> Lanette 0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Активна супстанца										
70ЕТУ-ЕПДЈ	-	6,0	-	-	-	-	6,0	-	-	-
45ПГУ-ЕПДЈ	-	-	6,0	-	-	-	-	6,0	-	-
ВУ-ЕПДЈ	-	-	-	6,0	-	-	-	-	6,0	-
Суд-ЕПДЈ	-	-	-	-	6,0	-	-	-	-	6,0
Водена фаза										
Глицерин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Конзерванс	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пречишћена вода	73,0	67,0	67,0	67,0	67,0	76,0	70,0	70,0	70,0	70,0

Сви узорци су припремљени тако што је масна фаза, заједно са емулгатором (Табела 9) загрејана на грејној плочи магнетне мешалице (магнетна мешалица ИКАМАГ (ИКА, Немачка)) на 70°C и затим додата у водену фазу загрејану на 72°C (Табела 9), уз мешање (пропелерска лабораторијска ротациона мешалица, RW16 basic (ИКА®Werke, Немачка)) на константној температури (800 обртаја(о)/мин, у току 5 минута а потом 3 мин на 500 о/мин. По завршетку фазе емулговања започето је

хлађење уз мешање на 300 о/мин. На 40°C додат је екстракт и настављено хлађење до постизања температуре од 22±2°C. Плацебо узорци су израђени на потпуно исти начин као емулзије са одабраним екстрактима, с тим што је повећана количина пречишћене воде на рачун екстраката (Arsić и сар., 2014; 2011; Savić и сар., 2015; Stojiljković и сар., 2018; 2016б); 2013; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013).

3.3.1. Методе за *in vitro* физичко-хемијску карактеризацију испитиваних емулзија

3.3.1.1. Органолептичка анализа испитиваних емулзија са одабраним ЕПДЈ

Органолептичке карактеристике (боја, мирис, сјај, конзистенција и хомогеност) испитиваних емулзија је процењена одмах након израде (након 7 дана), као и после 60, 180 и 365 дана под нормалним условима чувања (на температури од 22±2°C, заштићено од директне сунчеве светлости). Ова испитивања су спроведена и након центрифугирања емулзија и теста убрзаног старења емулзија. Резултати органолептичке анализе су приказани описно у табелама и сликама.

3.3.1.2. Физичко-хемијска испитивања емулзија са одабраним ЕПДЈ

Израђене емулзије са ЕПДЈ су подвргнуте физичко-хемијским испитивањима (7 дана након израде, као и после 30, 60, 120 и 180 дана чувања узорака на температури од 22±2°C (заштићено од директне сунчеве светлости)): мерење и праћење рН вредности и електричне проводљивости.

3.3.1.2.1. Одређивање рН вредности испитиваних емулзија са ЕПДЈ

Мерење рН вредности испитиваних емулзија изведено је потенциометријском методом директним урањањем електроде рН метра (рН 211 Microprocessor рН Meter, Hanna Instruments, САД) у припремљене узорке, на температури од 22±2°C. Ова испитивања су спроведена и након тестова испитивања стабилности емулзија (центрифугирања и теста убрзаног старења) (Ph Jug. IV, 1984).

3.3.1.2.2. Мерење електричне проводљивости испитиваних емулзија са ЕПДЈ

Мерење електричне проводљивости испитиваних емулзија изведено је кондуктометријски, тј. директним урањањем електроде кондуктометра (CDM 230,

Radiometer, Данска) у узорке и аутоматским читавањем специфичне проводљивости на дигиталном показивачу на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Методе за испитивање стабилности и структуре испитиваних емулзија са ЕПДЈ

У оквиру ових испитивања спроведена је поларизациона и светлосна микроскопија као метода за испитивање текстуре унутрашњих фаза емулзија (стабилизација ламеларно-течно кристалном фазом) и као део испитивања потенцијалне стабилности емулзија. Коришћени тестови за процену стабилности израђених емулзија били су: тест центрифугирања, тест убрзаног старења, као и тест дуготрајне стабилности под нормалним условима чувања (на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, заштићено од директне сунчеве светлости).

3.3.2.1. Поларизациона и светлосна микроскопија

Узорци за микроскопску анализу припремљени су тако што је мали размаз емулзија стављен на предметно стакло и покривен покровним стаклом. Поларизациона и светлосна микроскопија спроведена је под увећањем 400 пута у светлосном пољу, као и између укрштених поларизатора и анализатора уз примену λ -плочице (микроскоп LEICA DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Немачка). Микрографије (по 3 за сваки узорак из три различита дела емулзије – горњег, средњег и доњег) су снимљене помоћу интегрисане дигиталне камере (LEICA DFC425, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Немачка) у JPG формату и затим анализирани променом величине честица унутрашње фазе и посматрањем на поларизационим микрографијама структура типичних за одређене врсте течностно-кристалних фаза (Лукић, 2014, Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013). Микроскопска анализа је спроведена 7 дана након израде емулзија са одабраним ЕПДЈ (период потребан да се уравнотеже и стабилизују емулзије) и након 180 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, као и одмах након теста центрифугирања и теста убрзаног старења. Резултати поларизационе и светлосне микроскопије приказани су табеларно и графички.

Све микрографије су анализирани помоћу софтверског програма ImageJ. Програм омогућава мерење величине капи сферног облика из сваког мерног опсега. Мерење величине капи је спроведено слободним избором по 15 капи, у сваком од четири квадрата (микрографија је подељена на четири једнака дела), укупно 60 капи.

3.3.2.2. Испитивање физичке стабилности методом центрифугирања

Тест центрифугирања спроведен је 7 дана након израде емулзија (30 минута на 3000 обртаја/мин, на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$) помоћу лабораторијске центрифуге LC 320 (Tehtnica, Словенија). Након тога је посматрана евентуална фазна сепарација, спроведено је органолептичко испитивање, мерена је рН вредност и извршена је поларизациона и светлосна микроскопија.

3.3.2.3. Испитивање стабилности - тест убрзаног старења

Тест убрзаног старења, такозвани температурни стресни тест, спроведен је на следећи начин: узорци емулзија су 7 дана након израде подвргавани *ригорозном* цикличном температурном тесту стреса 12 сати на -5°C и 12 сати на $+40^{\circ}\text{C}$ током 72 сата (Савић, 2004). Физичка стабилност процењивана је посматрањем евентуалне фазне сепарације, органолептичким испитивањем (визуелно посматрање), поларизационом и светлосном микроскопијом и мерењем рН вредности.

3.3.2.4. Испитивање стабилности емулзија – тест дуготрајне стабилности

Дуготрајна стабилност израђених емулзија са ЕПДЈ испитана је чувањем узорака емулзија на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ у периоду од 365 дана. Одмах након израде, као и након 30, 60, 120 и 180 дана чувања, посматрана је евентуална фазна сепарација, спроведено је органолептичко испитивање, примењена је техника поларизационе и светлосне микроскопије и мерена је рН вредност и електрична проводљивост испитиваних емулзија. Органолептичко испитивање и праћење фазне сепарације спроведено је и након 365 дана под нормалним условима чувања (Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013).

3.3.3. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у емулзијама са ЕПДЈ

Идентификација и одређивање садржаја ПФ једињења и ВК у емулзијама са одабраним ЕПДЈ, стабилизованих конвенционалним (ЕЕ емулзије) и биодеградабилним емулгаторима (МЕ емулзије) рађене су према поступку описаном у делу 3.2.4. ове докторске дисертације. Испитивање је рађено одмах након израде емулзија као и годину дана након чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Све методе

спроведене су на Институту за проучавање медицинског биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду.

Узорци емулзија са ЕПДЈ захтевали су претходну припрему за HPLC анализу, према поступку Khalid-а и сар. (2014), са мањим модификацијама. 1 mg емулзије је екстрахован са 10 mL метанола ултразвучном екстракцијом током 20 мин. Метанолни екстракти су затим центрифугирани (LC 320, Tehtnica, Словенија) на 5000 обртаја по мин 60 мин, а затим на 2000 обртаја по мин, још 15 мин. 1 mL аликвота супернатанта упарен је до сува на ротационом упаривачу, а затим је растворен са 1,5 mL 70% етанола.

3.3.4. Методе за *in vitro* испитивање антиоксидативне активности емулзија са ЕПДЈ

Коришћена је *in vitro* метода одређивања способности неутрализације, „хватања“ слободних радикала, 7. и 180. дана након израде емулзија са ЕПДЈ и чувања на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

У циљу бољег растварања биоактивних супстанци и добијања прецизнијих резултата, емулзије су најпре разблаживане екстракционим медијумом (Полисорбат 20 : $\text{H}_2\text{O} = 1:5$ (*m:m*)). Однос масе емулзија и екстракционог медијума био је 1:3 (*m:m*). Након разблаживања узорци су мешани ротационом мешалицом RW16 basic (ИКА®Werke, Немачка) 15 минута на 400 обртаја/мин на температури од 50°C . На тај начин добијен је „stock“ (енг. *stock*) раствор који је коришћен и од њега одмеравано у даљем поступку одређивања АА емулзија. Разблаживање је рађено непосредно пре одређивања, према поступку Тасић-Костов и сар. (2012) и Тасић-Костов (2013).

3.3.4.1. Одређивање капацитета „хватања“ слободних радикала емулзија са ЕПДЈ

Одређивање способности неутрализације тј. „хватања“ слободних радикала емулзија са одабраним ЕПДЈ је рађено коришћењем „stock“ раствора (добијеном према претходно описаном поступку) према поступку описаном у делу 3.2.5.1. Као контрола служио је раствор α -токоферола у етанолу у концентрацијама 5.5, 11, 22, 44 и 66 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.5. Методе за *in vivo* карактеризацију емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе

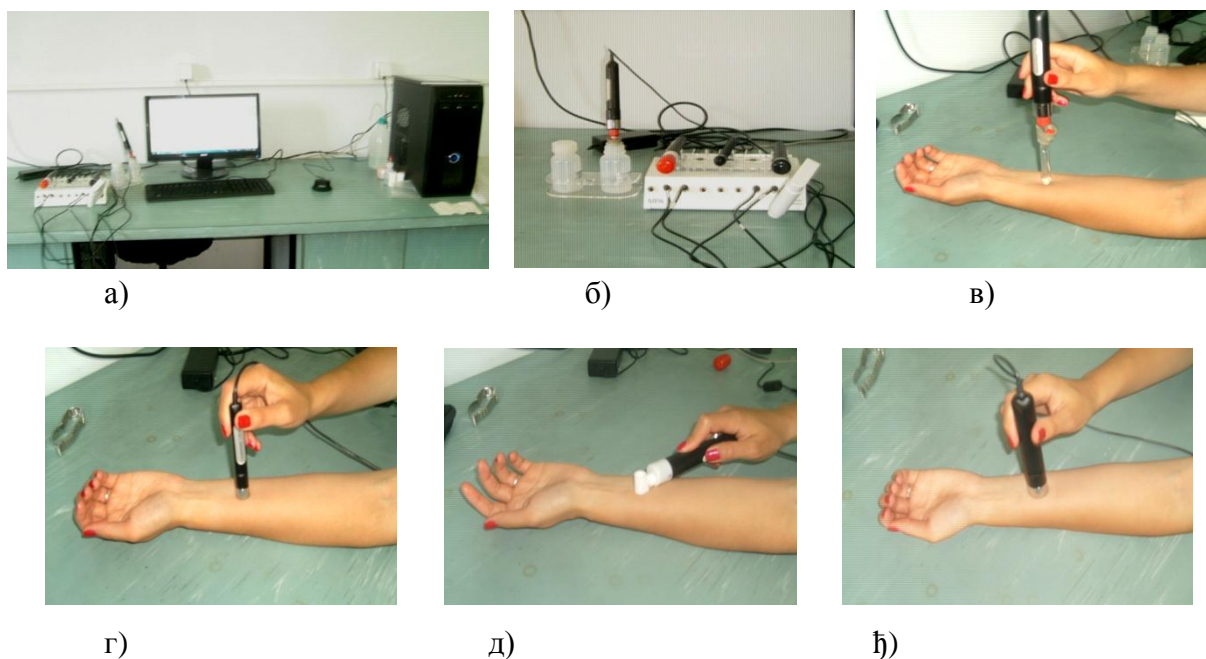
Ефекти примене модел формулација са различитим ЕПДЈ се могу квантификовати мерењем адекватних биофизичких параметара на кожи пре и након апликације испитиваних узорака на кожу. Тиме се (на основу промене вредности релевантних мерених параметара) може добити увид у потенцијал узорака да доведу до одређених ефеката на кожи. Данас постоји велики број различитих типова студија, водича и научних публикација, које се могу спроводити у циљу испитивања ефеката производа намењених за примену на кожи (Berardesca, 1999; 1997; Colipa report on the 8 World Congress on Alternatives, 2011; Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Fang и сар., 2003; Tasić-Kostov и сар., 2014) (Слика 7 а) и б)). Свака од *in vivo* студија спроведена у оквиру ове докторске дисертације изведена је након добијања писменог или информативног пристанка добровољаца и у складу са Хелсиншком декларацијом. Сва мерења обављена су у складу са смерницама за њихово спровођење (Barel и сар., 1999; Berardesca, 1999; 1997; Clarys и сар., 2011; 2000; Elden, 1990; Fischer и сар., 2001; Wilhelm и Maibach, 1993):

- испитивања су спроведена у климатизованим просторијама које гарантују константну температуру (20-23°C) и влажност ваздуха (пожељно 40-60% RH);
- пре приступања мерењу, добровољци су се адаптирали на услове простора у коме се изводило мерење (у трајању од око 30 мин), при чему би требало да су били физички и психички релаксирани (овај припремни период не компензује климатске услове, већ само физичку активност испитаника);
- најмање 3 сата пре мерења добровољци се нису купали, туширали или вежбали;
- испитивање је извођено апликацијом испитиваних модел формулација на кожу воларне стране подлактице;
- мерни регион је углавном био без длака, или са врло мало код мушких испитаника;
- вршена су три мерења на блиском региону због великих варијација у параметрима коже који се прате;
- мерна сонда је била благо притиснута на кожу и вертикално постављена на кожу како би се омогућио близак контакт сонде са кожом; сонду је пажљиво чишћена након сваког мерења;
- само једна особа је вршила мерења.

У *in vivo* студијама мерени су и праћени следећи биофизички параметри коже и коришћени следећи уређаји за одређивање ових параметара:

- сондом Corneometer[®] CM 825 апарата Multi Probe Adapter System MPA[®]9, мерена је електрична капацитивност (ЕС) односно одређена је влажност коже (Слика 7 г));
- апарат Tewameter[®] TM 210 коришћен је за мерења TEWL-а; извршена су по три мерења за свако третирано место (као и за контроле) након периода стабилизације уређаја у трајању од око 40s (Слика 7 д));
- рН коже мерен је сондом pHmeter[®]900 (апарат MPA[®]9) (Слика 7 в));
- сонда Mexameter[®] MX 16 (апарат MPA[®]9) симултано мери меланин индекс (MI) и еритема индекс (EI) (Слика 7 њ)).

Резултати мерења сваког од параметара су представљени као средња вредност \pm SD. Сви наведени уређаји, односно сонде су произвођача Courage & Khazaka, Немачка (Слика 7).



Слика 7. Мерење биофизичких параметара и мерне сонде апарата: а) Комбиновани инструмент за мерење параметара биофизичких метода у испитивању коже (Multi Probe Adapter System MPA[®]9, Courage&Khazaka); б) мерне сонде апарата; в) мерење рН коже - pHmeter[®]900; г) мерење ЕС - Corneometer[®]CM 825; д) мерење TEWL - Tewameter[®]TM 210 и њ) мерење EI и MI - Mexameter[®]MX 16

3.3.5.1. Методе за *in vivo* испитивање иритационог потенцијала и безбедности примене емулзија са ЕПДЈ – биофизичке методе

У студији је учествовало 28 здравих добровољаца, оба пола, без знакова дерматолошких обољења или јако суве коже (насумично подељени у две групе). Испитивање је спроведено у месецу мају, с обзиром да су временске прилике дозвољавале адекватно испитивање у овом месецу. Испитиване су емулзије са одабраним ЕПДЈ (МЕ емулзије и ЕЕ емулзије) као и плацебо узорци (МПл1 и ЕПл2) и мерени су следећи биофизички параметри: TEWL, pH коже, EI и MI и EC као одраз стања хидратисаности рожнатог слоја. Наведена испитивања под оклузијом су спроведена уз примену регулатива, водича и ранијих научних публикација (Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Arsić и сар., 2011; Mahrhauser и сар., 2015; Regulation (EC) No 1223/2009; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013).

- I група (14 добровољаца, оба пола, просечне старости $30,07 \pm 10,39$ година): узорци стабилизовани биодеградабилним емулгаторима (МПл1, ME70EtУ, ME45ПГУ, МЕВУ) наношени су у количини $0,016 \text{ g/cm}^2$ на по једно место на унутрашњим странама подлактица (са два празна места квадратног облика површине 9 cm^2), утрљани на означену површину, покривени оклузивним филмом Parafilm[®] (American National Can. Co., Chicago, Illinois, САД) а затим памучном самолепљивом траком Sensifix[®] (Галеника, Србија). Место на десној подлактици је остављано као нетретирана контрола под оклузијом (МНК1).

- II група (14 добровољаца, оба пола, просечне старости $30,46 \pm 10,87$ година): узорци стабилизовани конвенционалним емулгатором (ЕПл2, ЕЕ70EtУ, ЕЕ45ПГУ, ЕЕВУ) наношени су у количини $0,016 \text{ g/cm}^2$ на по једно место на унутрашњим странама подлактица, утрљани на означену површину, а затим покривени на начин описан код третмана I групе добровољаца Место на десној подлактици је остављано као нетретирана контрола под оклузијом (ЕНК2).

Мерења наведених параметара на нетретираним местима, на местима третираним плацебо узорцима и узорцима са ЕПДЈ извршена су базално, као и 60 минута након одстрањивања оклузије која је трајала 24 сата.

3.3.5.2. Методе за *in vivo* испитивање ефикасности примене емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе

In vivo испитивање ефикасности узорака одабраних серија вршено је у краткотрајној и дуготрајној душло слепој студији мерењем биофизичких параметара – ЕС, TEWL, EI, MI и pH коже испитаника. Наведена испитивања ефикасности (краткотрајна и дуготрајна студија) испитиваних емулзија спроведена су уз примену водича и ранијих научних публикација (Arsić и сар., 2011; Berardesca, 1999; 1997; Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Jaksić и сар., 2012; Лукић, 2014; Regulation (EC) No 1223/2009; Mahrhauser и сар., 2015; Savić и сар., 2011; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013; Žugić и сар., 2015).

3.3.5.2.1. In vivo испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – краткотрајна студија

У студији је учествовало 10 здравих добровољаца, женског пола, са умерено сувом кожом (услов за учествовање у експерименту субјективна процена), без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења. Испитивање је спроведено у месецу априлу. Испитаници су насумично подељени у две групе и наглашено им је да једну седмицу пре почетка студије не користе било каква средства за негу коже (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Mahrhauser и сар., 2015; Савић, 2004; Savić и сар., 2015).

- I група (5 испитаника, женског пола, просечне старости $34,40 \pm 4,98$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилизаних биодеградабилним емулгаторима (ME70EtУ, ME45ПГУ, МЕВУ, МЕСуД, као и плацебо узорком МПл1). На десној подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола (МНК1) (Слика 7.).

- II група (5 испитаника, женског пола, просечне старости $33,60 \pm 6,07$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилизаних конвенционалним емулгатором (EE70EtУ, EE45ПГУ, ЕЕВУ, ЕЕСуД, као и плацебо узорком ЕПл2), на исти начин и уз нетретирану контролу (ЕНК2) као у I групи (Слика 7).

Након извршеног иницијалног мерења (пре почетка студије, базалне вредности) добровољцима су нанети узорци у пределу маркираних површина облика квадрата површине 9 cm^2 употребом картонског лењира са празним површинама. Мерења су вршена 60 и 180 минута након наношења узорака.

3.3.5.2.2, *In vivo* испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – дуготрајна студија

У студији је учествовало 26 здравих добровољаца, оба пола, са умерено сувом кожом (услов за учествовање у експерименту субјективна процена), без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења, Испитивање је спроведено у периоду април-мај, с обзиром да су временске прилике дозвољавале спровођење адекватног испитивања у овом периоду, Испитаници су насумично подељени у две групе и наглашено им је да у току трајања, као ни једну седмицу пре почетка студије, не користе било каква средства за негу коже у испитиваном пределу (Mahrhauser и сар., 2015; Savić и сар., 2011; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013),

- I група (12 испитаника, оба пола, просечне старости $28,92 \pm 10,83$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилованих биодеградабилним емулгаторима, ME70EtУ, ME45ПГУ, МЕВУ, као и плацебо узорком МПл1, и то у пределу маркираних површина облика квадрата површине 9 cm^2 . На десној подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола (МНК1) (Слика 7).

- II група (14 испитаника, оба пола, просечне старости $31,86 \pm 11,67$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилованих конвенционалним емулгатором (EE70EtУ, EE45ПГУ, ЕЕВУ, као и плацебо узорком ЕПл2), на исти начин и уз нетретирану контролу (ЕНК2) као у I групи (Слика 7).

Након извршеног иницијалног мерења (пре почетка студије, базалне вредности) добровољцима су дате инструкције да узорке (означене стикерима различитих боја) апликују код куће два пута дневно, ујутру и увече након туширања у пределима маркираних површина (узорак одређене боје на одређено место на кожи) у току 4 недеље. Мерења су вршена након 14 и 28 дана апликације узорака, ујутру, пре јутарње примене узорака.

3.3.5.3. Методе за *in vivo* испитивање способности емулзија са ЕПДЈ за посветљивање вештачки изазваних хиперпигментација на кожи - биофизичке методе

У студији је учествовало 10 здравих добровољаца, оба пола, са умерено сувом кожом (услов за учествовање у експерименту субјективна процена), без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења. Испитивање је спроведено у месецу априлу. Испитаници су насумично подељени у две групе и наглашено им је да у току трајања, као ни једну седмицу пре почетка студије, не користе било каква средства за

негу коже у испитиваном пределу. Праћени су следећи биофизички параметри: MI и EI коже (Слика 7). Наведена испитивања способности испитиваних емулзија за посветљивање хиперпигментација на кожи спроведена су уз примену водича и ранијих научних публикација (Arsić и сар., 2011; Berardesca, 1999; 1997; Clarys и сар., 2000; Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Jaksić и сар., 2012; Лукић, 2014; Regulation (EC) No 1223/2009; Mahrhauser и сар., 2015; Savić и сар., 2011; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Shin и Park, 2014; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013; Žugić и сар., 2015).

- I група (5 испитаника, оба пола, просечне старости $39,25 \pm 14,97$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилизаним биодеградабилним емулгаторима (ME70EtУ, ME45ПГУ, МЕВУ, МЕСуД, као и плацебо узорком МПл1), и то у пределу маркираних површина облика квадрата површине 9 cm^2 . На десној подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола (МНК1).

- II група (5 испитаника, оба пола, просечне старости $41,40 \pm 12,22$ година): воларне стране подлактица третиране су узорцима стабилизаним конвенционалним емулгатором (EE70EtУ, EE45ПГУ, ЕЕВУ, ЕЕСуД, као и плацебо узорком ЕПл2), на исти начин и уз нетретирану контролу (ЕНК2) као у I групи.

Након извршеног иницијалног мерења (пре почетка студије, базалне вредности) на тачно одређена места унутрашње стране подлактица добровољцима је нанесен комерцијални емулзиони лосион који је садржао 3% дихидроксиацетона (енг. *dihydroxyacetone* - ДНА) у количини од 1 ml. Третирана места су остала откривена све док кожа потпуно није упила ДНА. 24 сата након тога је поново извршено мерење. После овог мерења добровољци су различито обележене узорке, у количини зрна грашка, наносили свакодневно (ујутру и увече) 7 дана на тачно одређена места воларне стране подлактица, при чему су претходно добили информације у вези места на кожи на које ће апликовати сваки од узорака, количине и начина апликације. Следећа мерења су обављена 3 и 7 дана након апликације узорака, ујутру, пре јутарње примене.

3.3.6. Статистичка анализа

Сви добијени параметри (рН вредност, електрична проводљивост и антиоксидативна активност формулисаних емулзија) приказани су као средња вредност три независна мерења \pm SD. Резултати за величину капи су приказани као средња вредност измерених 60 капи \pm SD. Добијене вредности за испитиване параметре у

корелацији са врстом ЕПДЈ и врстом емулгатора анализирани су једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, са статистичком значајношћу од $P < 0,05$ и $P < 0,01$. Промена мерених параметара у одређеним временским тачкама проверена је Студент т-тестом. HPLC квантификација испитиваних емулзија са ЕПДЈ је изведена помоћу екстерне стандардне методе и резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm SD. Сви добијени резултати током *in vivo* испитивања су приказани као апсолутна промена *in vivo* мерених параметара (Δ ЕС, Δ TEWL, Δ рН, Δ ЕИ и Δ МІ) у одређеним временским интервалима у односу на базалне вредности \pm SD. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле (нетретирана места - МНК1 и ЕНК2, као и плацебо узорци - МПл1 и ЕПл2) унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, са статистичком значајношћу од $P < 0,05$. Поређење вредности параметара (ЕС, TEWL, рН, ЕИ и МІ) измерених за исти узорак у различитим временским тачкама, тј. пре и након третмана, односно базално мерење *vs* мерење након оклузије (студија испитивања иритационог потенцијала и *in vivo* безбедности примене); *vs* након апликације (након 180 минута код краткотрајне студије ефикасности и након 2 и 4 недеље код дуготрајне студије ефикасности); и *vs* након вештачки изазване хиперпигментације и апликације узорака (студија способности посветљивања) проверене су Студент т-тестом. Статистичка анализа спроведена је према упутствима и ранијим научним публикацијама (Altisent и сар., 2014; Arsić и сар., 2011; Jakobek и сар., 2013; Mahrhauser и сар., 2015; Milošević и Bogdanović, 2012; Pallant, 2011; Stojiljković и сар., 2018; 2016a); Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013; Živković, 2015).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. ЕКСТРАКТИ ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ - КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

4.1.1. ЕПДЈ - екстракционе методе и екстрагенси

Израђено је 20 течних ЕПДЈ применом различитих средстава за екстракцију и различитих метода екстракције. Применом поларних екстрагенаса (70% етанол, 45% пропиленгликол, 80% пропиленгликол и пречишћена вода) израђено је 16 течних екстраката методама мацерације, перколације, Soxhlet и ултразвучном екстракцијом, док је применом неполарних екстрагенаса (хладно цеђено маслиново уље и сунцокретово уље) израђено 4 течна екстракта методама мацерације и дигестије уљем. Обележавање израђених екстраката ЕПДЈ је дато у делу Материјали и методе, део 3.2.1. Табела 8.

4.1.2. *In vitro* физичко-хемијска карактеризација испитиваних течних ЕПДЈ

4.1.2.1. Органолептичка карактеризација ЕПДЈ

Израђени ЕПДЈ су били светло жуто-браон до карамел боје, с обзиром на црвено-браон боју коришћене дроге ПДЈ. Екстракти израђени пропиленгликолом и уљани екстракти су били тамније браон боје у односу на остале ЕПДЈ, док су екстракти израђени Soxhlet екстракцијом били најтамнији. Мирис екстраката је био мирис коришћене дроге, док се у неким екстрактима осећао делимично и мирис коришћеног екстрагенса, што је било најизраженије код етанолних екстраката. Сви екстракти су углавном били бистри након израде, без видљивих честица, док су водени екстракти били благо замућени. Пропиленгликолни и уљани екстракти су били гушће конзистенције у односу на етанолне и водене екстракте. До промена органолептичких особина испитиваних екстраката није дошло након 60, 180 и 365 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ под нормалним условима чувања. Резултати су приказани у Табели 10. и на Слици 8.

Табела 10. Органолептичке карактеристике течних ЕПДЈ (непосредно по изради и након 60, 180 и 365 дана чувања на 22±2°C

ЕПДЈ	Боја	Мирис	Бистрина	Густина
	након 7, 60, 180 и 365 дана чувања (униформно)			
70ЕтМ	светло жута	ПДЈ и етанола	бистар	најређи
70ЕтП	светло жута	ПДЈ и етанола	бистар	најређи
70ЕтС	жута	ПДЈ и етанола	бистар	најређи
70ЕтУ	светло жута	ПДЈ и етанола	бистар	најређи
45ПГМ	светло браон	ПДЈ	бистар	ређи
45ПГП	светло браон	ПДЈ	бистар	ређи
45ПГС	браон	ПДЈ	бистар	ређи
45ПГУ	светло браон	ПДЈ	бистар	ређи
80ПГМ	браон	ПДЈ	бистар	гушћи
80ПГП	браон	ПДЈ	бистар	гушћи
80ПГС	тамно браон	ПДЈ	бистар	гушћи
80ПГУ	браон	ПДЈ	бистар	гушћи
ВМ	светло браон	кисео, ПДЈ	благо замућен	редак
ВП	светло браон	кисео, ПДЈ	благо замућен	редак
ВС	браон-жута	кисео, ПДЈ	благо замућен	редак
ВУ	светло браон	кисео, ПДЈ	благо замућен	редак
МуМ	светло браон	ПДЈ и маслин.уља	бистар	најгушћи
МуД	светло браон	ПДЈ и маслин.уља	бистар	најгушћи
СуМ	светло жут	ПДЈ	бистар	најгушћи
СуД	светло жут	ПДЈ	бистар	најгушћи

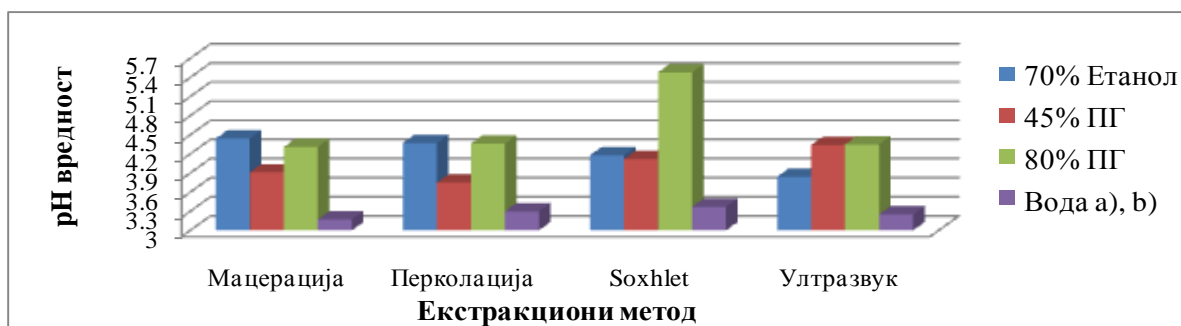


Слика 8. а) Течни екстракти ЕПДЈ; б) 70Ет-ЕПДЈ - лево (с лева на десно редом методе: мацерација, перколација, Soxhlet, ултразвук), 45ПГ-ЕПДЈ - десно; в) 80ПГ-ЕПДЈ лево, В-ЕПДЈ - десно; г) 70ЕтС - лево, 45ПГ - десно; д) Му-ЕПДЈ - напред и Су-ЕПДЈ - позади

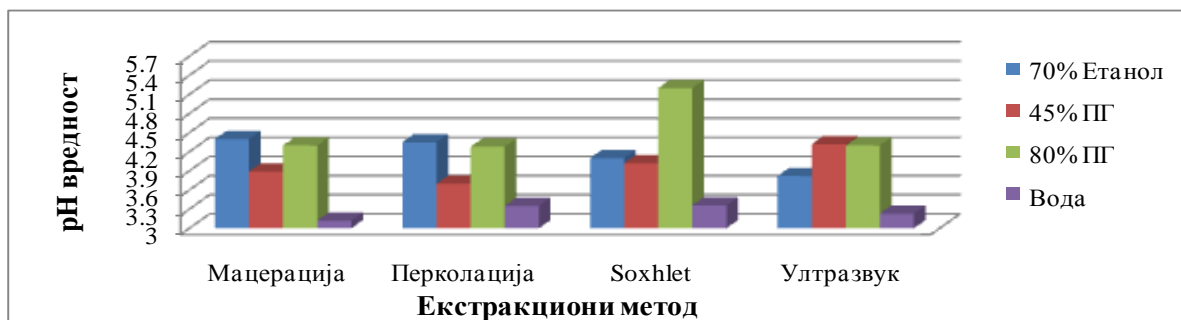
4.1.2.2. Анализа физичко-хемијских карактеристика испитиваних ЕПДЈ

4.1.2.2.1. рН вредност испитиваних ЕПДЈ

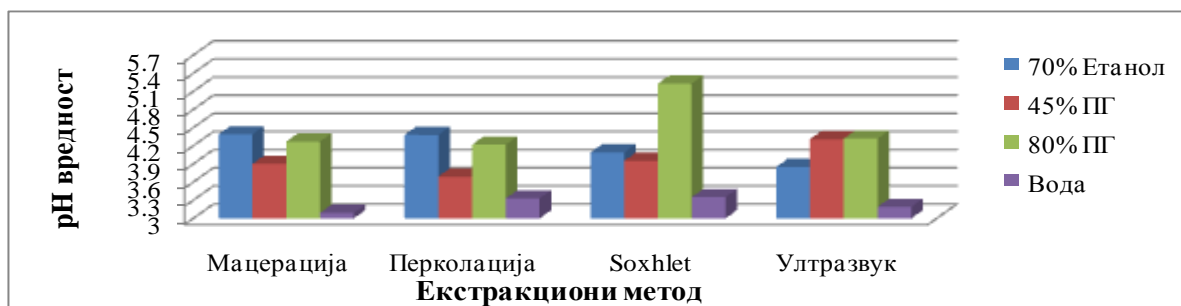
Екстрагенци компатибилни са кожом су коришћени за припрему течних ЕПДЈ, како би се испитала и утврдила могућност примене ЕПДЈ као КАС у (дермо)козметичким производима. рН вредност је одређивана код екстраката израђених применом поларних екстрагенаса. рН вредности испитиваних екстраката кретале су се у распону од 3,17 за ВМ до 5,48 код 80ПГС (Графикон 1).



- а) а) - рН вредност В-ЕПДЈ vs 70Ет-ЕПДЈ и 45ПГ-ЕПДЈ
 б) - рН вредност В-ЕПДЈ vs 80ПГ-ЕПДЈ



- б) а) - рН ЕПДЈ након 7 дана vs рН ЕПДЈ након 30 дана



- в) а) - рН ЕПДЈ након 7 дана vs рН ЕПДЈ након 60 дана

Графикон 1. рН вредности испитиваних ЕПДЈ: а) након 7 дана чувања; б) након 30 дана чувања; в) након 60 дана чувања на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Резултати су приказани као средња вредност три мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

Значајна разлика у рН вредностима између ЕПДЈ у односу на екстрагенс је постојала између водених ЕПДЈ и свих осталих екстраката, док разлика у односу на методу екстракције није постојала. Водени ЕПДЈ су имали ниже рН вредности, док су 80% ПГ екстракти имали више рН вредности у односу на остале ЕПДЈ (Графикон 1). Такође, може се приметити да се рН вредност ЕПДЈ углавном смањивала током времена (након 30 дана и након 60 дана чувања) и била је нешто нижа код свих екстраката након 60 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ у односу на прва мерења, тј. 7 дана након израде, што свакако може бити последица присуства киселих активних супстанци (воћних киселина) у ЕПДЈ. Значајна разлика у измереним рН вредностима ЕПДЈ након 60 дана у односу на 30 дана чувања није постојала. Константна рН вредност током времена може указати на потенцијалну физичко-хемијску стабилност испитиваних ЕПДЈ.

4.1.2.2. Индекс преламања светлости испитиваних ЕПДЈ

Вредности индекса преламања испитиваних ЕПДЈ приказани су у Табели 11. Индекс преламања етанолних ЕПДЈ је био око 1,36, што је слично индексу преламања за етанол (1,361), с обзиром да је коришћен 70% етанол као екстрагенс. Водени екстракти су имали вредности око 1,34, што је приближно вредности индекса преламања пречишћене воде (1,333), што су показали и Арсић и сар. (2014). Индекс преламања испитиваних ЕПДЈ су били у складу са литературним референтним вредностима индекса преламања за одговарајуће средство за екстракцију (Николић и Митић, 2007). Најнижи индекс преламања светлости су имали водени екстракти (око 1,34), док су уљани екстракти показали највише вредности (око 1,46) (Табела 11). Поларност примењених екстрагенаса је утицала на индекс преламања, па су уљани екстракти добијени неполарним екстрагенсима показали значајно више вредности у односу на екстракте добијене поларним екстрагенсима. Такође, врста коришћеног поларног екстрагенса је утицала на индекс преламања, па је постојала значајна разлика у вредностима између свих екстраката добијених поларним екстрагенсима. Разлика у вредностима између екстраката добијених маслиновим и сунцокретовим уљем није постојала. Врста примењене методе екстракције није утицала на индекс преламања светлости испитиваних ЕПДЈ. Индекс преламања светлости за испитиване ЕПДЈ се није значајно променио након 60 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ у односу на вредности добијене 7 дана након израде, што може бити један од показатеља потенцијалне физичко-хемијске стабилности ЕПДЈ.

Табела 11. Индекс преламања светлости и густина испитиваних ЕПДЈ 7 дана након израде и након 60 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$

ЕПДЈ	Индекс преламања светлости		Густина (g/cm^3)	
	7 дана	60 дана	7 дана	60 дана
70ЕтМ	1,371 \pm 0,001	1,371 \pm 0,000	0,961 \pm 0,000	0,962 \pm 0,001
70ЕтП	1,369 \pm 0,001	1,369 \pm 0,001	0,982 \pm 0,001	0,982 \pm 0,000
70ЕтС	1,354 \pm 0,002	1,355 \pm 0,001	0,979 \pm 0,002	0,975 \pm 0,002
70ЕтУ	1,372 \pm 0,001	1,370 \pm 0,002	0,939 \pm 0,001	0,938 \pm 0,001
45ПГМ	1,393 \pm 0,000	1,394 \pm 0,001	1,054 \pm 0,001	1,055 \pm 0,001
45ПГП	1,394 \pm 0,001	1,393 \pm 0,001	1,071 \pm 0,002	1,067 \pm 0,001
45ПГС	1,416 \pm 0,002	1,415 \pm 0,001	1,044 \pm 0,000	1,042 \pm 0,002
45ПГУ	1,397 \pm 0,003	1,392 \pm 0,002	1,031 \pm 0,000	1,031 \pm 0,001
80ПГМ	1,424 \pm 0,002	1,422 \pm 0,001	1,048 \pm 0,001	1,045 \pm 0,002
80ПГП	1,424 \pm 0,002	1,422 \pm 0,001	1,038 \pm 0,001	1,040 \pm 0,001
80ПГС	1,428 \pm 0,001	1,425 \pm 0,002	1,038 \pm 0,002	1,037 \pm 0,001
80ПГУ	1,421 \pm 0,002	1,417 \pm 0,001	1,054 \pm 0,002	1,049 \pm 0,002
ВМ	1,345 \pm 0,003	1,340 \pm 0,001	1,008 \pm 0,003	1,001 \pm 0,001
ВП	1,342 \pm 0,000	1,342 \pm 0,001	0,952 \pm 0,002	0,953 \pm 0,001
ВС	1,341 \pm 0,001	1,340 \pm 0,002	0,908 \pm 0,001	0,910 \pm 0,000
ВУ	1,344 \pm 0,001	1,339 \pm 0,000	0,972 \pm 0,000	0,971 \pm 0,001
МуМ	1,424 \pm 0,003 ^{а)}	1,466 \pm 0,001 ^{а)}	0,910 \pm 0,001	0,911 \pm 0,001
МуД	1,465 \pm 0,004 ^{а)}	1,457 \pm 0,001 ^{а)}	0,873 \pm 0,001	0,873 \pm 0,000
СуМ	1,468 \pm 0,002 ^{а)}	1,472 \pm 0,002 ^{а)}	0,918 \pm 0,001	0,917 \pm 0,000
СуД	1,460 \pm 0,001 ^{а)}	1,463 \pm 0,001 ^{а)}	0,887 \pm 0,000	0,886 \pm 0,001

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm SD и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

^{а)} Индекс преламања светлости ЕПДЈ добијених неполарним екстрагенсима vs поларним

^{б)} Индекс преламања светлости ЕПДЈ у односу на екстрагенс

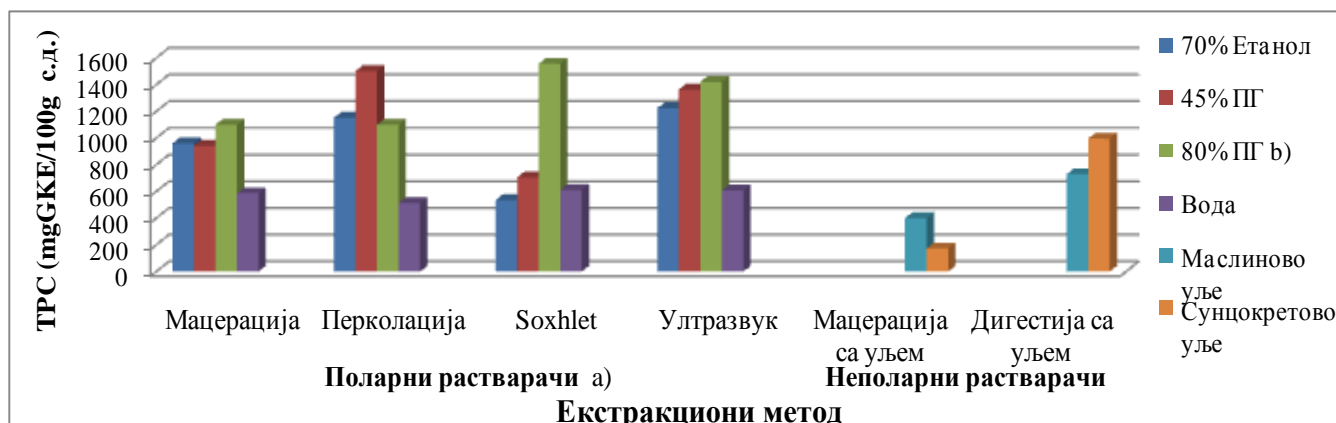
4.1.2.2.3. Густина испитиваних ЕПДЈ

Вредности добијених густина испитиваних ЕПДЈ су приказане у Табели 11. ЕПДЈ су имали густину сличну вредностима за густину коришћених средстава за екстракцију (Николић и Митић, 2007). Водени екстракти су имали густину од $0,908\pm 0,001$ до $1,008\pm 0,003$ g/cm^3 што је приближно референтним вредностима за густину пречишћене воде ($0,998$ g/cm^3); екстракти са маслиновим уљем око $0,90$ g/cm^3 (референтне вредности $0,920$ g/cm^3), док су етанолни екстракти имали вредности око $0,96$ g/cm^3 што је нешто више од референтних вредности за густину концентрованог раствора етанола ($0,790$ g/cm^3), мада мора се узети у обзир да је за израду екстраката коришћен 70% раствор етанола. Пропиленгликолни ЕПДЈ су имали највећу густину

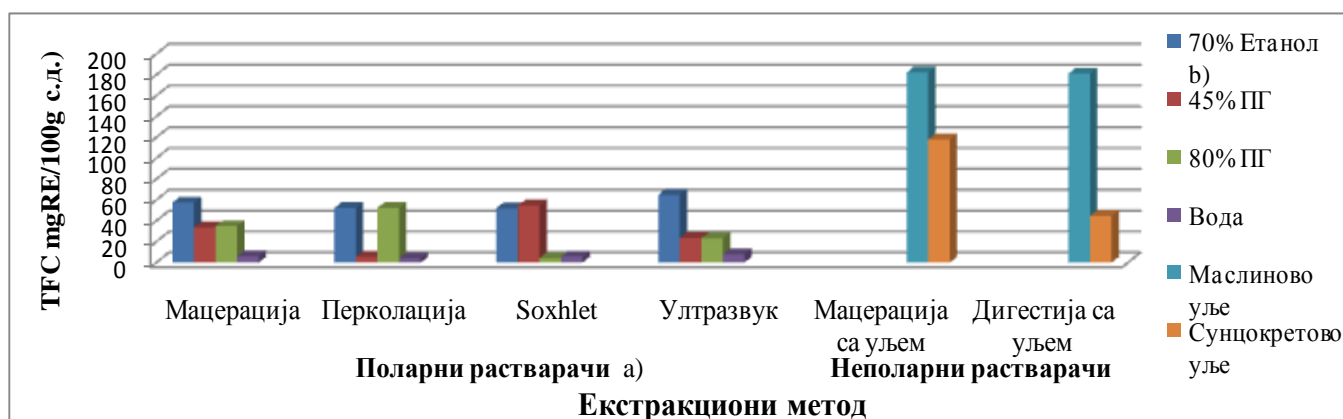
(око 1,04 g/cm³). Разлика у густини екстракта у односу на коришћену методу екстракције није постојала. Екстракти нису показали значајну промену у густини након 60 дана чувања на 22±2°C у односу на густину измерену одмах након израде, што може бити још један од показатеља физичко-хемијске стабилности испитиваних ЕПДЈ.

4.1.3. Анализа полифенолног садржаја у испитиваним ЕПДЈ

Екстракти богати биоактивним ПФ једињењима, као и воћним киселинама, се често користе у производњи фитопрепарата како за оралну примену, тако и за примену на кожи. Правилан избор средства за екстракцију и екстракционе методе је веома важан за добру екстракцију биоактивних принципа, као и исплативости самог екстракционог поступка (Milutinović и сар., 2013; Savić и сар., 2013). Растворљивост ПФ једињења као и ефикасност екстракције зависе од поларности, рН вредности и селективности примењеног екстрагенса (ПФ су боље растворни у екстрагенсима који су мање поларни од воде) (Milutinović и сар., 2013). Такође, ефикасност екстракције зависи и од физичких и хемијских карактеристика испитиваних ПФ једињења (поларност, интеракција са другим једињењима у испитиваном биљном материјалу, стабилност) (Franquin-Trinquier и сар., 2014). Поједина ПФ једињења су некада везана у различите комплексе, па се тешко екстрахују и идентификују применом само једне методе екстракције или употребом једног средства за екстракцију. У циљу спречавања оксидације ПФ често је неопходно применити сукцесивно различите екстрагенсе и методе екстракције за изоловање ових активних супстанци из биљног материјала. Екстракција применом неколико екстрагенаса (један за другим или мешавина) омогућава боље издвајање и изоловање ПФ једињења (Kalinowska и сар., 2014). У том контексту, коришћени су различити екстрагенси и смеше екстрагенаса (вода-етанол и вода-пропиленгликол системи), два екстрагенса, један за другим (у случају етанол-уљани систем) као и различите методе екстракције како би се добили ЕПДЈ са најбољим садржајем ПФ једињења и доброг антиоксидативног потенцијала. Садржај ПФ једињења у биљном материјалу и њихов антиоксидативни потенцијал је веома тешко поредити, због коришћења различитих метода екстракције, средстава за екстракцију, различитих сорти јабука и делова биљака (Carbone и сар., 2011; Kalinowska и сар., 2014). Резултати испитивања укупног садржаја фенола, флавоноида, танина и антоцијана у испитиваним ЕПДЈ су приказани на Графикаону 2.



а) а) - ТРС у ЕПДЈ израђених поларним екстрагенсима vs неполарним,
 б) - ТРС у 80ПГ-ЕПДЈ vs В-ЕПДЈ



б) а) - ТФС у ЕПДЈ израђених поларним екстрагенсима vs неполарним
 б) - ТФС у 70Ет-ЕПДЈ vs В-ЕПДЈ



в) а) - ТТ у ЕПДЈ израђених поларним екстрагенсима vs неполарним



г) ^{а)} - ТА у ЕПДЈ израђених поларним екстрагенсима vs неполарним

Графикон 2. Укупан садржај: а) фенола (TPC); б) флавоноида (TFC); в) танина (TT); г) антоцијана (ТА) у испитиваним ЕПДЈ. Резултати су приказани као средња вредност три мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест.

За екстракцију биоактивних ПФ једињења и ВК из биљних сировина и добијање екстраката намењених за примену на кожу чешће се користи 70% етанол, који доста добро екстрахује активне супстанце и селективнији је екстрагенс у односу на остале примењене екстрагенсе. Израђени етанолни екстракти су стабилнији у односу на екстракте израђене другим средствима за екстракцију, могу се користити директно на кожу, мада постоји ризик и да је исушују (Franco и сар., 2008). 70% етанол се показао као веома добро средство за екстракцију ПФ једињења, што су показали и Franco и сар. (2008), где је је примена етанола као мање поларног екстрагенса од воде, дала бољи принос екстракције израженог кроз инхибицију DPPH радикала. Вода као екстрагенс има многе предности у односу на органске екстрагенсе, првенствено због безбедности примене и економичности, али је мање селективан екстрагенс. Водени екстракти могу, осим ПФ једињења да садрже и велику количину других компоненти растворних у води. Водени ЕПДЈ имали су висок садржај танина и антоцијана. Екстракција водом је дала просечан садржај ПФ једињења и релативно добру АА испитиваних ЕПДЈ. Смеша воде и пропиленгликола није често коришћена у екстракцији природних активних једињења из биљног материјала, упркос добро познатој примени ових екстрагенсарастварача за друге намене (повећање растворљивости липофилних супстанци у води, конзерванси у изради лековитих, козметичких и прехранбених производа). Пропиленгликол има веома добру фармацеутску примену, повећава растворљивост липофилних супстанци у води, добар је конзерванс, па су пропиленгликолни екстракти

стабилнији и мање склони микробиолошком онечишћењу, а уједно је добар и екстрагенс. Од стране FDA (енг. *Food and Drug Administration, 2008*) је признат као сигуран и безбедан за примену и компатибилан је са кожом и примењен у (дермо)козметичким производима се може у нижим концентрацијама користити као добар емолијенс и остварити влажећи ефекат на кожи након nanoшења емулзија (Arsić и сар., 2011; 2010). Такође, може деловати као конзерванс у емулзији, а може и утицати на структурисање саме емулзије (Ph Euro 6,0; Tubtimdee и Shotipruk, 2011). Примена уља као екстрагенса је такође све више заступљена, јер осим што могу доста добро да изолују активне супстанце из биљних сировина, имају и веома добра козметичка својства. Уљани екстракти инкорпорирани у емулзије могу додатно да покажу хидратантно дејство, а и да утичу на структурисање саме емулзије. Уља као што су хладно цеђено маслиново уље и сунцокретоно уље се често користе у фармацеутској, прехранбеној и козметичкој индустрији (Arsić и сар., 2014; 2011; 2010; Stojiljković и сар., 2016а); 2016в), 2013). Употреба 96% етанола приликом дигестије уљем је додатно повећала садржај активних супстанци (скоро двоструко) као и АА добијених екстраката у поређењу са ЕПДЈ добијеним мацерацијом уљем. Методе мацерација уљем и дигестија уљем су генерално дале најбољи садржај ПФ једињења (Графикон 2), осим за ТРС (Stojiljković и сар., 2016а); 2016в)).

У зависности од коришћеног средства за екстракцију и примењене методе екстракције, добијени течни ЕПДЈ су показали различит садржај ПФ једињења, као и различит антиоксидативни потенцијал.

Садржај укупних фенола (ТРС) у испитиваним течним ЕПДЈ кретао се у распону од 172,91 mgГКЕ/100g суве дроге (с.д.) (СуМ) до 1556,99 mgГКЕ/100g с.д. (80ПГС-ЕПДЈ) (Графикон 2 а)). Боља растворљивост фенола је показана у поларним екстрагенсима у односу на неполарне екстрагенсе, па је садржај фенола био бољи у ЕПДЈ добијеним поларним екстрагенсима. Ултразвучна екстракција је генерално била добра екстракциона метода која је дала виши садржај укупних фенола за све поларне екстрагенсе у односу на остале екстракционе методе.

Највећа вредност ТФС је показана у МуМ (182,22 mgРЕ/100g с.д.), као и најнижи процентуални садржај антоцијана (0,70%), док је најнижи ниво ТФС показан у ВП (3,97 mgРЕ/100g с.д). Екстракција са системом екстрагенаса 96% етанол-сунцокретоно уље, тј. код узорака СуД је показан најбољи процентуални садржај антоцијана (14,63%) (Графикон 2 б) и г)). Jakobek и сар. (2013) су такође показали

добар садржај ПФ једињења у локалним сортама јабука из југоисточне Европе, посебно садржај антоцијана (1-7%). Садржај антоцијана, као најзаступљенијих једињења у плоду јабуке, је веома важан квалитативни параметар ПДЈ, због боје коју антоцијани дају плодовима, као и због антиоксидативних ефеката. Садржај антоцијана у ПДЈ је различит, и може зависити од сорте јабука, климатских услова, методологије рада, што додатно може отежати поређење резултата са литературом (Jakobek и сар., 2013; Kunradi Vieira и сар., 2011; 2009).

Садржај танина у испитиваним ЕПДЈ се кретао у распону од 72,73 mgKE/100g с.д. за 80ПГУ до 8872,73 mgKE/100g с.д. за Муд (Графикон 2 в)). Садржај танина и антоцијана је био значајно бољи у воденим екстрактима у односу на екстракте добијене применом осталих поларних екстрагенаса, али највећа растворљивост флавоноида, танина и антоцијана је била у неполарним екстрагенсима, посебно у систему етанол-уље применом дигестије као екстракционе методе.

Садржај ПФ једињења у ЕПДЈ добијених помоћу поларних и неполарних екстрагенаса је био различит. Садржај фенола је био виши код ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима у односу на екстракцију неполарним екстрагенсима, док је садржај флавоноида, танина и антоцијана значајно био виши код ЕПДЈ добијених неполарним екстрагенсима. Значајно виши садржај фенола је показан у ЕПДЈ добијеним помоћу 80ПГ, као поларног екстрагенса, у поређењу са ЕПДЈ добијеним са водом као екстрагенсом. Екстракти са 70% етанолом као екстрагенсом су имали значајно виши садржај флавоноида у односу на водене ЕПДЈ (Графикон 2 а) и б)). Није било значајне разлике у садржају фенола и флавоноида између осталих екстраката, као ни између садржаја танина и антоцијана у испитиваним ЕПДЈ у односу на примењен поларни екстрагенс. Разлика у садржају ПФ између примењених неполарних екстрагенаса није била значајна (маслиново уље vs сунцокретоно уље), али је код њих генерално показан добар садржај ПФ једињења. Показано је да не постоји значајна разлика у садржају ПФ једињења у односу на примењене методе екстракције. Генерално, најбољи садржај биоактивних ПФ једињења је показан код ЕПДЈ добијеним ултразвучном екстракцијом као методом екстракције (за поларне екстрагенсе) и ЕПДЈ добијеним методом дигестије (код неполарних екстрагенаса) (Графикон 2).

Примена различитих методологија рада (различит екстракциони поступак, различити екстрагенси, температура...) и приказивање добијених резултата као различитих еквивалената одговарајућих стандарда, веома отежава поређење резултата добијених од стране различитих истраживача. Показан је добар садржај фенола као и

добра АА за етанолне екстракте, што су показали и Amzad Hossain и сар. (2009) (вредности за ТРС које су добили су биле у распону од 7,36 до 10,20 mg/g с.д.) Једна студија је показала да је садржај укупних фенола (вредности 73,59 - 74,6 µg/g с.д. ниже у односу на наше вредности) и садржај укупних флавоноида (40,56 - 52,30 mg/100g - резултати слични резултатима у докторској дисертацији) у екстрактима плода дивљих јабука виши у односу на садржај у екстрактима плодова култивисаних сорти јабука (Maria John и сар., 2014). Imeh и Khokhar (2002) такође су показали добре вредности за ТРС (302,3-534 mgГКЕ/100g) и ТФС у екстрактима плода дивљих јабука у поређењу са гајеним врстама, и добијени резултати су слични нашим резултатима. Нешто виши садржај укупних фенола и сличан садржај флавоноида у ЕПДЈ је показан у нашем истраживању у односу на објављене резултате за екстракте култивисаних сорти јабука из нашег региона (ТРС - 9,37-1440 mg/100g свеже материје) (Šavikin и сар., 2014). Једна студија је показала утицај примене различитих екстрагенаса и методологије рада на садржај фенола, где су резултати били слични резултатима из нашег истраживања (Franquin-Trinquier и сар., 2014). Kalinowska и сар. (2014) су такође показали већи садржај ПФ једињења у екстрактима органски гајених јабука и дивљих јабука у односу на садржај ПФ у екстрактима из култивисаних сорти, што може бити резултат деловања одбрамбених механизма саме биљке. Они су такође показали и утицај примене различитих екстрагенаса и метода екстракције (мацерација, Soxhlet и ултразвучна екстракција) на садржај ПФ једињења у екстрактима плода јабуке (ТРС је био 3,49 и 6,80 mgГКЕ/g), при чему је у овој докторској дисертацији показан бољи садржај ПФ једињења. Резултати које су добили Xiaodan и сар. (2014) за ТРС у екстрактима плода јабуке (160,3 - 4727,8 mgГКЕ/kg свеже материје) су били нижи од наших резултата; ТФС (114,2-3045,3 mgРЕ/kg свеже материје) је био већи у односу на наше резултате; док је садржај антоцијана био између 12,1 и 1758,4 mgЦЗГЕ/kg свеже материје (цијанидин-3-глукозид еквивалента/kg свеже материје).

4.1.4. HPLC анализа и стандардизација садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у ЕПДЈ

4.1.4.1. HPLC анализа и стандардизација садржаја ПФ једињења у ЕПДЈ

Плод дивље јабуке садржи различита **полифенолна једињења** (феноли, флавоноиди, танини, антоцијани) која поседују антиоксидативну активност. Садржај

ПФ једињења идентификованих у испитиваним ЕПДЈ и њихове концентрације након израде и након чувања у периоду од две године на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ је приказан у Табели 12 (а) - након израде и б) - након две године чувања). Хроматограми идентификованих ПФ једињења су приказани на Слици 9. док су спектри и структурне формуле најзаступљенијих ПФ једињења у ЕПДЈ приказани на Слици 10.

У испитиваним ЕПДЈ идентификован је велики број ПФ једињења и одређене су њихове концентрације одмах након израде као и након две године чувања: гална киселина, пирогалол, протокатехинска киселина и етил етар протокатехинске киселине, катехин, хлорогенска киселина и њен дериват у неким ЕПДЈ, процијанидин Б2, кафена киселина, епикатехин, *p*-кумарна киселина, скополетин, синапинска киселина, елагинска киселина и њен дериват, хиперозид, кверцетин, деривати кверцетина и изокверцетин, нарингин, кемферол-3-*O*-глукозид, флоридзин и дериват флоридзина, флоретин и ферулна киселина у неким ЕПДЈ. Присуство флавоноида (флавона: изокверцетина; мономерних и олигомерних флаван-3-ола: епикатехин, катехиндихидрохалкона: флоридзин и деривати) и фенолних киселина (гална, протокатехинска, хлорогенска, *p*-кумарна, ферулна киселина) је веома битно за квалитет самог ПДЈ као и за квалитет добијених ЕПДЈ. Флавоноиди својим антиоксидативним, антибактеријским, антимулагеним и антиканцерогеним дејством (Arct и Rytkowska, 2008) утичу како на квалитет, изглед, мирис и укус самог ПДЈ тако показују и повољан утицај на здравље људи приликом конзумирања, као и на кожу приликом локалне примене производа који садрже ЕПДЈ као КАС (Amzad Hossain и сар., 2009; Maria John и сар., 2014). Након израде, епикатехин је био најзаступљенији у свим испитиваним ЕПДЈ и његова концентрација се кретала у распону од 6946,59 mg/100g ЕПДЈ код 70ЕтП до 108,56 mg/100g код МуД. Процијанидин Б2 је након израде, такође, био заступљен у већим концентрацијама од 2469,60 mg/100g код 70ЕтП до 88,65 mg/100g код 45ПГС. Ова два једињења (епикатехин и процијанидин Б2) нису идентификована код уљаних ЕПДЈ добијених мацерацијом. Пирогалол, катехин и флоридзин су након израде просечно били заступљени у концентрацијама од 112,9 mg/100g ЕПДЈ, 14,25 mg/100g и 11,31 mg/100g, респективно (Табела 12), док су гална и хлорогенска киселина просечно биле заступљене у концентрацијама од 67,15 mg/100g и 23,73 mg/100g, респективно (Табела 12). Остала идентификована ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ су одмах након израде имала концентрације ниже од 5 mg/100g ЕПДЈ (Табела 12). Ферулна киселина је идентификована у ниској концентрацији само код 80ПГС, скополетин само код ЕПДЈ добијених помоћу 70% етанола и 45%

пропиленгликола као екстрагенаса, док је елагинска киселина идентификована само код ЕПДЈ добијених маслиновим уљем као екстрагенсом (Табела 12).

Садржај ПФ једињења је након израде био највећи код 70Ет-ЕПДЈ у односу на садржај у осталим ЕПДЈ, а значајно већи у односу на садржај у В-ЕПДЈ. ЕПДЈ добијени применом поларних екстрагенаса су показали знатно бољи садржај ПФ једињења у односу на садржај у ЕПДЈ добијених неполарним екстрагенсима. Примена различитих екстракционих метода за добијање ЕПДЈ није показала значајан утицај на садржај ПФ једињења. Ипак, ЕПДЈ добијени мацерацијом (посебно 70ЕтМ и 45ПГМ) и ултразвуком (посебно 80ПГУ и ВУ) код поларних екстрагенаса и дигестијом код неполарних екстрагенаса су дали незнатно боље резултате за садржај ПФ једињења у односу на садржај у ЕПДЈ добијених перколацијом, Soxhlet екстракцијом и мацерацијом са уљем као екстракционим методама. ЕПДЈ добијени Soxhlet екстракцијом су показали најнижи садржај ПФ једињења након израде у односу на остале ЕПДЈ добијене поларним екстрагенсима (Табела 12, Слика 9).

Процентуални садржај ПФ једињења у ЕПДЈ добијеним поларним екстрагенсима се кретао у концентрацији од 0,76% за 45ПГС до 9,68% за 70ЕтП и 9,16% за 70ЕтУ и 9,00% за 45ПГУ. Најбољи садржај је одређен код ЕПДЈ добијених 70% етанолом и 45% пропиленгликолом као екстрагенсима и мацерацијом, перколацијом и ултразвучном екстракцијом као екстракционим методама и кретао се у просеку око 8-9%. Процентуални садржај ПФ једињења у ЕПДЈ добијених уљем као екстрагенсима је био бољи код ЕПДЈ добијених дигестијом и за Суд је био око 7%. Добијени резултати указују да би се ЕПДЈ са стандардизованом концентрацијом ПФ једињења од 7-9% потенцијално могли користити као антиоксидативне КАС у производима намењеним за примену на кожу.

Садржај ПФ једињења се, генерално, смањило у испитиваним ЕПДЈ током чувања у периоду од две године на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ у односу на садржај одређен одмах након израде (Табела 12 б)). Садржај ПФ једињења се значајно смањило код уљаних ЕПДЈ, 45ПГ и 80ПГ-ЕПДЈ (код неких ЕПДЈ чак и до 10 пута) након чувања, док је код В-ЕПДЈ дошло до врло мале промене у укупном садржају ПФ. Након чувања у периоду од две године, садржај ПФ једињења у ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима је и даље био значајно већи у односу на садржај у ЕПДЈ добијених неполарним екстрагенсима. Такође, након чувања, значајно бољи садржај ПФ једињења је показан у 70Ет-ЕПДЈ у односу на садржај у 80ПГ-ЕПДЈ. Тип екстракционе методе и након чувања није показао значајан утицај на садржај ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ.

Табела 12. Квалитативни и квантитативни садржај ПФ једињења у ЕПДЈ: а) након израде; б) након две године чувања
а) након израде

Полифенолна једињења (ПФ)		70ЕтМ	70ЕтП	70ЕтС	70ЕтУ	45ПГМ	45ПГП	45ПГС	45ПГУ
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ							
1	Гална киселина	203,3	148,28	36,79	210,76	58,85	11,61	26,25	61,46
2	Пирогалол	13,28	9,48	96,48	15,19	16,54	4,88	130,07	7,26
3	Протокатехинска киселина	2,61	2,75	1,78	2,8	2,37	1,61	0,59	2,59
4	Катехин	21,72	28,26	8,23	26,78	24,92	7,07	5,65	29,7
5	Хлорогенска киселина	37,98	40,73	20,96	38,15	33,61	35,81	5,65	38,26
6	Процијанидин Б2	2318,58	2469,59	738,41	2357,12	2111,94	2202,21	88,65	2342,82
7	Кафена киселина	0,52	0,25	0,4	0,49	1,09	0,64	0,06	0,62
8	Епикатехин	6359,68	6946,59	3318,93	6479,93	5514,04	6102,07	490,45	6437,82
9	<i>p</i> -кумарна киселина	0,36	0,24	-	-	-	-	-	-
10	Скополетин	0,4	0,4	0,12	0,41	0,43	0,4	0,01	0,45
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	1,13	1,25	0,49	1,27	0,56	0,75	0,17	0,88
14	Изокверцетин	4,47	4,87	1,70	4,90	2,24	3,02	0,61	3,52
15	Етил стар протокатехинске киселине	-	-	-	-	1,02	0,76	-	0,75
16	Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	2,57	2,71	0,81	2,64	2,15	2,12	0,32	2,35
18	Флоридзин	18,85	20,89	10,42	19,46	15,66	17,65	2,83	19,4
19	Кверцетин	0,9	0,64	0,82	0,51	1,83	1,4	0,39	1,62
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	0,02	0,02	0,003	0,03	0,01	0,01	0,002	0,02
22	Дериват флоридзина	-	-	-	0,02	-	-	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	-	-	-	4,45	-	6,67	52,05
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		8986,37	9676,95	4236,34	9160,46	7791,71	8392,01	758,37	9001,81
Процентуални садржај (%)		8,99	9,68	4,24	9,16	7,79	8,39	0,76	9,00

наставак 1. а) Садржај ПФ једињења у ЕПДЈ након израде

Полифенолна једињења (ПФ)		80ПГМ	80ПГП	80ПГС	80ПГУ	ВМ	ВП	ВС	ВУ
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ							
1	Гална киселина	47,14	41,24	20,34	49,84	54,72	45,17	46	48,6
2	Пирогалол	17,65	15,83	1732,06	8,49	12,42	12,03	133,14	6,73
3	Протокатехинска киселина	2,61	2,27	13,47	1,49	2,68	2,01	2,1	2,21
4	Катехин	29,91	-	-	13,08	13,49	8,52	4,17	16,58
5	Хлорогенска киселина	38,66	34,29	3,97	19,97	23,12	22,16	17,44	28
6	Процијанидин Б2	2350,9	2021,19	-	1555,43	701,85	1110,04	476,54	1165,21
7	Кафена киселина	0,15	0,52	0,65	-	1,06	0,51	0,51	0,92
8	Епикатехин	6517,91	5800,71	128,86	4205,81	581,63	466,68	553,42	717,32
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-	-	-	-	0,16
10	Скополетин	-	-	-	-	-	-	-	0,31
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	1,23	0,93	0,21	0,57	0,06	-	0,24	0,34
14	Изокверцетин	4,87	3,86	-	2,26	-	-	0,36	0,92
15	Етил етар протокатехинске киселине	-	-	-	-	0,17	-	0,11	0,79
16	Нарингин	16,91	13,85	-	6,47	-	-	-	7,77
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	2,71	2,08	-	1,25	0,63	0,48	0,36	1,01
18	Флоридзин	20,03	15,37	0,48	9	7,57	6,91	6,47	0,72
19	Кверцетин	0,57	0,39	0,25	0,25	-	0,16	-	0,16
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	0,35	0,21
21	Дериват кверцетина	0,02	0,02	-	0,009	-	-	-	-
22	Дериват флоридзина	-	-	-	-	0,005	-	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	0,02	-	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	-	-	-	-	-	-	3,61
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		9051,29	7952,55	1900,31	5873,92	1399,41	1674,67	1241,21	2001,57
Процентуални садржај (%)		9,05	7,95	1,90	5,87	1,40	1,67	1,24	2,00

наставак 2. а) Садржај ПФ једињења у ЕПДЈ након израде

Полифенолна једињења (ПФ)		МуМ	МуД	СуМ	СуД
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ			
1	Гална киселина	14,34	108,29	24,48	85,61
2	Пирогалол	1,09	12,21	1,48	11,77
3	Протокатехуична киселина	0,16	2,76	0,2	2,55
4	Катехин	3,46	1,72	-	41,75
5	Хлорогенска киселина	0,15	30,4	0,56	24,7
6	Процијанидин Б2	-	1758,26	-	1442,06
7	Кафена киселина	-	1,58	0,1	1,4
8	Епикатехин	-	108,56	-	5368,1
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-
10	Скополетин	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	1,67	0,1	-	-
13	Хиперозид	-	1,31	0,01	1,15
14	Изокверцетин	-	1,88	-	2,49
15	Етил етар протокатехуичне киселине	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	-	2,65	-	2,31
18	Флоридзин	-	18,25	0,18	16,02
19	Кверцетин	0,12	0,91	0,13	0,7
20	Флоретин	-	1,19	-	-
21	Дериват кверцетина	-	-	-	0,02
22	Дериват флоридзина	-	0,006	-	0,08
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	-	-	-
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		20,99	2050,08	27,14	7000,71
Процентуални садржај (%)		0,02	2,05	0,03	7,00

Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе након чега је рађен *Tukey's* тест.

^{a)} - ПФ у 70Ет-ЕПДЈ након израде vs В-ЕПДЈ

б) садржај ПФ једињења у ЕПДЈ након две године чувања

Полифенолна једињења (ПФ)		70ЕтМ	70ЕтП	70ЕтС	70ЕтУ	45ПГМ	45ПГП	45ПГС	45ПГУ
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ							
1	Гална киселина	168,56	123,08	10,87	17,02	19,19	11,32	12,13	15,63
2	Пирогалол	10,49	8,58	60,11	14,05	12,46	3,91	123,65	7,23
3	Протокатехинска киселина	1,74	-	1,68	1,64	1,38	1,36	0,48	1,52
4	Катехин	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Хлорогенска киселина	0,42	32,97	17,55	16,68	25,68	11,47	2,25	14,55
6	Процијанидин Б2	740,06	-	-	-	-	-	-	-
7	Кафена киселина	0,08	-	0,3	0,1	0,29	-	0,2	0,18
8	Епикатехин	4999,03	3579,52	1813,44	1734,3	2571,82	1299,46	195,92	0
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-	-	-	-	0,24
10	Скополетин	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	0,91	0,8	0,42	0,76	0,24	0,07	-	0,28
14	Изокверцетин	3,17	1,59	1,27	1,35	0,49	0,29	-	0,49
15	Етил стар протокатехинске киселине	0,14	-	-	-	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	0,07	0,98	0,48	0,92	0,55	0,19	-	0,38
18	Флоридзин	21,23	1,01	8,7	0,21	10,05	3,55	0,31	6,1
19	Кверцетин	0,89	0,49	0,39	0,49	0,15	-	-	-
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	-	-	-	-	0,14	0,07	-	0,008
22	Дериват флоридзина	-	-	-	-	0,65	0,22	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-	-	0,07	-	0,001
24	Ферулна киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	368,56	323,08	10,87	17,02	19,19	14,32	12,13	15,63
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		6312,21	4072,10	1926,08	1804,54	2662,28	134,30	346,89	62,00
Процентуални садржај (%)		6,31	4,07	1,93	1,80	2,66	1,35	0,35	0,06

наставак 1. б) након две године чувања

Полифенолна једињења (ПФ)		80ПГМ	80ПГП	80ПГС	80ПГУ	ВМ	ВП	ВС	ВУ
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ							
1	Гална киселина	3,66	35,75	-	49,43	46,82	44,22	17,49	35,77
2	Пирогалол	16,62	-	-	6,72	-	-	-	6,59
3	Протокатехинска киселина	0,8	-	-	0,73	0,15	0,12	0,09	0,12
4	Катехин	-	-	-	-	4,49	4,08	3,54	-
5	Хлорогенска киселина	11,97	10,15	0,91	11,52	12,65	15,52	6,32	15,27
6	Процијанидин Б2	-	-	-	161,79	-	-	-	-
7	Кафена киселина	-	0,14	-	-	1,05	0,5	0,08	0,72
8	Епикатехин	-	1134,91	-	1298,15	308,46	307,13	486,07	649,9
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-	-	0,23	-	-
10	Скополетин	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	0,28	0,23	-	0,25	-	-	-	-
14	Изокверцетин	0,75	0,65	-	0,70	-	-	-	-
15	Етил етар протокатехинске киселине	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	0,34	0,28	-	0,33	-	-	0,07	-
18	Флоридзин	5,38	3,92	-	5,05	2,41	3,04	1,88	0,43
19	Кверцетин	0,26	0,21	0,13	0,25	-	-	-	-
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	0,002	0,001	-	0,002	-	-	-	-
22	Дериват флоридзина	0,02	0,01	-	0,02	0,009	0,01	-	0,009
23	Дериват хлорогенске	0,001	0,004	-	0,005	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	0,01	-	-	0,001	-	-
25	Дериват епикатехина	3,66	45,75	20,34	49,43	66,82	44,22	17,49	35,77
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		43,74	1232,01	21,39	1584,38	442,86	1674,67	533,03	744,58
Процентуални садржај (%)		0,04	1,23	0,02	1,58	0,44	1,67	0,53	0,74

наставак 2. б) након две године чувања

Полифенолна једињења (ПФ)		МуМ	МуД	СуМ	СуД
		mg ПФ / 100g ЕПДЈ			
1	Гална киселина	-	13,37	-	15,92
2	Пирогалол	-	8,71	0,72	10,62
3	Протокатехинска киселина	-	0,21	-	0,1
4	Катехин	0,7	-	-	-
5	Хлорогенска киселина	-	0,99	-	0,56
6	Процијанидин Б2	-	-	-	-
7	Кафена киселина	-	0,07	-	-
8	Епикатехин	-	6,23	-	-
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-
10	Скополетин	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-
13	Хиперозид	-	-	-	-
14	Изокверцетин	-	-	-	-
15	Етил етар протокатехинске киселине	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	-	-	-	-
18	Флоридзин	-	0,54	-	0,77
19	Кверцетин	-	0,06	-	0,13
20	Флоретин	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	-	-	-	-
22	Дериват флоридзина	-	-	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	13,37	-	15,92
Укупан садржај mg/100g ЕПДЈ		0,70	43,55	0,72	44,02
Процентуални садржај (%)		0,00	0,04	0,00	0,04

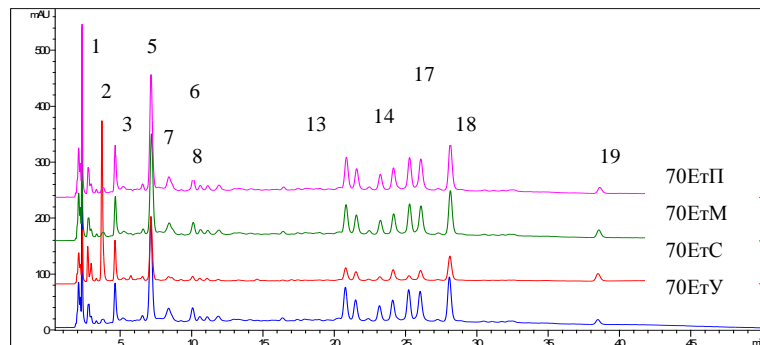
Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

^{a)} - ПФ у 70Ет-ЕПДЈ након израде vs након две године чувања

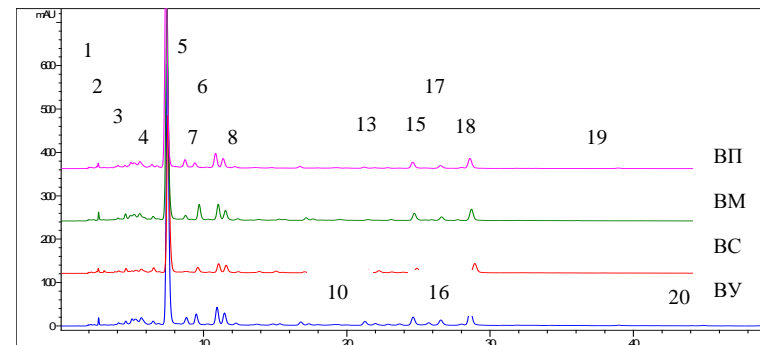
^{б)} - ПФ у 80ПГ-ЕПДЈ након израде vs након две године чувања

^{в)} - ПФ након чувања у ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима vs неполарни

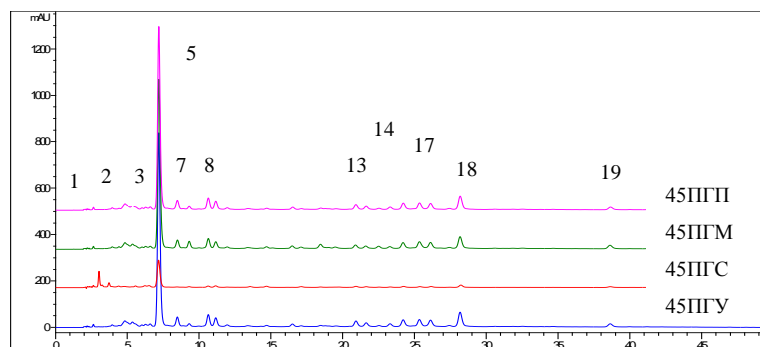
^{г)} - ПФ након чувања у 70Ет vs 80ПГ



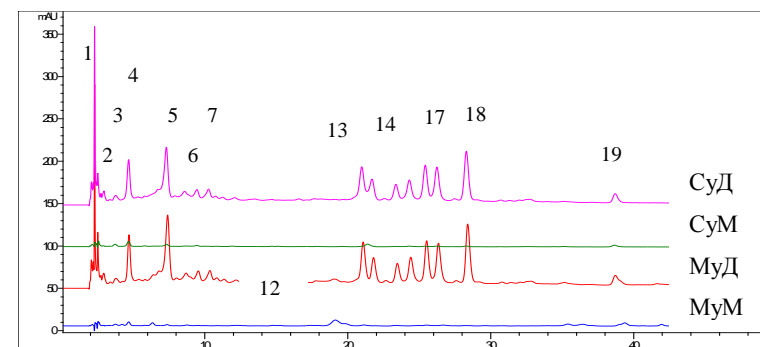
А - а) 70Ет - ЕПДЈ (260nm)



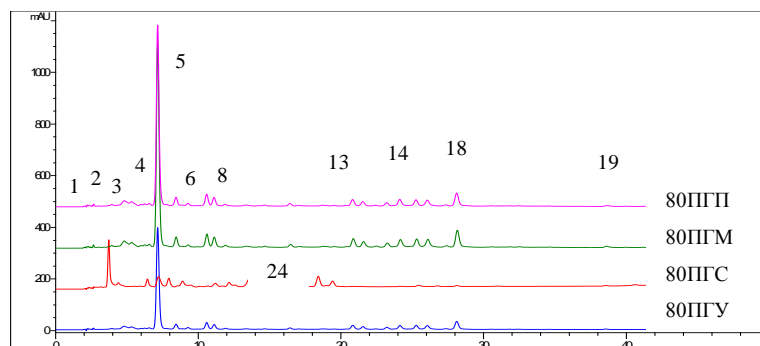
А - г) В - ЕПДЈ (325nm)



А - б) 45ПГ - ЕПДЈ (325nm)



А - д) Му и Су - ЕПДЈ - (260nm)



А - в) 80ПГ - ЕПДЈ (325nm)

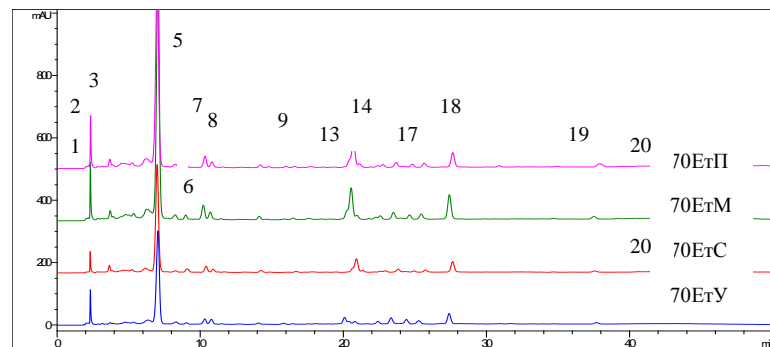
Слика 9. Хроматограми идентификованих ПФ једињења

(Табела 12 а) и б) у испитиваним ЕПДЈ

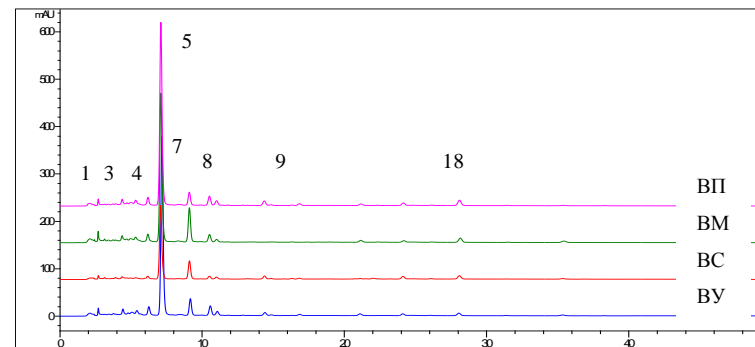
А - након израде и Б - након две године чувања

А - а) 70Ет-ЕПДЈ; А - б) 45ПГ-ЕПДЈ; А - в) 80ПГ-ЕПДЈ;

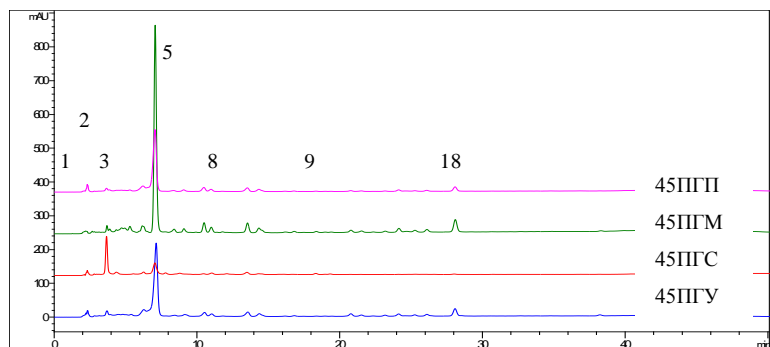
А - г) В-ЕПДЈ; А - д) уљани ЕПДЈ



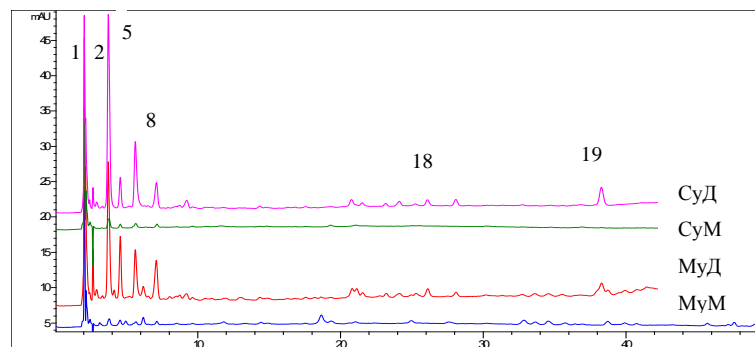
Б - а) 70Et - ЕПДЈ (260nm)



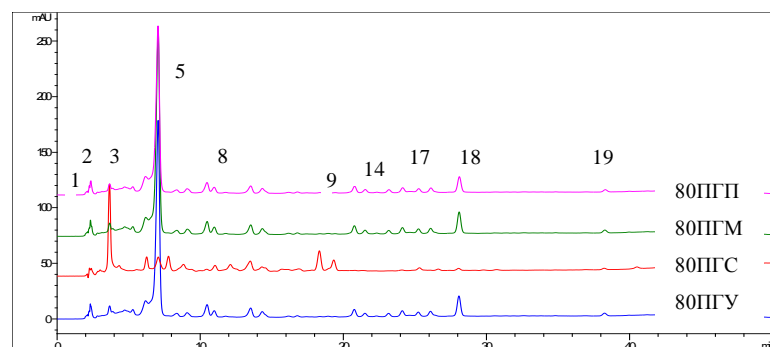
Б - г) ВУ - ЕПДЈ - (325nm)



Б - б) 45ПГ - ЕПДЈ (325nm)



Б - д) Му и Су - ЕПДЈ (260nm)



Б - в) 80ПГ - ЕПДЈ (325nm)

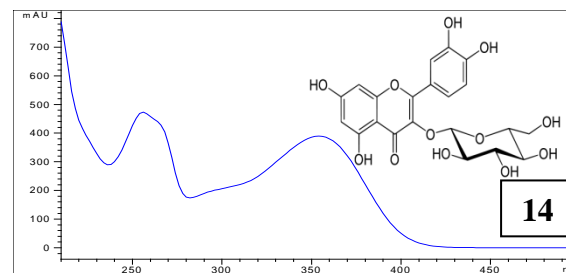
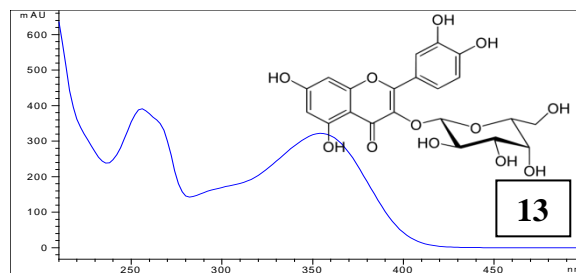
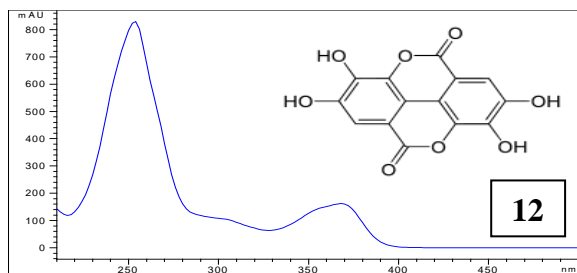
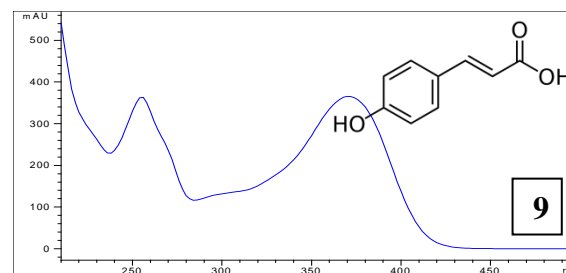
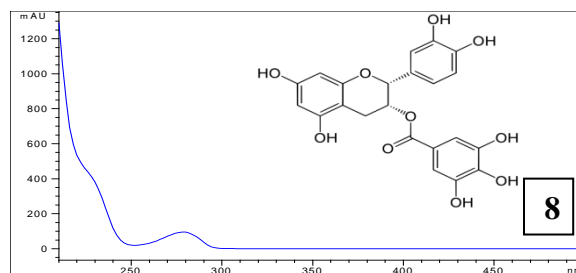
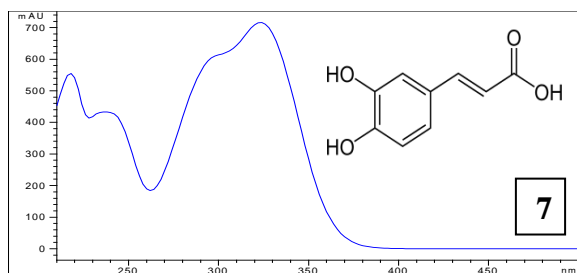
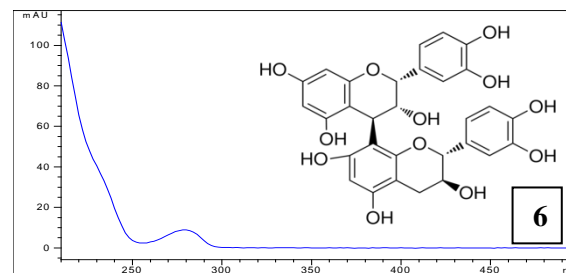
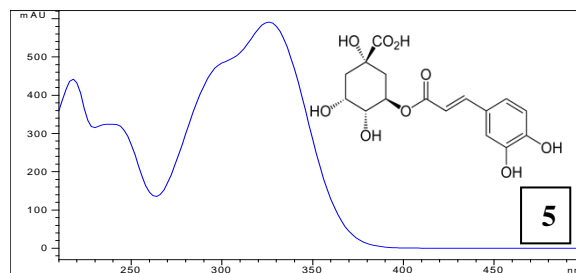
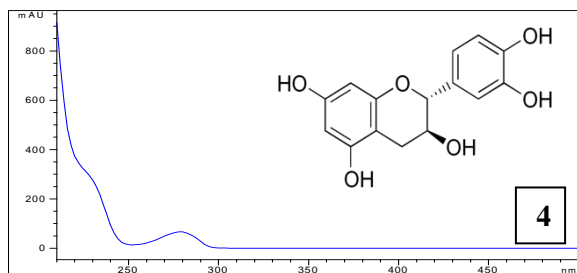
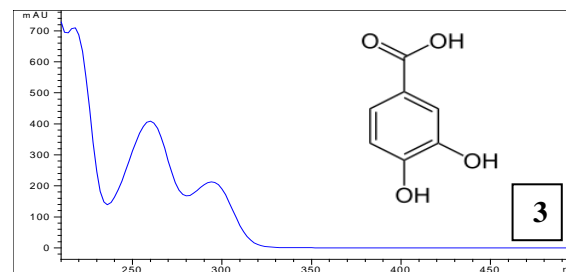
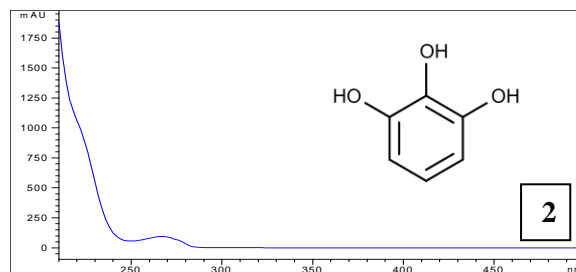
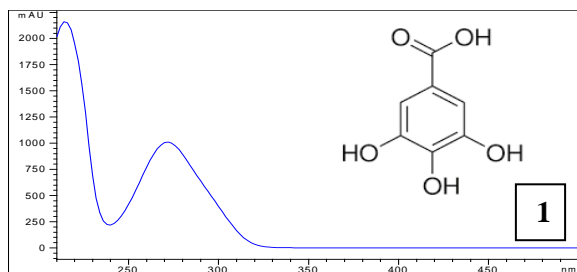
Хроматограми идентификованих ПФ једињења

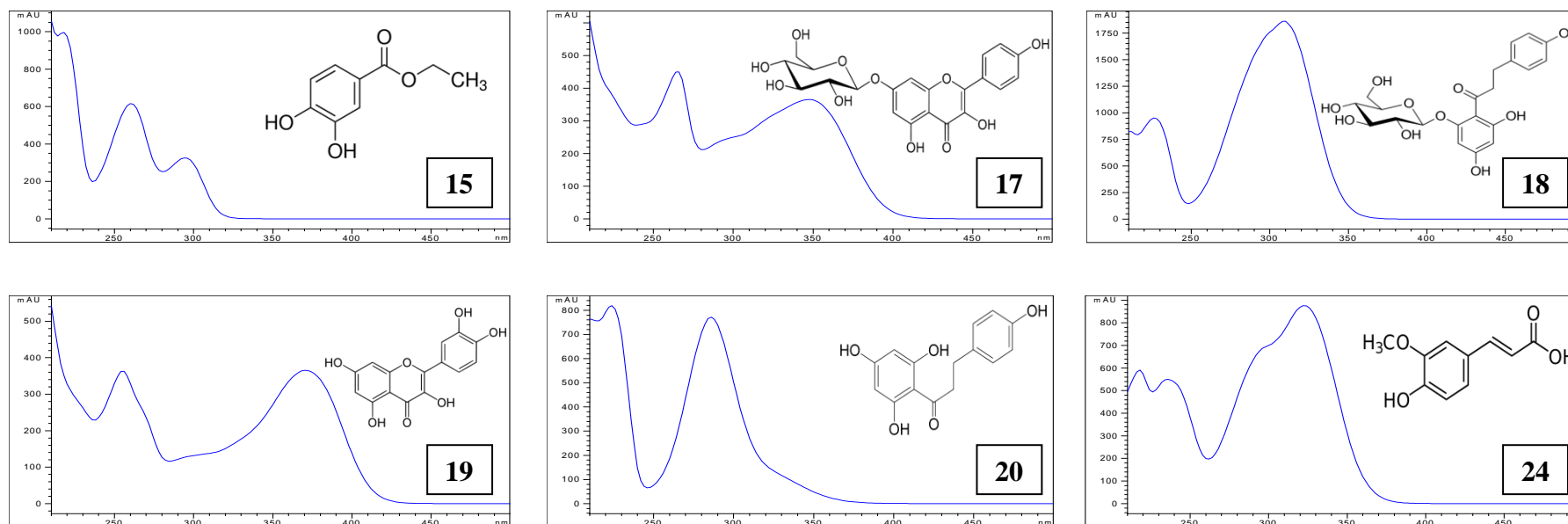
(Табела 12. б)) у испитиваним ЕПДЈ

Б - након две године чувања

Б - а) 70Et-ЕПДЈ; Б - б) 45ПГ-ЕПДЈ; Б - в) 80ПГ-ЕПДЈ;

Б - г) В-ЕПДЈ; Б - д) уљани ЕПДЈ





Слика 10. Спектри и структурне формуле идентификованих ПФ једињења у ЕПДЈ (Табела 12)

1 - гална киселина; 2 - пирогалол; 3 - протокатехинска киселина; 4 - катехин; 5 - хлорогенска киселина; 6 - процијанидин Б2; 7 - кафена киселина; 8 - епикатехин; 9 - *p*-кумарна киселина; 12 - елагинска киселина; 13 - хиперозид; 14 - изокверцетин; 15 - етил етар протокатехинске киселине; 17 - кемферол-3-*O*-глукозид; 18 - флоридзин; 19 - кверцетин; 20 - флоретин; 24 - ферулна киселина.

4.1.4.2. HPLC анализа и стандардизација садржаја ВК у ЕПДЈ

Плод дивље јабуке је добар извор природних органских киселина из групе α -хидрокси киселина (воћне киселине - ВК). Најчешће присутне ВК у ПДЈ су јабучна, лимунска, винска, ћилибарна, пирогрожђана, млечна, оксална, *L*-аскорбинска, хининска и бадемова киселина (Ма В и сар., 2015; Zhang и сар., 2010). Садржај ВК и њихове концентрације у ЕПДЈ након израде и након чувања у периоду од две године на температури од $22\pm 2^\circ\text{C}$ је приказан у Табели 13. Хроматограми детектованих ВК у екстрактима (70ЕтУ, 45ПГУ, ВУ и Суд - ЕПДЈ) са структурним формулама су дати на Слици 11.

У испитиваним ЕПДЈ одређене су следеће воћне киселине: лимунска киселина, јабучна, ћилибарна, винска, пирогрожђана и млечна киселина. *L*-аскорбинска, оксална, хининска и бадемова киселина нису детектоване ни у једном од испитиваних ЕПДЈ. Садржај детектованих ВК у израђеним ЕПДЈ био је различит у односу на примењени екстрагенс или методу екстракције (Табела 13).

Јабучна киселина је једна од најбитнијих ВК у ПДЈ. Она има специфичан (јак) укус (Ма В и сар., 2015; Tsao и сар., 2003; Ye и сар., 2014; Wojdylo и сар., 2008) који се одражава и на јачину укуса самог ПДЈ, као и продукта који садржи ПДЈ. Висока концентрација јабучне киселине може узроковати појачану киселост самог екстракта, сока, сирупа или било ког продукта који је садржи. Садржај јабучне киселине у испитиваним ЕПДЈ након израде износио је просечно $324,15 \text{ mg}/100\text{g}$ ЕПДЈ, што су показали и Ма В и сар. (2015), Tsao и сар. (2003) и Ye и сар. (2014). Највиши садржај ове киселине је показан у ЕПДЈ добијених методом ултразвучне екстракције и/или применом 70% етанола као екстрагенса. Концентрација ове ВК је, поред ћилибарне киселине, била највећа у испитиваним ЕПДЈ, у односу на концентрације осталих детектованих ВК. Ћилибарна киселина може настати и трансформацијом јабучне киселине. Израђени ЕПДЈ имали су највећи садржај управо ове киселине (у просеку $1862,93 \text{ mg}/100\text{g}$ ЕПДЈ) у односу на садржај осталих детектованих ВК. Садржај ћилибарне киселине је био око 6 пута већи у односу на садржај јабучне киселине, док је у односу на лимунску киселину био око 300 пута већи. У други аутори су показали висок садржај ћилибарне киселине, али не највиши у односу на остале испитиване ВК (Ма В и сар., 2015; Tsao и сар., 2003; Ye и сар., 2014). Врло низак садржај ћилибарне киселине је након израде показан у СуМ, и још нижи у МуМ, што се касније одразило и на ефикасност ових ЕПДЈ. Након чувања ова ВК није детектована у уљаним ЕПДЈ.

Лимунска киселина је такође детектована у ЕПДЈ. Она је врло битна као модификатор киселости ЕПДЈ. Концентрација ове киселине након израде је била најнижа у свим испитиваним ЕПДЈ (у просеку 6,34 mg/100g ЕПДЈ). Садржај ове киселине је био највиши у 70ЕтУ (22,76 mg/100g ЕПДЈ), док је најнижи био у 45ПГС (0,13 mg/100g ЕПДЈ) (Табела 12). Ниже концентрације у ЕПДЈ су након израде показане и за пирогрожђану киселину (просечно 48,99 mg/100g ЕПДЈ), која након чувања није детектована у неким уљаним ЕПДЈ (Табела 13). Просечни садржај винске киселине у испитиваним ЕПДЈ је након израде био око 96,78 mg/100g ЕПДЈ, док је садржај млечне киселине био око 129,33 mg/100g ЕПДЈ. Најбогатији винском киселином након израде су били В-ЕПДЈ (узорак ВУ са највећим садржајем од 250,45 mg/100g ЕПДЈ) (Табела 13). Садржај млечне киселине је био највећи у уљаним ЕПДЈ након израде, док у неким екстрактима након чувања ова ВК није детектована (Табела 13). Млечна киселина може настати и редукацијом пирогрожђане киселине или трансформацијом јабучне киселине, али је слабијег укуса и јачине у односу на јабучну киселину. Укупан садржај јабучне киселине, ћилибарне киселине и млечне киселине у испитиваним ЕПДЈ, као веома битних ВК у ПДЈ, је чинио преко 90% од укупног садржаја свих ВК детектованих у ЕПДЈ. Сличне резултате за садржај ВК у плоду јабуке су добили и Уе и сар. (2014) и Zucoloto и сар. (2015).

Табела 13. Квалитативни и квантитативни садржај ВК у ЕПДЈ након израде и након две године чувања на 22±2°C.

ЕПДЈ	Време	ВОЋНЕ КИСЕЛИНЕ (ВК)							Укупан садржај	
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.		
		лимунска	јабучна	ћилибарна	винска	пиро грожђана	млечна	*	mg ВК / 100g ЕПДЈ	mg/100g
Поларни екстрагенси ^{а)}										
70ЕтМ	израда	2,07	317,93	2228,90	44,01	60,45	377,09	-	3030,45 ^{б)}	3,03
	2 год.	1,75	301,96	2078,47	22,32	57,00	133,11	-	2594,61	2,59
70ЕтП	израда	3,29	346,76	2080,87	58,08	64,06	366,52	-	2919,58	2,92
	2 год.	2,49	290,05	963,65	26,85	55,09	165,55	-	1503,68	1,50
70ЕтС	израда	5,60	202,79	1732,10	28,21	46,41	30,17	-	2045,28	2,05
	2 год.	1,1	179,16	299,01	11,38	23,52	23,10	-	567,27	0,57
70ЕтУ	израда	22,76	561,82	3519,04	107,8	127,81	367,07	-	4706,30	4,71
	2 год.	1,91	314,63	2161,44	52,14	59,74	133,11	-	2722,97	2,72
45ПГМ	израда	3,31	429,15	1989,92	60,13	62,37	68,42	-	2613,30 ^{б)}	2,61
	2 год.	0,8	310,54	1551,30	19,01	43,80	11,48	-	1936,93	1,94

45ПГП	израда	3,16	471,32	1885,80	59,26	61,09	97,40	-	2578,03	2,58
	2 год.	0,19	261,76	1174,04	10,37	29,56	67,73	-	1543,65	1,54
45ПГС	израда	0,13	201,18	742,09	32,54	8,98	4,52	-	989,44	0,99
	2 год.	0,12	64,68	360,35	5,67	6,48	-	-	437,30	0,44
45ПГУ	израда	5,41	488,22	2018,94	63,38	63,84	133,22	-	2773,01	2,77
	2 год.	3,08	310,61	462,38	17,26	23,5	73,43	-	890,26	0,89
80ПГМ	израда	1,55	578,05	2374,73	55,00	55,14	70,02	-	3134,49 ^{б)}	3,13
	2 год.	0,35	187,91	921,06	10,88	17,85	67,53	-	1205,58	1,21
80ПГП	израда	1,26	566,19	2283,80	51,17	51,4	66,65	-	3020,47	3,02
	2 год.	0,26	241,16	1080,06	13,64	20,48	53,75	-	1409,35	1,41
80ПГС	израда	1,11	35,32	292,45	32,49	16,23	116,17	-	493,77	0,49
	2 год.	0,54	28,44	183,21	21,96	7,14	46,26	-	287,55	0,29
80ПГУ	израда	0,53	212,40	1660,67	23,78	55,29	66,47	-	2019,14	2,02
	2 год.	0,32	3,99	1072,28	13,47	20,06	-	-	1110,12	1,11
ВМ	израда	8,55	333,69	3595,75	223,92	60,15	72,71	-	4294,77 ^{б)}	4,29
	2 год.	3,58	252,76	2574,04	68,55	58,59	22,97	-	2980,49	2,98
ВП	израда	11,40	257,50	3236,05	125,78	55,32	70,59	-	3756,64	3,76
	2 год.	2,23	201,41	1646,32	24,58	47,37	42,48	-	1964,39	1,96
ВС	израда	9,16	368,96	1693,41	87,02	55,75	28,80	-	2243,10	2,24
	2 год.	1,39	162,85	1057,21	33,35	44,93	5,03	-	1304,76	1,30
ВУ	израда	3,67	502,41	2312,35	250,45	55,68	71,82	-	3196,38	3,20
	2 год.	2,97	207,78	2292,82	60,02	46,15	48,37	-	2658,11	2,66
Неполарни екстрагенси										
МуМ	израда	13,26	149,04	28,07	86,15	0,64	48,55	-	325,71	0,33
	2 год.	0,06	12,95	-	-	-	-	-	13,01	0,01
Муд	израда	10,38	89,64	1679,76	279,15	41,89	229,75	-	2330,57 ^{б)}	2,33
	2 год.	0,25	23,99	285,39	21,14	-	-	-	330,77	0,33
СуМ	израда	9,25	75,81	71,34	42,31	1,63	80,91	-	281,25	0,28
	2 год.	0,07	18,96	-	-	-	-	-	19,03	0,02
Суд	израда	10,88	294,80	1832,56	224,93	35,76	219,83	-	2618,76 ^{б)}	2,62
	2 год.	0,13	95,54	209,98	17,63	1,24	66,47	-	390,99	0,39
Просечан садржај mg/100g	израда	6,34	324,15	1862,93	96,78	48,99	129,33	-	2468,52	2,47
	2 год.	1,18	173,56	1018,65	22,51	28,13	48,02	-	1292,04	1,29

* оксална, L-аскорбинска, хининска и бадемова киселина - у истраживању је анализиран и садржај ових ВК, али оне нису детектоване ни у једном испитиваном ЕПДЈ, ни након израде ни након чувања, па нису појединачно приказане у Табели 13.

Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

а) - ВК у ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима vs неполарним

б) - ВК у ЕПДЈ добијених мацерацијом vs Soxhlet методом

в) - ВК у ЕПДЈ добијених дигестијом vs мацерацијом уљем

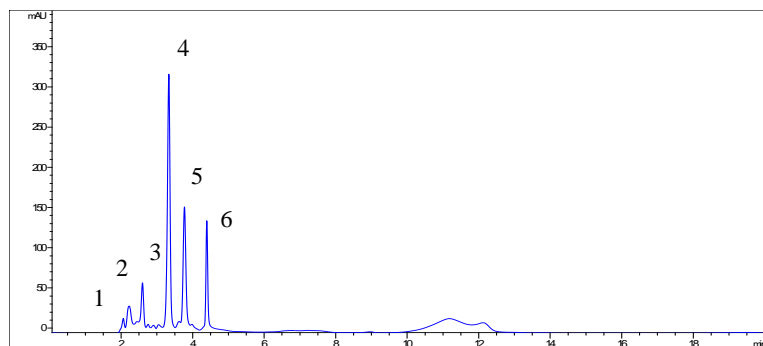
Тип примењеног поларног екстрагенса није значајно утицао на укупан садржај ВК у екстрактима. Ипак, може се рећи да су 70Ет-ЕПДЈ (просечно око 3,18%) и В-ЕПДЈ (просечно око 3,35%) показали најбољи садржај ВК након израде, док су 80ПГ-ЕПДЈ показали најнижи садржај (просечно око 2,17%). Узорак 70ЕтУ је показао највећи укупан садржај ВК након израде (4,71%) у односу на остале испитиване екстракте, затим узорак ВМ (4,29%), док је узорак 80ПГС имао најнижи садржај (0,49%). Тип примењене методе екстракције је утицао на укупан садржај ВК у испитиваним ЕПДЈ. ЕПДЈ добијени мацерацијом су показали знатно бољи садржај ВК у односу на ЕПДЈ добијених Soxhlet екстракцијом. Ултразвучном екстракцијом и мацерацијом су добијени ЕПДЈ који су показали највећи садржај ВК након израде (4,71% за 70ЕтУ и 4,29% за ВМ), док је Soxhlet метода била најнепогоднија метода за екстракцију ВК из ЕПДЈ (укупан садржај ВК након израде је био 0,49% у 80ПГС). Дobar садржај ВК у екстрактима ПДЈ добијеним ултразвучном екстракцијом је показан и раније (Stojiljković и сар., 2018). Уљани екстракти добијени дигестијом као екстракционом методом су након израде показали знатно бољи укупан садржај ВК (до 10 пута веће) у односу на ЕПДЈ добијене мацерацијом са уљем. Најнижи садржај ВК након израде је показан у СуМ (281,25 mg/100g ЕПДЈ) (Табела 13).

Укупан садржај свих детектованих ВК у испитиваним ЕПДЈ након израде се кретао од 281,25 mg/100g ЕПДЈ до 4706,30 mg/100g ЕПДЈ, тј. процентуални садржај свих ВК након израде се кретао у распону од 0,28% за СуМ до 4,71% за 70ЕтУ. Просечна вредност садржаја ВК у ЕПДЈ је била 2,47%. С тим што је значајно виши садржај ВК након израде показан у ЕПДЈ добијеним поларним екстрагенсима (просечан садржај након израде је био око 2,74%) у односу на садржај у ЕПДЈ добијеним уљаним екстрагенсима (просечан садржај је био око 1,39%).

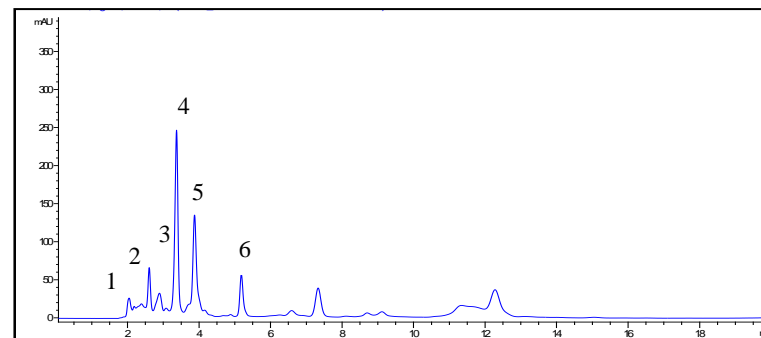
Након чувања (две године заштићено од светлости на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$) детектоване су исте ВК (лимонска, јабучна, ћилибарна, винска, пирогрожђана и млечна киселина) у испитиваним ЕПДЈ, али је концентрација ових киселина била нижа него након израде. Након две године садржај ћилибарне киселине у односу на садржај осталих ВК у ЕПДЈ је био највећи, затим садржај јабучне и млечне киселине, а лимонска киселина је била у најнижој концентрацији (Табела 13). Укупан садржај ВК у ЕПДЈ након чувања се кретао од 13,01 mg/100g ЕПДЈ за МуМ до 2980,49 mg/100g ЕПДЈ за ВМ, 2722,97 mg/100g ЕПДЈ за 70ЕтУ и 2658,11 mg/100g ЕПДЈ за ВУ (Табела 13). Највећи садржај ВК и након чувања је показан у етанолним и воденим ЕПДЈ у односу на садржај у осталим екстрактима, док је код уљаних екстраката показан

најнижи садржај. Укупан процентуални садржај ВК у свим ЕПДЈ након чувања (1,29 %) је био скоро два пута нижи у односу на садржај након израде (2,47%), што свакако представља значајан пад, али је садржај ВК од око 1,3% и даље био висок. До већег пада у садржају након чувања екстраката дошло је код уљаних ЕПДЈ (просечан укупан садржај након израде у уљаним ЕПДЈ је био 1,39%, а након чувања 0,19%), док је код ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима просечан садржај након израде био 2,74%, а након чувања 1,57%.

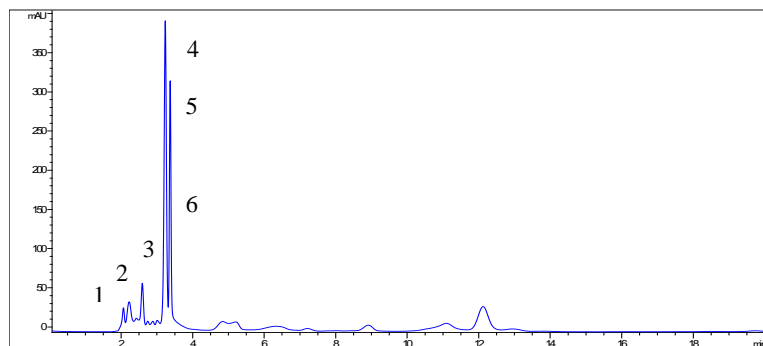
Просечан процентуални садржај након израде свих детектованих ВК у испитиваним ЕПДЈ је био 2,47%, с тим што је просечан садржај за ЕПДЈ добијене поларним екстрагенсима био 2,74%, а неполарним екстрагенсима 1,39%. Резултати садржаја ВК у испитиваним ЕПДЈ добијени и након израде и након чувања, указују да би ЕПДЈ добијени било којом методом екстракције или било којим поларним екстрагенсом могли, генерално, да се у пракси користе као стандардизовани ЕПДЈ са укупним садржајем ВК у концентрацији од минимум 2,5%, док екстракти добијени уљаним екстрагенсима са стандардизованим садржајем ВК од минимум 1%. За поједине ЕПДЈ је показан бољи садржај ВК од просечног садржаја и након израде и након чувања, па би они потенцијално могли да се користе као стандардизовани ЕПДЈ са већим садржајем детектованих ВК. ЕПДЈ добијени ултразвучном екстракцијом и етанолом (70EtУ) и водом (ВУ) (Stojiljković и сар., 2018) као екстрагенсима би потенцијално могли да се користе са стандардизованом концентрацијом ВК од минимум 4%, док би уљани екстракти добијени методом дигестије могли да се користе као стандардизовани ЕПДЈ са концентрацијом ВК од минимум 2%.



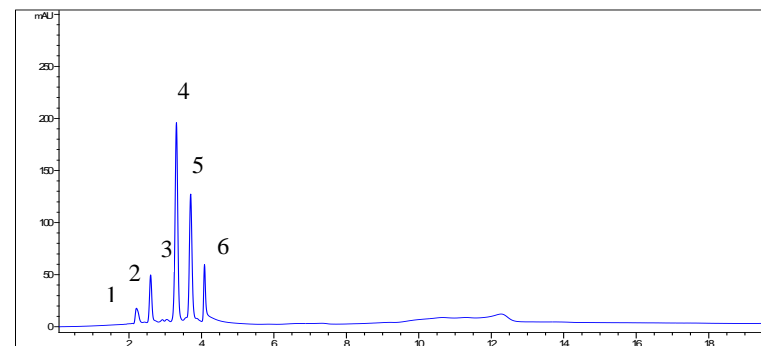
А - а) 70ЕтУ-ЕПДЈ након израде (220nm)



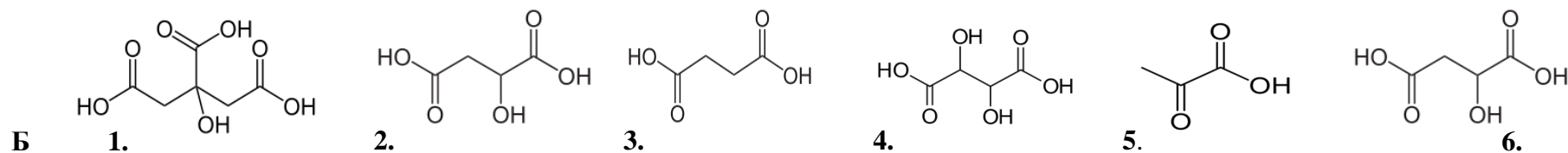
А - в) 80ПГУ-ЕПДЈ након израде (220nm)



А - б) 45ПГУ-ЕПДЈ након израде (220nm)



А - г) Суд-ЕПДЈ након израде (220nm)



Слика 11. А - Хроматограми идентификованих ВК након израде на 220 nm из Табеле 13. у а) 70ЕтУ, б) 45ПГУ, в) ВУ, г) Суд ;

Б - структурне формуле идентификованих ВК 1. лимунска, 2. јабучна, 3. ћилибарна, 4. винска, 5. пирогрожђана, 6. млечна киселина

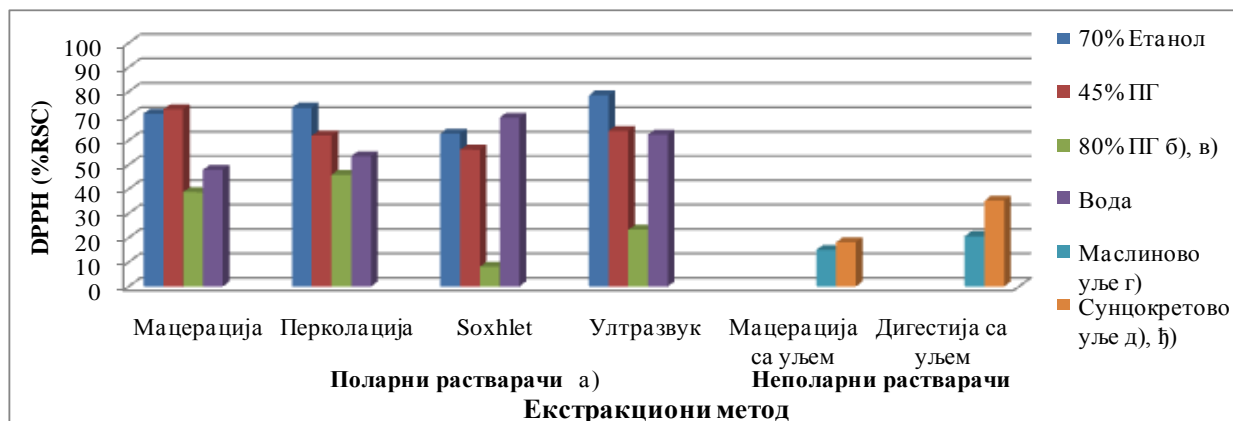
4.1.5. Анализа *in vitro* испитивања антиоксидативне активности ЕПДЈ

Испитивање антиоксидативног потенцијала ЕПДЈ спроведено је у циљу процене могућности њихове примене као антиоксидативних активних супстанци, имајући у виду да се антиоксидативни суплементи у исхрани и антиоксидативни (дермо)козметички производи могу користити у превенцији и/или третману многих болести изазваних деловањем слободних радикала (Lesjak и сар., 2011). У сложеним системима, као што су природни биљни екстракти, са различитим ПФ компонентама и ВК, корисно је упоредно испитивање АА применом различитих антиоксидативних метода (Milutinović и сар., 2013). Сходно томе, АА течних ЕПДЈ је испитивана DPPH методом, FRAP методом и тиоцијанатном методом помоћу линолне киселине. Испитивањем способности „хватања“ слободних радикала DPPH методом се одређује капацитет биоактивних супстанци из ЕПДЈ да реагују са DPPH радикалом дозирањем хидроген јона чиме обезбеђују стабилан крајњи производ и прекидају оксидативни ланац. Заснован је на праћењу трансформације стабилног DPPH радикала љубичасте боје у редуковану жуту форму DPPH-H (Carbone и сар., 2011; Milutinović и сар., 2013). FRAP методом се одређује укупна антиоксидативна активност ЕПДЈ, а заснована је на преносу електрона, чиме се капацитет антиоксиданаса да редукују присутне оксидативне супстанце прати променом боје. При ниској рН вредности, долази до редукције фери-2,4,6-трипиридил-с-триазин комплекса (енг. *ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine* [Fe^{3+} -TPTZ]) у феро-2,4,6-трипиридил-с-триазин комплекс (енг. *ferrous-2,4,6-tripyridyl-s-triazine* [Fe^{2+} -TPTZ]) комплекс, који има интензивно плаву боју. За разлику од инхибиције DPPH радикала, методе која је погоднија за антиоксидансе растворљиве у поларним екстрагенсима (етанол), FRAP метода се чешће користи за одређивање антиоксидативних својстава хидросолубилних антиоксиданаса (водени екстрагенси). Тест са линолном киселином је погоднији за процену способности превенције липидне пероксидације, и он се углавном комбинује са DPPH методом; овај метод би требало да буде најпогоднији за уљане екстракте. Резултати DPPH теста су приказани као %RSC (енг. *Radical Scavenging Capacity*), FRAP теста као FRAP вредност, тј. mM Fe^{2+} , и теста са линолном киселином као %AOA (енг. *AntiOxidant Activity*) (Графикон 3).

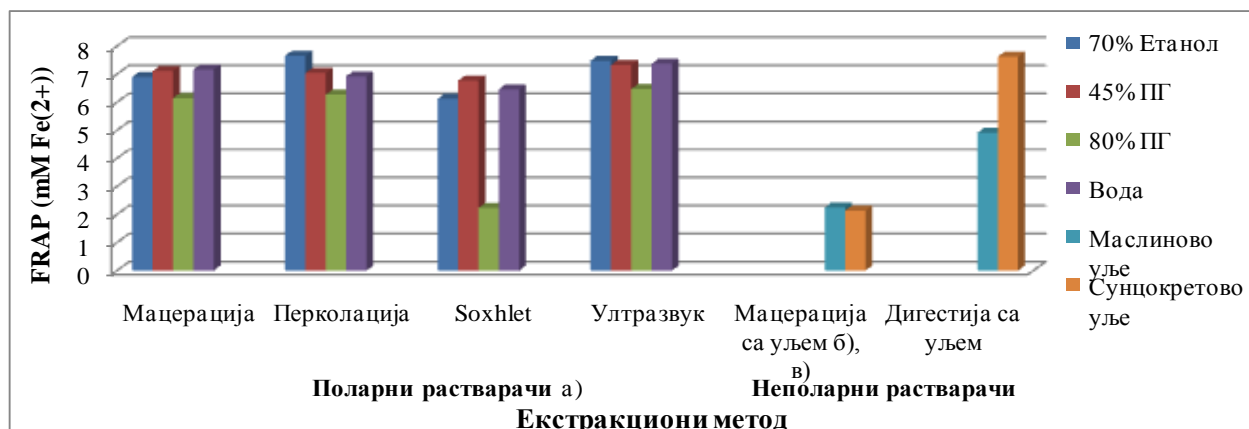
Вредности за %RSC испитиваних течних ЕПДЈ (Д:Е = 1:5) су се кретале у распону од 8,12 %RSC (за 80ПГС) до 78,43 %RSC (за 70ЕтУ) (Графикон 3 а)). Најнижа FRAP вредност је показана за узорак СуМ (2,13 mM Fe^{2+}), док је највиша показана за 70ЕтП (7,65 mM Fe^{2+}) (Графикон 3 б)). За узорак 70ЕтУ је показана најбоља

способност за превенцију липидне пероксидације (95,32 %АОА), као и најбоља способност за „хватање“ радикала, док је најнижа способност за превенцију липидне пероксидације показана за узорак 45ПГС (57,73 %АОА). Сличне резултате за АА за ПДЈ испитивану методом са линолном киселином су добили и Amzad Hossain и сар. (2009) (62,82–92,34 %АОА). Уљани екстракти су показали најбољу АА применом теста са линолном киселином у односу на друга два теста, с обзиром да сама уља показују бољи афинитет за спречавање липидне пероксидације (Графикон 3 в)). Дobar антиоксидативни потенцијал ПДЈ су показали и Maria John и сар. (2014) испитивањем АА метанолних ЕПДЈ (89,27 %RSC) који су у поређењу са екстрактима култивисане сорте јабуке показали боље вредности за АА. Sekic и Ozgen (2010) и Kubola и сар. (2011) су такође показали бољу антиоксидативну активност дивљих сорти воћа у односу на култивисане сорте.

Као контрола у испитивању способности неутрализације слободних радикала (DPPH тест) коришћен је ВНТ у концентрацијама од 0,08, 0,2 и 1,0 mg/ml који је показао незнатно боље %RSC вредности (51,2 %RSC, 85,46 %RSC и 95 %RSC, респективно (резултати нису приказани ни табеларно ни графички)) у односу на испитиване ЕПДЈ (8,12 %RSC до 78,43 %RSC). %RSC вредности за 70Ет-ЕПДЈ, 45ПГП-ЕПДЈ и В-ЕПДЈ (Графикон 3) су биле приближне вредностима контролног раствора ВНТ, што може указати на добар антиоксидативни потенцијал ових ЕПДЈ у смислу способности „хватања“ слободних радикала. Етанолни раствор α -токоферола, као референтни антиоксиданс у тесту са линолном киселином, је испољио незнатно већу способност инхибиције липидне пероксидације (степен инхибиције био је 64 %АОА до 98 %АОА (резултати нису приказани ни табеларно ни графички)) у односу на ЕПДЈ (57,73 %АОА до 95,32 %АОА), што може указати на добар антиоксидативни потенцијал испитиваних ЕПДЈ у смислу инхибиције липидне пероксидације.



- а) а) - %RSC за ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима vs неполарним
 б) - %RSC за 80ПГ-ЕПДЈ vs 70Ет и 45ПГ-ЕПДЈ
 в) - %RSC за 80ПГ-ЕПДЈ vs В-ЕПДЈ
 г) - %RSC за Му-ЕПДЈ vs 70Ет, 45ПГ и В-ЕПДЈ
 д) - %RSC за Су-ЕПДЈ vs 70Ет-ЕПДЈ
 е) - %RSC за Су-ЕПДЈ vs 45ПГ и В-ЕПДЈ



- б) а) - mM Fe²⁺ за ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима vs неполарним
 б) - mM Fe²⁺ за ЕПДЈ добијени мацерацијом са уљем vs мацерацијом, перколацијом, ултразвуком
 в) - mM Fe²⁺ ЕПДЈ добијени мацерацијом са уљем vs дигестијом са уљем



- в) а) - %AOA за ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима vs неполарним

Графикон 3. Антиоксидативна активност ЕПДЈ: а) DPPH тест (%RSC); б) FRAP тест (mM Fe²⁺); в) тест са линолном киселином (%AOA). Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест.

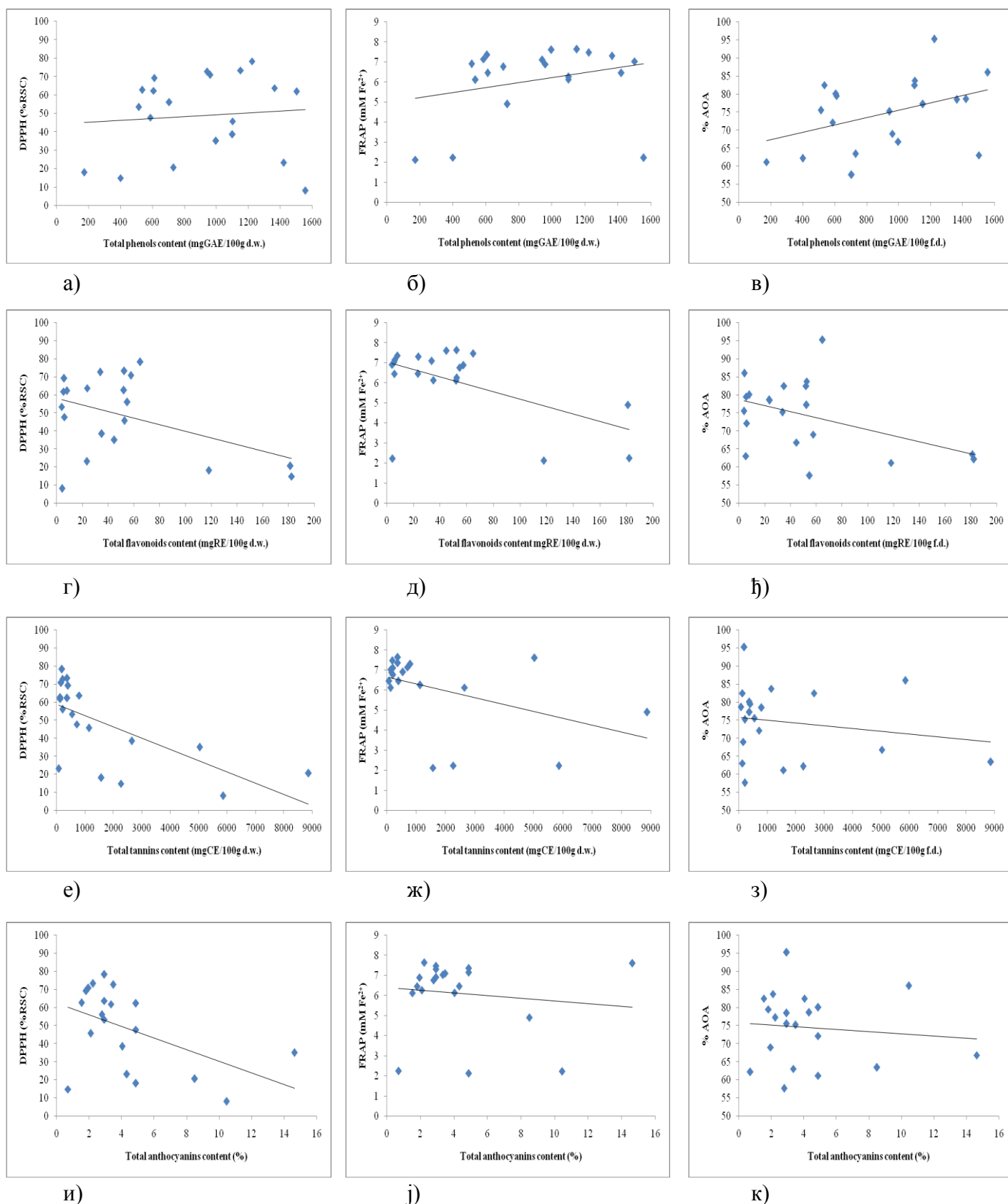
Значајна разлика није постојала између АА екстраката добијених применом поларних екстрагенаса у односу на примењену методу (Графикон 3). Ипак, ултразвучна екстракција је била најбоља метода, јер су екстракти израђени овом методом показали највише вредности за АА у односу на екстракте израђене осталим методама, а применом истог екстрагенаса. Предност ове екстракционе методе је била боља пенетрација средства за екстракцију у биљни материјал, ниска температура екстракције, смањено време екстракције, док је мацерација као конвенционална метода била једноставнија и економичнија. Мацерацијом су добијени ЕПДЈ који су такође показали добре резултате за АА (Графикон 3). Sekic и Ozgen (2010) и Kubola и сар. (2011) су показали да је мацерација била најбољи метод за екстракцију активних супстанци и добијање екстраката са највишим антиоксидативним потенцијалом. Значајна разлика је постојала применом FRAP методе између АА ЕПДЈ добијених мацерацијом са уљем у односу на АА ЕПДЈ добијених поларним екстрагенсима и мацерацијом, перколацијом и ултразвуком, као и у односу на дигестију са уљем. Мацерација уљем је дала ЕПДЈ са најслабијим антиоксидативним потенцијалом (Графикон 3 б)). Значајна разлика у АА, одређеној применом других метода, за различите ЕПДЈ у односу на методу екстракције није постојала (Графикон 3 а) и в)).

Поређењем АА испитиваних ЕПДЈ у односу на коришћени екстрагенс, показано је (применом сва три теста) да су ЕПДЈ добијени применом поларних екстрагенаса показали значајно бољу АА у односу на екстракте добијене помоћу неполарних екстрагенаса (Графикон 3). Му-ЕПДЈ су показали значајно ниже вредности за %RSC у односу на 70Ет-ЕПДЈ, 45ПГ-ЕПДЈ и В-ЕПДЈ, док је сунцокретоно уље било мало бољи екстракциони медијум, али и даље са значајно слабијим резултатима за %RSC вредности у односу на 70Ет-ЕПДЈ и 45ПГ-ЕПДЈ и В-ЕПДЈ. Поређењем АА у оквиру поларних екстрагенаса, ЕПДЈ добијени помоћу 80% ПГ као средства за екстракцију су имали значајно ниже вредности за %RSC (DPPH тест) у односу на екстракте добијене осталим екстрагенсима (Графикон 3 а)). Није постојала значајна разлика у АА испитиваних екстраката добијених поларним екстрагенсима, применом FRAP теста и теста са линолном киселином (Графикон 3 б) и в)). ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима су генерално показали бољу АА у односу на ЕПДЈ добијене неполарним екстрагенсима (Графикон 3).

Етанолни екстракти су показали добар садржај ПФ једињења и ови екстракти су показали најбољу *in vitro* АА применом сва три теста (као најбољи: 70ЕтУ - %RSC = 78,43%, %АОА = 95,32% и mM Fe²⁺ = 7,48) (Stojiljković и сар., 2016а)).

Пропиленгликолни екстракти су показали добар садржај ПФ једињења и веома добру АА у односу на садржај ПФ једињења (45ПГ-ЕПДЈ су показали најбољу АА применом DPPH и FRAP тестова, а 80ПГ-ЕПДЈ екстракти применом теста са линолном киселином). В-ЕПДЈ су показали добар садржај ПФ једињења, као и АА (много бољу кроз тест са линолном киселином у односу на друга два теста, што иде у прилог води као екстрагенсу биоактивних супстанци, а тиме и воденим екстрактима, с обзиром да се вода сматра најбезбеднијом, најекономичнијом и погодном и за оралну и за локалну примену). Ултразвук је побољшао ефикасност екстракције антиоксиданаса, што је допринело бољим антиоксидативним својствима водених екстраката (ВУ - %RSC = 62,37%, $mMFe^{2+}$ = 7,37, %АОА = 80,14%) (Графикон 3). Уљани екстракти су показали добар садржај биоактивних ПФ једињења, али су показали најнижу АА у односу на екстракте добијене поларним екстрагенсима (најбоља АА је показана применом теста са линолном киселином и %АОА се кретала од 62,21% до 66,88 %АОА). Такође, примена 96% етанола приликом примене дигестије као екстракционе методе, је побољшала АА уљаних екстраката (посебно за СуД) одређену применом сва три антиоксидативна теста (до два пута више применом DPPH теста и три пута више применом FRAP теста) (Stojiljković и сар., 2016а); 2016в)). АА уљаних екстраката је, ипак, била нижа у односу на екстракте израђене применом поларних екстрагенаса, упркос високом садржају укупних флавоноида, танина и антоцијана (Графикон 3). Ово може бити и због ниског укупног садржаја фенола, имајући у виду да феноли чине највећу групу ПФ једињења (Stojiljković и сар., 2016а)). Друго објашњење може бити да уља могу добро да екстрахују ПФ једињења (Arsić и сар., 2014; 2011; 2010; Perricone, 2001), али могуће је да, након екстракције, уља на неки начин вежу антиоксидативна једињења, вероватно услед присуства незасићених масних киселина (Aburjai и Natsheh, 2003; Arsić и сар., 2014; 2011; 2010; Prottey, 1976), па не могу лако да их ослободе и ПФ једињења не могу да искажу своју потпуну АА. Применом дигестије добијени су екстракти са већим садржајем антиоксидативних једињења и боље АА у односу на мацерацију са уљем, али са мањом АА у односу на екстракте добијене применом поларних екстрагенаса, вероватно из истог разлога као код екстраката добијених применом мацерације са уљем (Stojiljković и сар., 2016в)).

Примењено средство за екстракцију и садржај ПФ једињења је утицао на АА испитиваних ЕПДЈ. Разлика у АА коју су испитивани ЕПДЈ показали, може бити условљена методолошки различитим антиоксидативним тестовима. Корелација између АА екстраката и главних ПФ једињења је приказана у Табели 14. и на Графикону 4.



Графикон 4. Корелација између: а)ТРС и %RSC, б)ТРС и mM Fe²⁺, в)ТРС и %AOA; г)ТФС и %RSC, д)ТФС и mM Fe²⁺, ђ)ТФС и %AOA; е)ТТ и %RSC; ж)ТТ и mM Fe²⁺, з)ТТ и %AOA; и)ТА и %RSC, ј)ТА и mM Fe²⁺, к)ТА и %AOA у испитиваним ЕПДЈ. Линеарна регресија и корелација су анализирани помоћу MS-Windows software (Excel, 2007).

Табела 14. Корелација између АА и главних ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ

ПФ једињења	Метод	R	Регресиона формула	*P
ТРС	DPPH	0,0914	$y^a = 0,0051x^d + 44,2222$	0,70156
	FRAP	0,2703	$y^b = 0,0012x^d + 4,9895$	0,24901
	Лиолна тест	0,4073	$y^c = 0,0101x^d + 65,3061$	0,07469
ТФС	DPPH	0,4394	$y^a = -0,1834x^e + 58,1576$	0,05257
	FRAP	0,5433	$y^b = -0,0185x^e + 7,0492$	0,01330
	Лиолна тест	0,4527	$y^c = -0,0840x^e + 78,8109$	0,04502
ТТ	DPPH	0,6659	$y^a = -0,0062x^f + 58,7554$	0,00135
	FRAP	0,4512	$y^b = 0,0003x^f + 6,6607$	0,04584
	Лиолна тест	0,1819	$y^c = -0,007x^f + 75,7669$	0,44280
ТА	DPPH	0,4903	$y^a = -3,2316x^g + 62,6796$	0,02817
	FRAP	0,1221	$y^b = -0,0656x^g + 6,3962$	0,60799
	Лиолна тест	0,1046	$y^c = -0,3066x^g + 75,8775$	0,66060

Линеарна регресиона анализа и корелациони коефицијент између две варијабле (укупан садржај ПФ једињења у ЕПДЈ и антиоксидативна активност ЕПДЈ) су одређени коришћењем програма MS-Windows software (Excel, 2007).

*P - статистичка значајност (*P<0,05)

^a у - Капацитет „хватања“ радикала - (% RSC),

^b у – Вредност укупне антиоксидативне активности - (mM Fe²⁺),

^c у - Антиоксидативна активност одређена лиолном кис. - (% AOA),

^d x – укупан садржај фенола (ТРС) - (mg ГКЕ/100g с.д.),

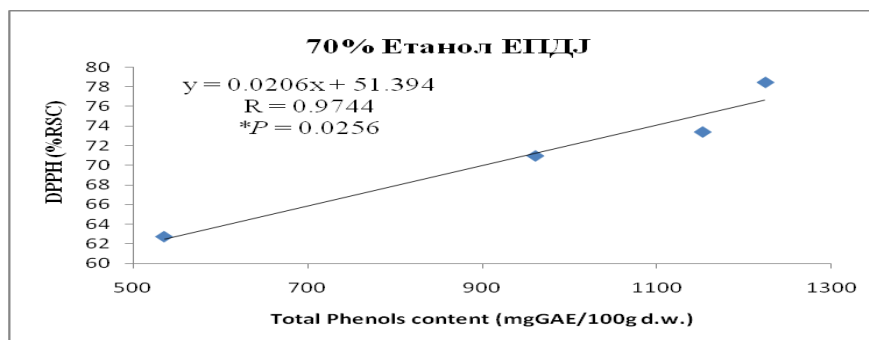
^e x – укупан садржај флавоноида (ТФС) - (mg PE/100g с.д.),

^f x – укупан садржај танина (ТТ) - (mg KE/100g с.д.),

^g x – укупан садржај антоцијана (ТА) - (%)

АА испитиваних ЕПДЈ је углавном пропорционално била већа у екстрактима са већим садржајем ПФ једињења. Значајна корелација између АА и садржаја ПФ једињења постоји код већине екстраката (R>0,4). Најбоља линеарност је показана између укупног садржаја танина у ЕПДЈ и %RSC (R=0,6659), као и укупног садржаја флавоноида и %RSC (R=0,4394) у DPPH тесту и mM Fe²⁺ (R=0,5433) у FRAP тесту (Табела 14; Графикон 4). Међутим, ниска линеарна корелација (R<0,4) је показана између садржаја фенола и АА, али без значајности (Табела 14; Графикон 4 а), б) и в)). Једно од објашњења за високу АА у односу на нижи садржај укупних фенола може бити и присуство других редукујућих једињења, као што су шећери, аминокиселине и аскорбинска киселина, која могу да реагују са реагенсом из примењене методе (Almeida и сар., 2008; Georgé и сар., 2005). Због тога је, линеарна корелација између ТРС и АА испитиваних ЕПДЈ одређене применом DPPH теста испитана додатно само код 70Ет-ЕПДЈ, који су генерално показали најбољу АА. Упоредивањем %RSC у

зависности од садржаја фенола у 70Ет-ЕПДЈ је показана веома висока значајна корелација, чак $R=0,9744$, при чему је тиме показана директна зависност АА од садржаја фенола у ЕПДЈ (Графикон 5).

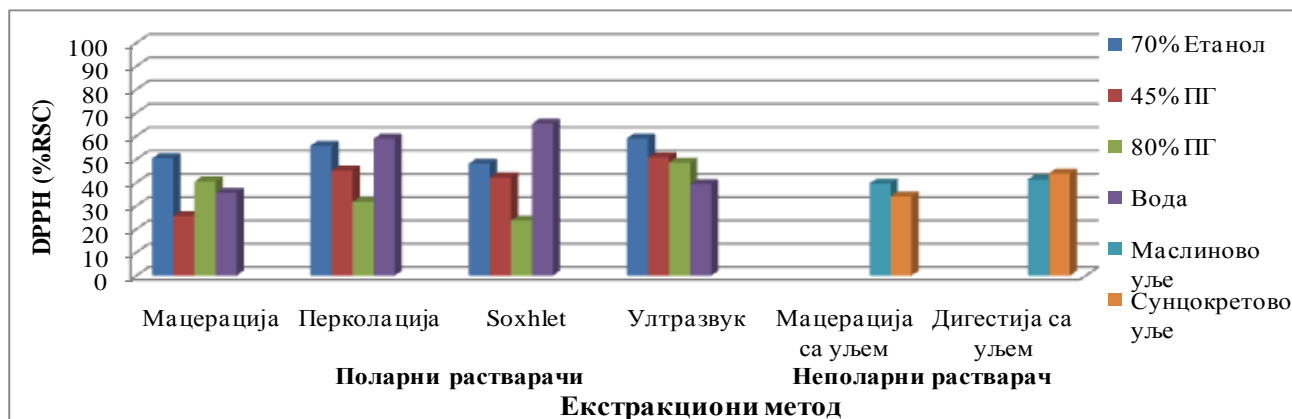


Графикон 5. Корелација између TPC и %RSC у испитиваним 70Ет-ЕПДЈ. Резултати су анализирани коришћењем програма MS-Windows software (Excel, 2007).

Укупан садржај танина је био у корелацији са АА, што је показано и у студијама других истраживача са нашег региона (Žugić и сар., 2014). Добијени резултати за укупан садржај флавоноида у ЕПДЈ показали су добру корелацију између TFC и АА испитиваних ЕПДЈ. Није било корелације између укупног садржаја фенола са АА испитиваних ЕПДЈ. Ниске вредности корелације између TPC и %RSC ($R=0,2076$) и mM Fe^{2+} ($R=0,0245$) применом FRAP теста су показали и други аутори (Iqbal и сар., 2012; Žugić и сар., 2014) док су објављени резултати за TPC од аутора Kunradi Vieira и сар. (2011), показали значајну корелацију између садржаја ПФ једињења и АА ($R=0,8468$), на шта су указали и други аутори (McGhie и сар., 2005).

Разлика у садржају ПФ једињења и АА израђених ЕПДЈ је вероватно последица примене различитих средстава и поступака за екстракцију активних супстанци. Екстракти добијени ултразвучном екстракцијом су показали најбоље резултате за АА применом 70% етанола као екстрагенса и веома добре резултате применом пречишћене воде као екстрагенса. Добијени резултати могу указати на потенцијалну примену формулисаних емулзија са ЕПДЈ као антиоксидативних (дермо)козметичких производа у превенцији и третману промена и/или болести на кожи узрокованих ОС.

Анализа АА испитиваних ЕПДЈ применом DPPH теста након 180 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}C$ је показала да су ЕПДЈ и даље имали добру и очувану АА, иако мању у односу на АА измерену одмах након израде, при чему су се вредности кретале од 23,58 %RSC за 80ПГС до 65,27 %RSC за ВС (Графикон 6).



а) - %RSC за 70Ет-ЕПДЈ након израде vs након 180 дана

б) - %RSC за уљане-ЕПДЈ након израде vs након 180 дана

Графикон 6. Антиоксидативна активност испитиваних ЕПДЈ након 180 дана чувања - DPPH тест (%RSC). Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен Tukey's тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

Значајне разлике између АА коју су ЕПДЈ показали након 180 дана чувања није било ни у односу на екстрагенс ни у односу на примењену екстракциону методу. Екстракти израђени ултразвучном екстракцијом су и након 180 дана показали генерално незнатно боље резултате за %RSC у поређењу са екстрактима израђеним другим методама уз примену истог екстрагенса. Значајна разлика није постојала ни између поларних и неполарних екстрагенаса, као што је то било одмах након израде. 70Ет-ЕПДЈ су и након чувања показали најбољу АА у односу на остале ЕПДЈ. В-ЕПДЈ су такође показали добре резултате за %RSC. АА испитиваних ЕПДЈ се углавном смањила током времена, у просеку за око 20% за 70Ет-ЕПДЈ и 45ПГ-ЕПДЈ и око 10% код В-ЕПДЈ (Графикон 3 и Графикон 6), али без значајности. Једино су 70Ет-ЕПДЈ након чувања 180 дана показали значајно највећи пад АА, док су 45ПГ-ЕПДЈ и В-ЕПДЈ показали незнатно мањи пад вредности %RSC. 80ПГ-ЕПДЈ су одржали своју АА током времена и била је иста или незнатно већа у односу на АА измерену одмах након израде. Уљани екстракти су показали бољу АА након 180 дана чувања, и код њих је дошло и до значајног повећања %RSC вредности. Уљани екстракти израђени поступком дигестије су и након чувања дали боље резултате за %RSC у односу на мацерацију са уљем, али без значајности. Једно од објашњења за повећање АА 80ПГ и уљаних ЕПДЈ може бити да 80% пропиленгликол и уља мог добро да екстрахују

антиоксидативна једињења, односно ПФ једињења (Графикон 2) (Stojiljković и сар., 2016а); 2016в)), али да ови екстрагенси на неки начин вежу антиоксидативне супстанце и оне не могу одмах да испоље своју активност, али да временом долази до њиховог ослобађања и да оне тек тада показују своју АА. Присуство незасићених масних киселина и поларних супстанци у овим уљима вероватно да утичу на везивање ПФ једињења, а да након стајања долази до ослобађања ових антиоксидативних једињења и до испољавања антиоксидативног потенцијала уљаних ЕПДЈ (Aburjai и Natsheh, 2003; Arsić и сар., 2014; 2011; Prottey, 1976). Иако су ови екстракти (80ПГ и уљани ЕПДЈ) показали бољу АА након чувања, она је и даље била незнатно нижа у односу на остале екстракте (Графикон 3 и Графикон 6).

4.1.6. Ефикасност и безбедност примене ЕПДЈ на културама ћелија

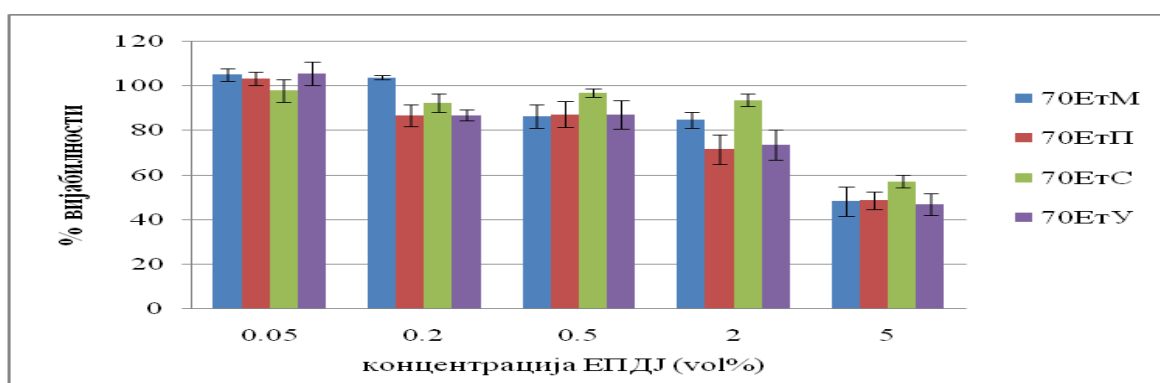
Битан део испитивања (дермо)козметичких производа је испитивање нешкодљивости, односно безбедности примене и ефикасности примене (Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Regulation (EC) No 1223/2009). Алтернативне *in vitro* методе, као што су тестови испитивања на ћелијама, представљају добру алтернативу скупим и етички неоправданим тестовима на животињама (Јірова и сар., 2003; Pantelić и Lukić, 2014; Pavlović и сар., 2014; Savić и сар., 2015; Савић, 2015; Тасић-Костов, 2013; Vinardell и Mitjans, 2008). Тестови испитивања вијабилности на фибробластним ћелијама се често користе за испитивање иритационог потенцијала и безбедности примене биоактивних супстанци као и њихових ефеката на кожи (Јірова и сар., 2003; Savić и сар., 2015; Савић, 2015; Vinardell и Mitjans, 2008). Испитивани екстракти ПДЈ, као мултифункционалне активне супстанце, се могу користити у производима различитих намена, како у прехранбеној, тако и у фармацеутској и козметичкој индустрији (Amzad Hossain и сар., 2009; Arct и Rytkowska, 2008; Green и сар., 2009; Jakobek и сар., 2013; Maria Joh и сар., 2014; Procházková и сар., 2011; Stojiljković и сар., 2018; 2016а); Šavikin и сар., 2014; Xiaoqian и сар., 2014; Yu и Van Scott, 2004). У том контексту, ефекат ЕПДЈ испитиван је на фибробластима L929 ћелијске линије (Savić и сар., 2015; Савић, 2015). Резултати су приказани на Графикону 7.

Примењена концентрација ЕПДЈ је значајно утицала на вијабилност фибробластних ћелија, при чему су ЕПДЈ у највећим концентрацијама од 2,0 и 5,0 vol% највише утицали на вијабилност ћелија фибробласта у односу на остале концентрације

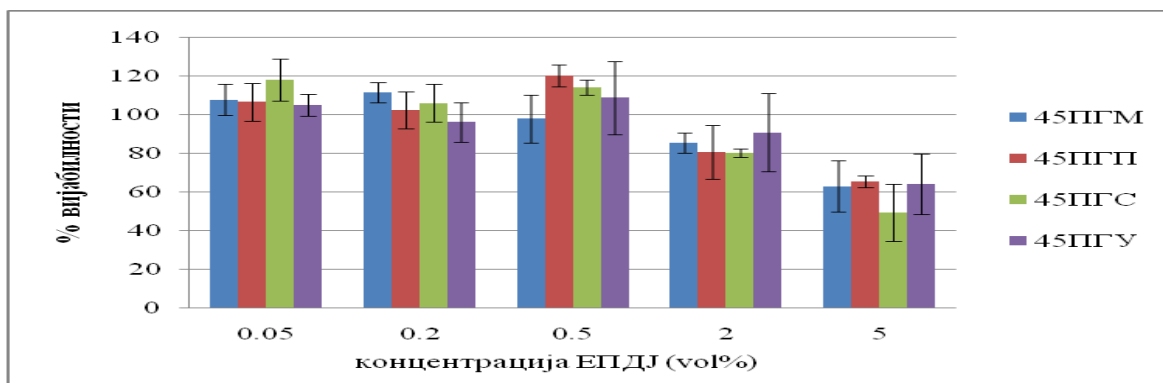
и то тако што су деловале цитотоксично. У најнижим концентрацијама (0,05 и 0,2 vol%) сви ЕПДЈ су се показали нецитотоксичним, с обзиром да је проценат вијабилних ћелија био већи од 90% у односу на негативну контролу (ћелије инкубиране у комплетном медијуму без ЕПДЈ, за коју је узето да је вијабилност ћелија 100%), што су показали и други аутори (Savić и сар., 2015). Неки екстракти су у овим концентрацијама имали и благо стимулаторни ефекат на вијабилност фибробласта. Са повећањем концентрације ЕПДЈ, проценат вијабилних ћелија се смањивао, а при највишим концентрацијама ЕПДЈ (2,0 и 5,0 vol%) проценат вијабилних ћелија је био најнижи тако да су поједини екстракти показали благу до умерену цитотоксичност, што је показано и у другим студијама (Pavlović и сар., 2014; Savić и сар., 2015; Савић, 2015). При ниским концентрацијама ЕПДЈ (0,05 и 0,2 vol%) није постојала значајна разлика у вијабилности ћелија након примене било ког екстракта, без обзира на примењену методу екстракције или употребљен екстрагенс, и показано је да су сви ЕПДЈ нецитотоксични (у конц. од 0,05 vol%) и безбедни за примену. Примена 70Ет-ЕПДЈ у конц. од 0,05 vol% је показала благо стимулаторни ефекат на вијабилност ћелија и проценат вијабилности се кретао од $97,92 \pm 5,15$ за 70ЕтС до $105,46 \pm 5,34$ за 70ЕтУ у односу на негативну контролу (Графикон 7 а)). Показано је и да су етанолни екстракти у концентрацијама од 0,05 vol% и 0,2 vol% нецитотоксични. Са повећањем концентрације за 70Ет-ЕПДЈ проценат вијабилних ћелија се смањивао након примене, при чему је при већим концентрацијама ЕПДЈ показан инхибиторни ефекат и блага цитотоксичност (у конц. од 2,0 vol%) и умерена цитотоксичност (у конц. од 5,0 vol% - вредности су се кретале од $47,0 \pm 4,83$ за 70ЕтУ до $57,22 \pm 2,83$ за 70ЕтС) (Графикон 7 а)). Примена 45ПГ-ЕПДЈ у ниским концентрацијама (0,05, 0,2 и 0,5 vol%) је показала стимулаторни ефекат на вијабилност ћелија (Графикон 7 б)), при чему је тај ефекат био најбољи након примене 0,5 vol% 45ПГП ($120,16 \pm 5,62$). Показано је да су сви 45ПГ екстракти нецитотоксични за примену у овим концентрацијама. Са повећањем концентрације ови екстракти редукују вијабилност ћелија фибробласта. При највећој концентрацији 45ПГ-ЕПДЈ су показали благу цитотоксичност (% вијабилности се кретао од $62,82 \pm 13,15$ за 45ПГМ до $65,26 \pm 3,19$ за 45ПГП), док је екстракт 45ПГС показао умерену цитотоксичност са $49,12 \pm 14,79$ % вијабилности ћелија (Графикон 7 б)). За 80ПГ-ЕПДЈ је при ниским концентрацијама показано да су нецитотоксични и безбедни за примену, а да неки екстракти показују и благи стимулаторни ефекат на вијабилност ћелија фибробласта (Графикон 7 в)), али је при високим концентрацијама проценат вијабилних ћелија био доста низак. Сви 80ПГ-ЕПДЈ у конц. од 5,0 vol% су

показали умерену цитотоксичност (најмању 80ПГП - $49,82 \pm 3,51$ % вијабилности и 80ПГУ $48,02 \pm 7,69$) док је 80ПГС у концентрацији од 5,0 vol% показао озбиљну цитотоксичност, при чему је проценат вијабилних ћелија био само $15,3 \pm 29,12$ (Графикон 7 в)). Водени екстракти су показали доста добар и константан повољан утицај на вијабилност ћелија у скоро свим примењеним концентрацијама (Графикон 7 г)), јер је проценат вијабилних ћелија након примене В-ЕПДЈ углавном био већи од 90% или приближно 90%. За све водене ЕПДЈ је показано да су нецитотоксични у било којој примењеној концентрацији, или благо цитотоксични при највећој концентрацији ($76,92 \pm 2,79$ % вијабилности за 5,0 vol% ВМ-ЕПДЈ).

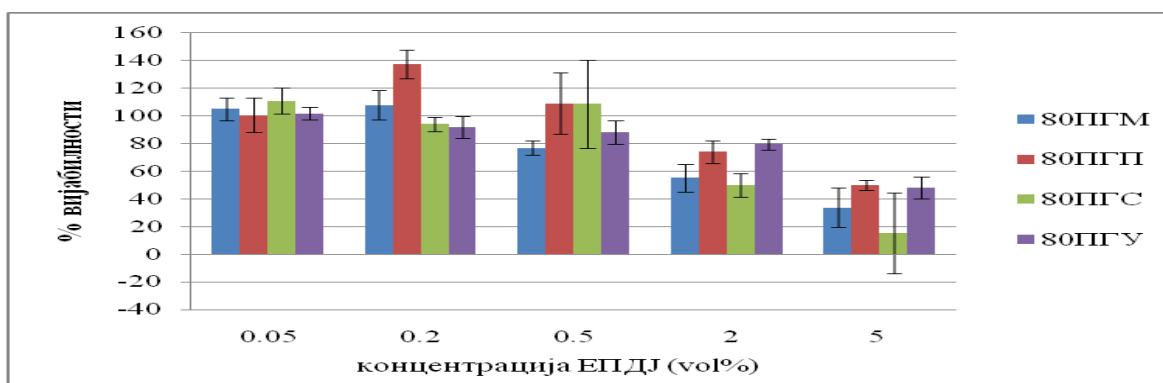
Примењена екстракциона метода за добијање ЕПДЈ није показала значајан утицај на вијабилност ћелија и цитотоксичност, док је примењени екстрагенс за израду ЕПДЈ показао значајан утицај при вишим концентрацијама. При ниским концентрацијама (0,05 и 0,2 vol%) није постојала значајна разлика у проценту вијабилности ћелија након примене ЕПДЈ израђених било којим екстрагенсом. В-ЕПДЈ су показали најбољи ефекат на вијабилност ћелија фибробласта са повећањем концентрације, док су 80ПГ-ЕПДЈ показали најнеповољније ефекте у односу на остале ЕПДЈ. У концентрацији од 2,0 vol% водени екстракти су показали значајно повољније ефекте у односу на 80ПГ екстракте. У концентрацији од 5,0 vol% водени екстракти су показали најповољније ефекте у односу на све остале екстракте, као и 45ПГ'-ЕПДЈ у односу на 80ПГ-ЕПДЈ.



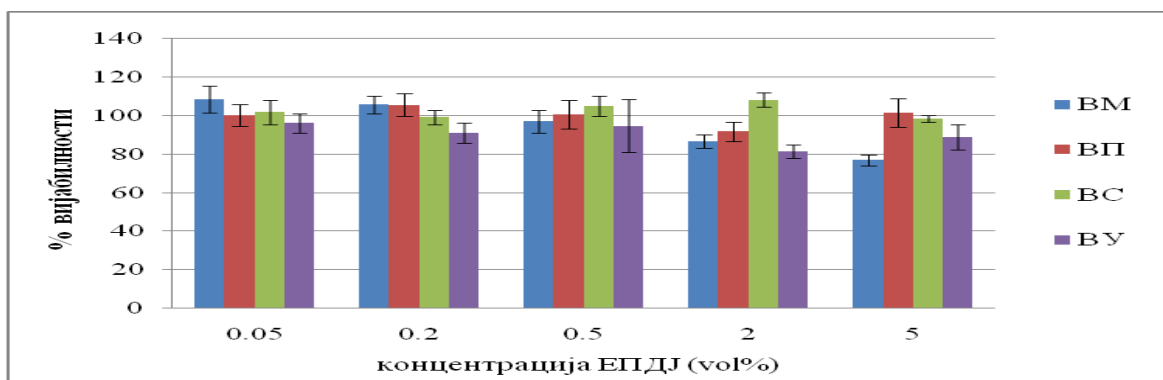
а)



б)



в)



г)

- а) - 5,0 vol% ЕПДЈ vs остале конц. ЕПДЈ
- б) - 2,0 vol% ЕПДЈ vs остале конц. ЕПДЈ
- в) - 2,0 vol% В-ЕПДЈ vs 2,0 vol% 80ПГ-ЕПДЈ
- г) - 5,0 vol% В-ЕПДЈ vs 5,0 vol% 70Ет, 45ПГ и 80%ПГ
- д) - 5,0 vol% 45ПГ-ЕПДЈ vs 5,0 vol% 80%ПГ-ЕПДЈ

Графикон 7. Ефекат ЕПДЈ на вијабилност фибробласта L929 ћелијске линије: а) 70Ет-ЕПДЈ; б) 45ПГ-ЕПДЈ; в) 80ПГ-ЕПДЈ; г) В-ЕПДЈ. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација и упоређивани у односу на примењени екстрагенс и екстракциону методу, као и у односу на примењену концентрацију ЕПДЈ применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), након чега је рађен *Tukey's* тест.

In vitro испитивање иритационог потенцијала, односно безбедности примене, и ефикасности ЕПДЈ је показало да су сви ЕПДЈ нецитотоксични, без обзира на примењену методу екстракције или екстрагенс, а неки показују и стимулаторни ефекат на вијабилност ћелија фибробласта L929 ћелијске линије. Повољне ефекте биљних екстраката на испитивану ћелијску линију су показали и други аутори (Savić и сар., 2015). Са повећањем концентрације ЕПДЈ овај ефекат пропорционално изостаје и при највишим концентрацијама ЕПДЈ делују инхибиторно и углавном благо до умерено цитотоксично на испитивану ћелијску линију фибробласта. Показано је да би водени екстракти потенцијално били најбезбеднији за примену, са добром потенцијалном ефикасношћу на вијабилност ћелија у свим испитиваним концентрацијама и да су углавном нецитотоксични у испитиваним концентрацијама. Етанолни и 45ПГ-ЕПДЈ су такође дали добре резултате у оквиру овог *in vitro* испитивања потенцијалне безбедности и ефикасности, док је показано да би 80ПГ-ЕПДЈ били потенцијално најмање безбедни за примену при високим концентрацијама.

4.2. ЕМУЛЗИЈЕ СА ЕКСТРАКТИМА ПЛОДА ДИВЉЕ ЈАБУКЕ

4.2.1. *In vitro* физичко-хемијска карактеризација емулзија са ЕПДЈ

In vitro физичко-хемијска карактеризација емулзија са одабраним ЕПДЈ, чији је састав дат у Табели 9. обухватала је следећа испитивања: органолептичка испитивања (боја, мирис, конзистенција, размазивост) и физичко-хемијска испитивања (рН вредност и електрична проводљивост).

4.2.1.1. Органолептичка анализа испитиваних емулзија са ЕПДЈ

Испитиване емулзије са 6% стандардизованим ЕПДЈ су након израде биле бледо беж до окер боје, различитих нијанси у зависности од употребљеног ЕПДЈ, док су плацебо узорци били беле боје. Најтамнији су били узорци са 45ПГУ, а најсветлији (скоро беле боје) узорци са Суд. МЕ емулзије су биле нешто мало тамније нијансе у односу на ЕЕ емулзије (Слике 12 и 13). Сви узорци након израде су били без мириса, сјајни, полуврсте конзистенције, хомогени и добре размазивости. ЕЕ емулзије су биле меканије, ређе конзистенције у односу на МЕ емулзије, вероватно услед нешто другачије структурације и стабилизације емулзија до које долази услед присуства конвенционалног емулгатора (Arsić и сар., 2011; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). Такође, плацебо узорци су били гушће конзистенције, у односу на узорке са ЕПДЈ стабилизоване истим емулгатором, што је уочено већ приликом израде. Боја, мирис, сјај и конзистенција свих испитиваних емулзија су остале непромењене након 60 дана, односно 180 и 365 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ (заштићено од директне сунчеве светлости), док је дошло до незнатне промене у размазивости (лошија размазивост код ЕЕ емулзија), вероватно као резултат накнадне структурације емулзија (Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). Хомогеност је након чувања такође била добра за све узорке, без знакова фазне сепарације. Органолептичке карактеристике емулзија након израде, које су углавном остале исте и током чувања, су приказане у Табели 15 и на Сликама 12 и 13.

Табела 15. Органолептичке карактеристике испитиваних емулзија са одабраним ЕПДЈ након израде (и након 60, 180 и 365 дана чувања)

Емулзија	Особине			
	боја	мирис	конзистенција	размазивост
	након израде и након 60, 180 и 365 дана чувања (униформно)			
МПл1	бела, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
МЕ70ЕтУ	бледо беж, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
МЕ45ПГУ	беж, окер, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
МЕВУ	бледо беж, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
МЕСуУ	бела, беж, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
ЕПл2	бела, сјајна	без мириса	получврста, хомогена	добра, мастан филм
ЕЕ70ЕтУ	бледо беж, сјајна	без мириса	мекана, хомогена	добра, мастан филм
ЕЕ45ПГУ	беж, окер, сјајна	без мириса	мекана, хомогена	добра, мастан филм
ЕЕВУ	бледо беж, сјајна	без мириса	мекана, хомогена	добра, мастан филм
ЕЕСуУ	бела, беж, сјајна	без мириса	мекана, хомогена	добра, мастан филм

МЕ емулзије

МПл1 - МЕ70ЕтУ - МЕ45ПГУ - МЕВУ - МЕСуД

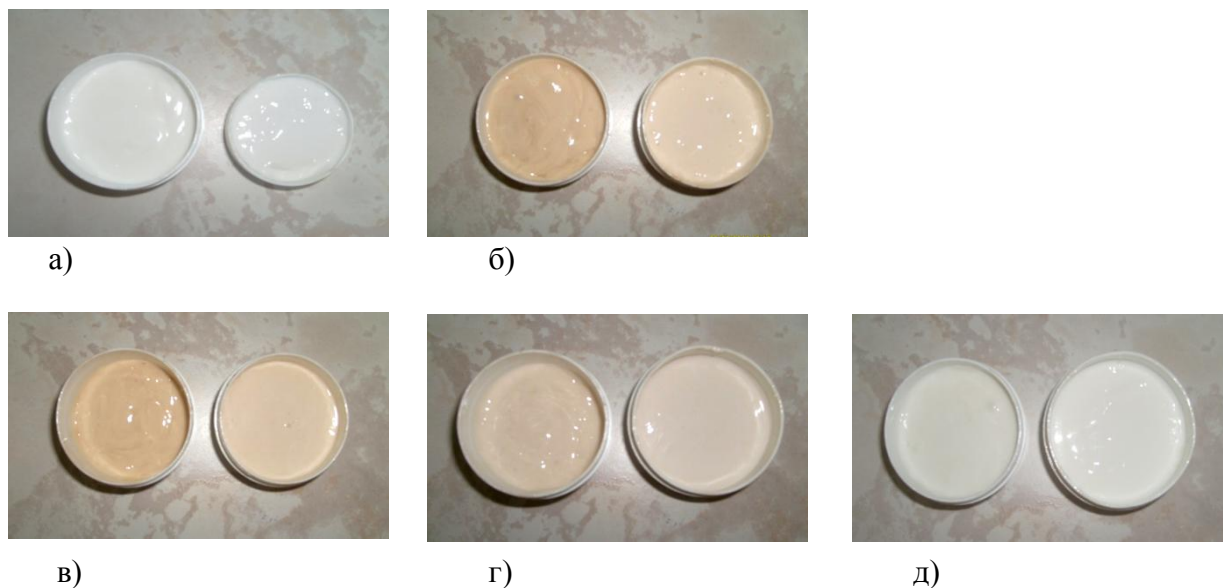


ЕПл1 - ЕЕ70ЕтУ - ЕЕ45ПГУ - ЕЕВУ - ЕЕСуД

ЕЕ емулзије



Слика 12. Емулзије са ЕПДЈ стабилизоване биодеградабилним (МЕ емулзије) - горе и конвенционалним мешаним емулгаторима (ЕЕ емулзије) - доле; с лева на десно - Пл, 70ЕтУ, 45ПГУ, ВУ, СуД-ЕПДЈ.

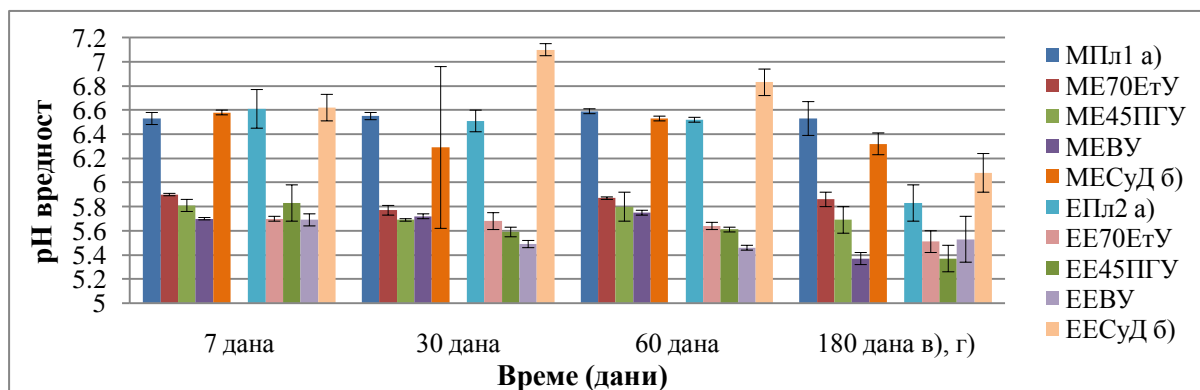


Слика 13. Органолептичко поређење узорака са истим инкорпорираним ЕПДЈ, а стабилизирани различитим емулгаторима: а) Плацебо узорци (МПл1-лево, ЕПл2-десно); б) Емулзије са 70ЕтУ-ЕПДЈ (МЕ70ЕтУ-лево, ЕЕ70ЕтУ-десно); в) Емулзије са 45ПГУ-ЕПДЈ (МЕ45ПГУ-лево, ЕЕ45ПГУ-десно); г) Емулзије са ВУ-ЕПДЈ (МЕВУ-лево, ЕЕВУ-десно); д) Емулзије са Суд-ЕПДЈ (МЕСуд-лево, ЕЕСуд-десно).

4.2.1.2. Физичко-хемијске карактеристике испитиваних емулзија са ЕПДЈ

4.2.1.2.1. Одређивање рН вредности испитиваних емулзија са ЕПДЈ

рН вредности испитиваних емулзија након израде, као и током целокупног периода испитивања од 180 дана, су биле у оквиру препоручених рН вредности за производе намењене за примену на кожу, дакле, блиске физиолошким рН вредностима коже (Lodén, 2003; Службени лист СФРЈ бр. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 и 18/91; Schmid-Wendtner и Korting, 2007) (Графикон 8). рН вредности активних узорака (емулзије са ЕПДЈ) су биле значајно ниже у односу на рН вредности плацебо узорака (МПл1 и ЕПл2) (осим у случају емулзија са Суд, које су показале више рН вредности у односу на плацебо узорке, што може бити последица примене уља као екстрагенса). Кисела природа ПДЈ као и ЕПДЈ (Stojiljković и сар., 2018; 2016а) је вероватно утицала на рН вредности емулзија са овим активним супстанцама. Након израде рН вредности узорака су се кретале од $5,69 \pm 0,05$ до $6,62 \pm 0,11$ рН јединица. Највише рН вредности су имале емулзије са Суд ($6,62$ за ЕЕСуд и $6,58$ за МЕСуд). Плацебо узорци су имали рН вредности $6,61$ за ЕПл2 и $6,53$ за МПл1.



- а) - рН вредности Пл узорак vs емулзија са 70ЕтУ, 45ПГУ и ВУ-ЕПДЈ
 б) - рН вредности емулзија са Суд vs емулзија са 70ЕтУ, 45ПГУ и ВУ-ЕПДЈ
 в) - рН вредности емулзија након 180 дана vs након 7, 30 и 60 дана
 г) - рН вредности након 180 дана: МЕ емулзија vs ЕЕ емулзија

Графикон 8. рН вредност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима у функцији времена. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена рН вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

Значајна разлика није постојала у рН вредностима између формулисаних емулзија у односу на врсту примењеног ЕПДЈ, ни након израде као ни након чувања од 180 дана, осим код МЕСуд и ЕЕСуд. Емулзије са Суд су током целокупног периода испитивања показале значајно више рН вредности у односу на све остале емулзије, као и у односу на плацебо узорке (Графикон 8). Емулзије са ВУ су имале незнатно ниже рН вредности у односу на остале испитиване узорке, што се свакако може приписати утицају рН вредности примењеног воденог ЕПДЈ као активне супстанце (Део 4.1.2.2.1). Утицај рН вредности примењене активне супстанце на рН вредност емулзије је показан и раније (Лукић, 2014; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013). Тип примењеног емулгатора није значајно утицао на рН вредности емулзија одмах након израде, али је имао значајан утицај након 180 дана чувања, при чему су МЕ емулзије показале знатно више рН вредности у односу на рН вредности ЕЕ емулзија.

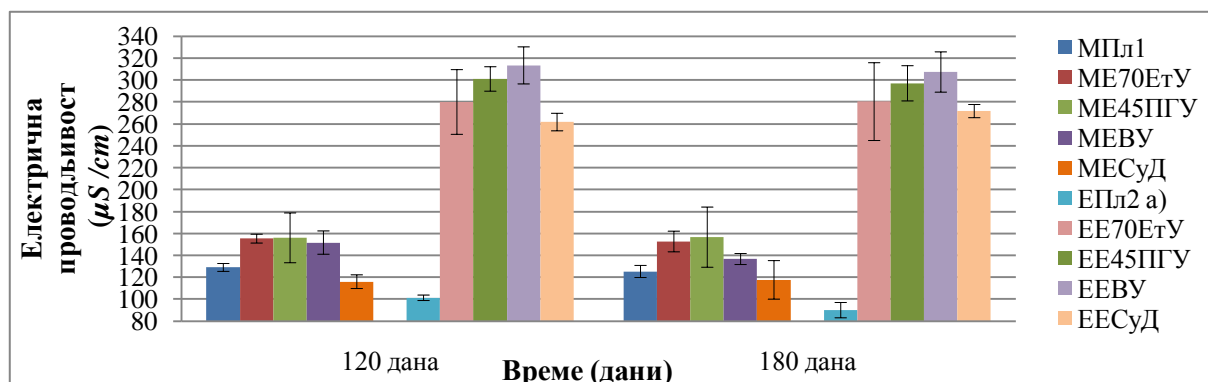
рН вредности свих испитиваних узорак након 30 и 60 дана чувања на $22 \pm 2^\circ\text{C}$ су биле нешто ниже у односу на базалне вредности, али без значајности. Након 180 дана чувања рН вредности испитиваних емулзија су биле значајно ниже и у односу на базалне вредности и у односу на рН вредности измерене након 30 и након 60 дана чувања. Измерене рН вредности за узорке након 180 дана су се кретале у распону од $5,37 \pm 0,12$ до $6,32 \pm 0,09$. Код емулзија са ЕПДЈ вероватно да долази до распадања

продуката неутрализације и настанка слободних ВК, које су по природи киселе супстанце и утичу на пад рН вредности производа који их садрже. Ипак, ове незнатне промене могу се занемарити с обзиром да су рН вредности свих узорака остале и даље у оквиру препоручених рН вредности за производе намењене апликацији на кожу (Lodén, 2003). Стабилна и очувана рН вредност узорака на скоро истом нивоу током чувања може указати на задовољавајућу потенцијалну физичко-хемијску стабилност испитиваних емулзија са ЕПДЈ (Lodén, 2003; Mahrhauser и сар., 2015; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012).

4.2.1.2.2. Мерење електричне проводљивости испитиваних емулзија

Електрична проводљивост свих узорака је током целокупног периода испитивања била изнад $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Графикон 9), чиме је потврђено да су испитиване емулзије са ЕПДЈ емулзије у/в типа (Arsić и сар., 2014; Васиљевић и сар., 2009; 2007; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2010; Тасић-Костов, 2013; Савић, 2015). Након 180 дана чувања електрична проводљивост се кретала од $117,6 \pm 17,56 \mu\text{S}/\text{cm}$ за МЕСуд до $307,33 \pm 18,34 \mu\text{S}/\text{cm}$ за ЕЕВУ (Графикон 9). Пл узорци су имали ниже вредности електричне проводљивости у односу на емулзије са активним ЕПДЈ а стабилизоване истим емулгатором ($90 \pm 7 \mu\text{S}/\text{cm}$ за ЕПл2 и $125,33 \pm 5,51 \mu\text{S}/\text{cm}$ за МПл1), али је та разлика била значајна само код ЕЕ емулзија. Присуство ВК и других хидросолубилних супстанци из ЕПДЈ, је вероватно утицало на повећање електричне проводљивости формулисаних емулзија. Врста коришћеног ЕПДЈ није значајно утицала на електричну проводљивост емулзија, али су током целокупног периода испитивања емулзије са ВУ боље проводиле струју, вероватно услед присуства веће количине хидросолубилних активних супстанци, као и воде, из воденог ЕПДЈ, у емулзионом систему. Емулзије са Суд су имале ниже вредности електричне проводљивости у односу на остале емулзије. Присуство мање количине „слободне воде“ у емулзијама са уљаним ЕПДЈ може утицати на нижи ниво електричне проводљивости ових емулзија (Arsić и сар., 2011). Такође, показан је и нижи садржај ВК као хидросолубилних супстанци у Суд и емулзијама са Суд, што такође може утицати на смањену електричну проводљивост. ЕЕ емулзије су показале скоро двоструко већу електричну проводљивост у односу на МЕ емулзије. Могуће је да код примене конвенционалног емулгатора, већа количина воде остаје као „слободна вода“ у систему, док се код МЕ емулзија вода везује интерламеларно у структуру течних кристала (Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). Свакако треба имати на уму и

чињеницу да у ЕЕ емулзијама има и 3% више воде у односу на емулзионе системе са алкилглюкозидним емулгаторима (услед иницијалне формулације емулзија) (Табела 9). Мекша конзистенција ЕЕ емулзија је констатована и органолептичким испитивањем (Табела 15). Добијени резултати су потврдили да су испитивани узорци хидрофилне емулзије, тј. емулзије у/в типа. Након чувања од 180 дана није дошло до значајног пада електричне проводљивости код већине узорака у односу на вредности након 120 дана, што може указати на задовољавајућу потенцијалну физичко-хемијску стабилност испитиваних емулзија.



а) - елек.пров. ЕПл2 vs ЕЕ емулзија са ЕПДЈ

б) - елек.пров. ЕЕ емулзије vs МЕ емулзије

Графикон 9. Електрична проводљивост емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима у функцији времена. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

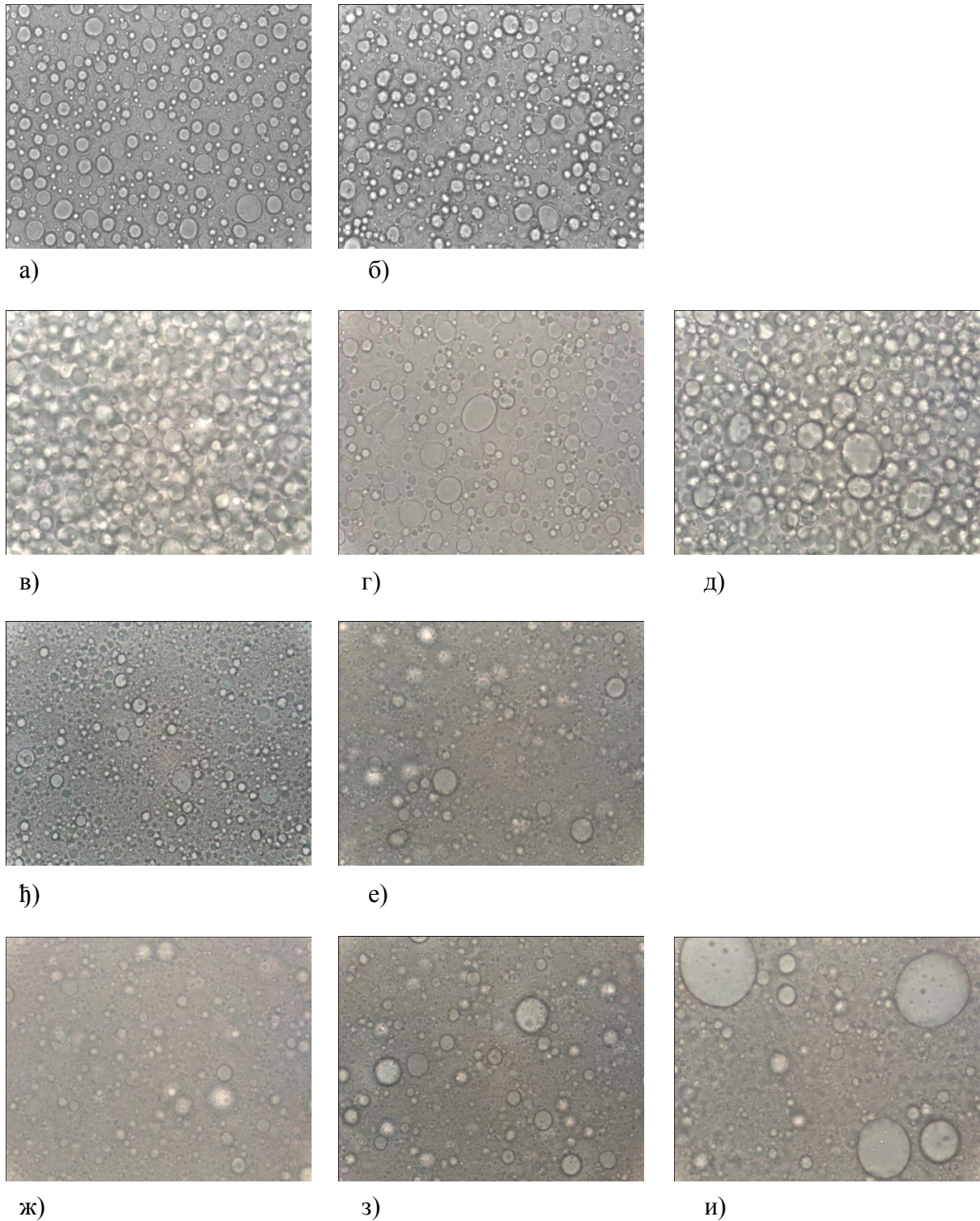
4.2.2. Физичка стабилност и структурно уређење емулзија са ЕПДЈ

4.2.2.1. Поларизациона и светлосна микроскопска анализа

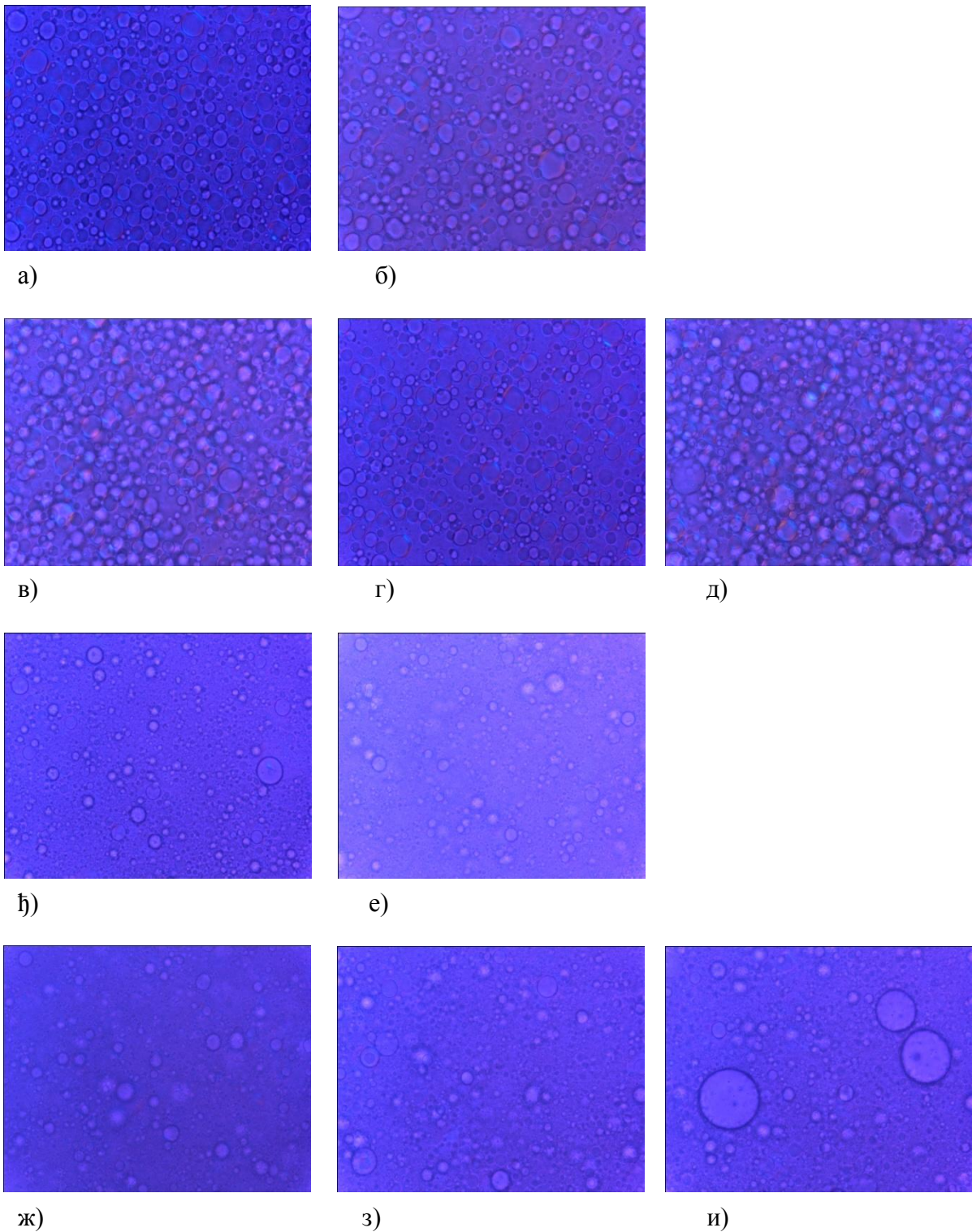
Микроскопска анализа представља једну од метода за испитивање стабилизације емулзијама фазом течних кристала као и за испитивање прелиминарне физичке стабилности емулзија након природног старења (чувањем узорака на $22 \pm 2^\circ\text{C}$, заштићени од сунчеве светлости и то у трајању од неколико месеци) и након убрзаног старења (након центрифугирања и након ригорозног цикличног температурног теста стреса) (Savić и сар., 2014; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007). У оквиру ове фазе испитивања испитан је тип интеракције ЕПДЈ са примењеним мешаним емулгаторима (кроз увид у поларизационе и светлосне микрографије) као и величина капи у емулзионим системима.

Популарност мешаних емулгатора била је, и данас се базира на њиховој способности да дају полуврсту конзистенцију кремовима/емулзијама, тј. да стабилизују емулзионе системе ламеларном фазом течних кристала. Стабилне у/в емулзије, било које конзистенције, могу се припремити применом једног или више мешаних емулгатора. Теоријом гелске мреже се може много боље објаснити стабилизација емулзионих система применом мешаних емулгатора (Eccleston, 2001; 1997a); 1997b); Savić и сар., 2014; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013). Објашњење које је дао Eccleston (1997a); 1997b)) је да се ламеларна течност-кристална фаза, која се формира у многим емулзијама, током интеракције са мешаним емулгаторима у воденој фази на високим температурама и након хлађења, често конвертује у ламеларну гел фазу, чије карактеристике доминирају емулзијом. У микроструктури ових емулзија се може уочити мрежа ламеларне гел фазе у континуираној воденој фази оријентисана око уљаних капи (Savić и сар., 2014). Раније се сматрало да је управо ламеларна течност кристална фаза (која се поларизационом микроскопијом визуелизује као малтешки крст или енгл. „*onion ring*“ око капи унутрашње фазе) доминантна у већини емулзија стабилованих мешаним емулгаторима. Међутим, теорија гелске мреже утврђује да структура, капацитет за формирање и стабилност емулзија типа у/в стабилованих мешаним емулгаторима зависи од капацитета кристалне гел фазе да интерагује са континуираном, тј. воденом фазом и да бубри. Управо су поменуте ламеларне течност кристалне и гел фазе доминантне у већини емулзија стабилованих мешаним емулгаторима (Eccleston, 2010; 1997a); 1997b); Тасић-Костов, 2013).

Разумевање фазног понашања различитих површински активних материја у мултикомпонентним емулзионим системима, физичких особина таквих емулзија, као и зависности оба наведена аспекта од додатка активних супстанци биљног порекла је неопходно да би се проценила могућност употребе различитих мешаних емулгатора у стабилизацији (дермо)козметичких производа са биоактивним супстанцама. Међутим, није сасвим јасно да ли само стабилизација применом различитих емулгатора утиче на структурно уређење и стабилност емулзионог система, и у којој мери, или и инкорпорирање различитих биљних екстраката добијених применом различитих екстрагенаса такође утиче на формирану фазу течних кристала и стабилност емулзија, и у којој мери (Eccleston, 2010; 1997a); 1997b); Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013). На Слици 14. су приказане светлосне микрографије, а на Слици 15. поларизационе микрографије испитиваних узорака 7 дана након израде и чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Слика 14. Светлосне микрографије узорака 7 дана након израде под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) МЕ70ЕтУ; в) МЕ45ПГУ; г) МЕВУ; д) МЕСуД; ж) ЕПл2; е) ЕЕ70ЕтУ; ж) ЕЕ45ПГУ; з) ЕЕВУ; и) ЕЕСуД

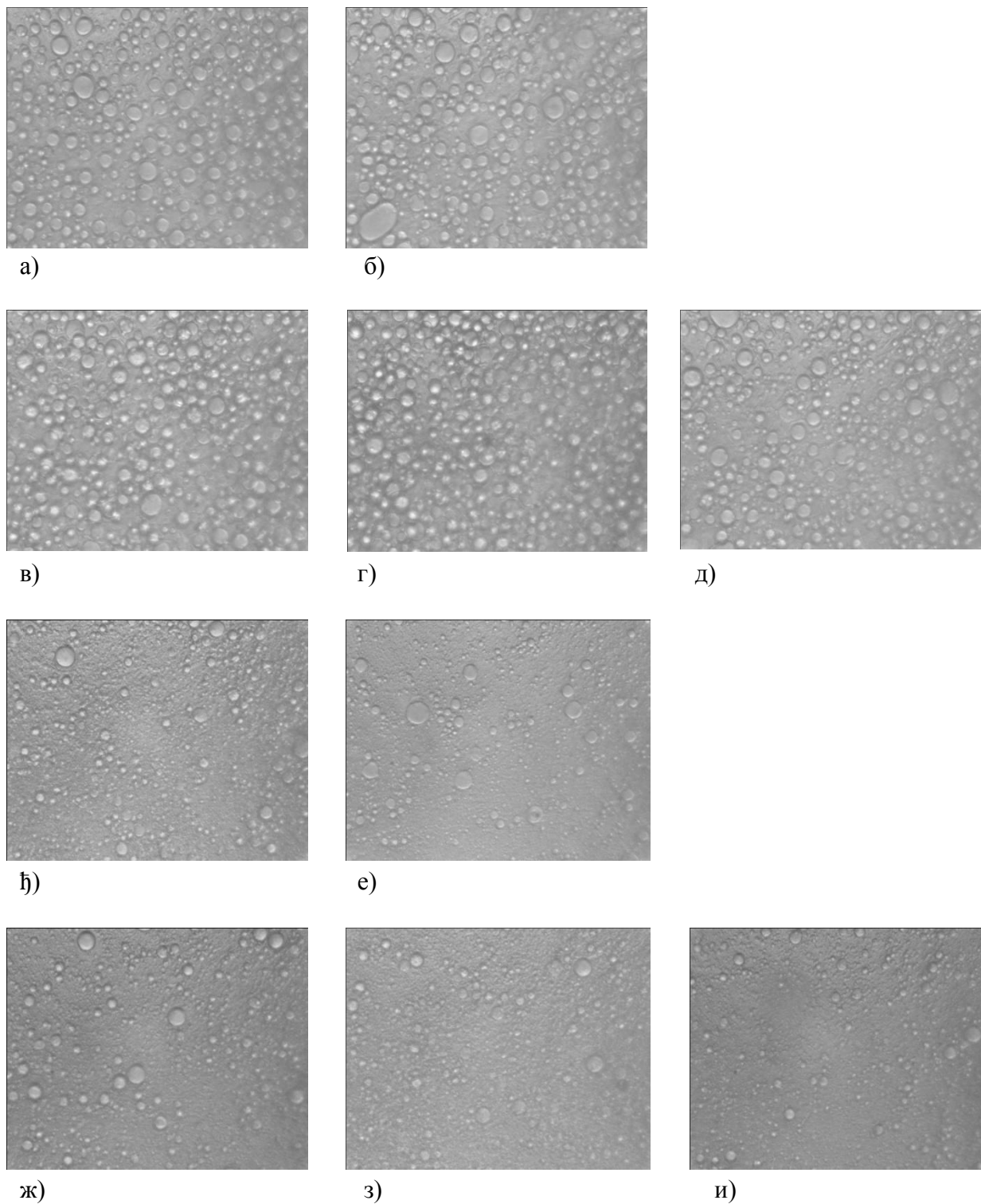


Слика 15. Поларизационе микрографије узорака 7 дана након израде под увећањем 400 пута: а) МПл1; б) МЕ70ЕтУ; в) МЕ45ПГУ; г) МЕВУ; д) МЕСуД; ж) ЕПл2; е) ЕЕ70ЕтУ; ж) ЕЕ45ПГУ; з) ЕЕВУ; и) ЕЕСуД

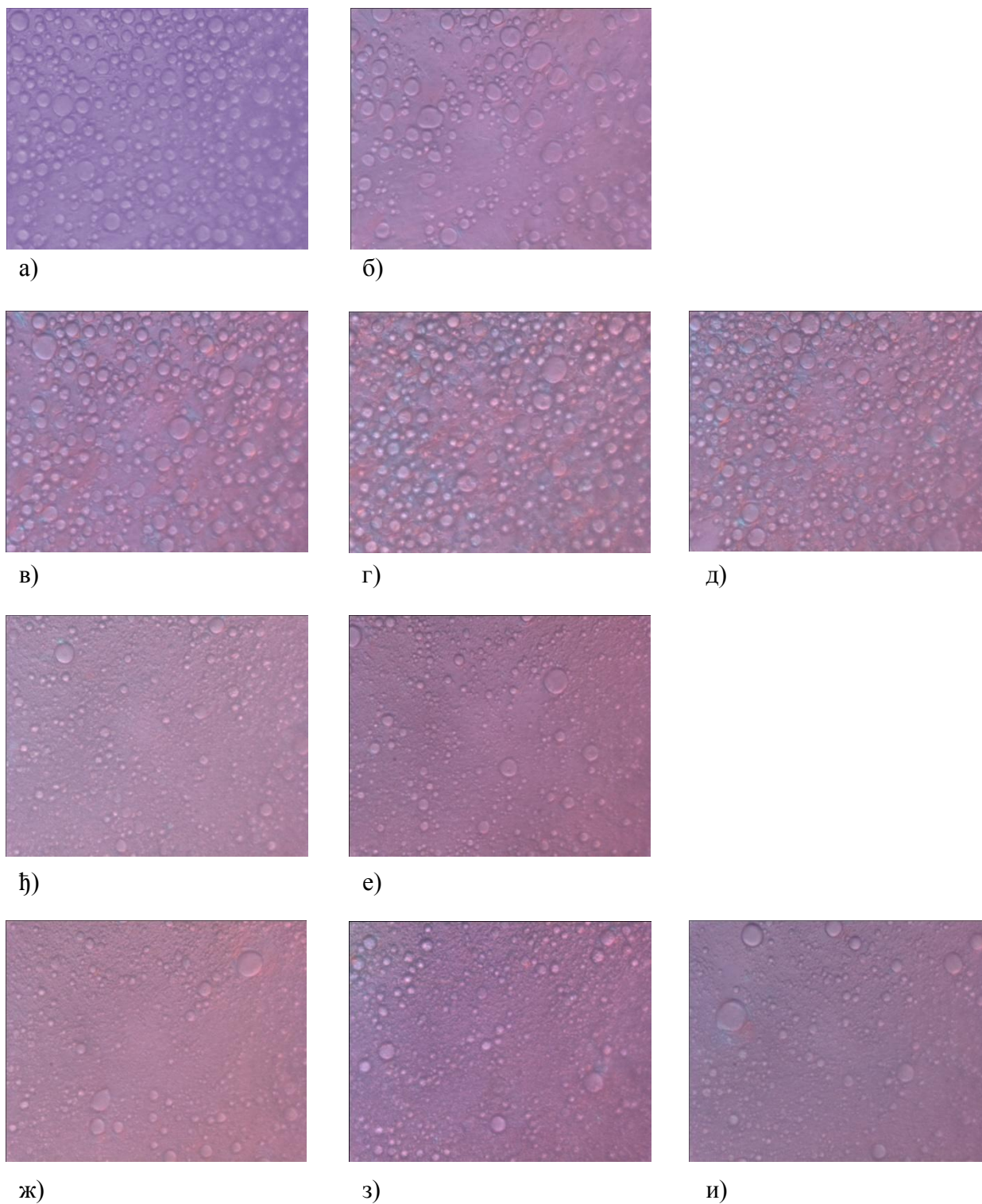
Резултати поларизационе и светлосне микроскопије испитиваних узорака (Слика 15 и Слика 14) након 7 дана израде указали су на присуство анизотропних структура различитог типа и интензитета, карактеристичне за присуство одређених мезофаза. Односно, запажене су разлике у интензитету могућности остварења стабилних гел и течностно-кристалних структура. У микроструктури испитиваних емулзија са ЕПДЈ уочене су насумично дистрибуиране анизотропне структуре, дефинисане као деформисани малтешки крстови и појава слојева/прстенова око капи масне фазе („*onion rings*“), које су биле униформно дисперговане у континуалној фази. У континуалној фази око већих капи или флокула мањих капи могла се уочити гелска мрежа, што свакако може указати на присуство течностно-кристалне и фел кристалне фазе ламеларног типа. Могло би се претпоставити да присуство мешаних емулгатора типа АПГ (*MontanovTM*) или нејонског емулгатора (*EmulgadeSE*) доприноси формирању течностно-кристалних структура. На овај вид стабилизације емулзија применом мешаних емулгатора указано је и у ранијим истраживањима (Eccleston, 2010; 1997a); 1997b); Junginger 1997; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2014; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013).

МЕ емулзије одликовале су се нешто бољом способношћу за формирањем течних ламеларних кристала као и нешто бољом физичком стабилношћу у односу на ЕЕ емулзије (Слика 15). Добра стабилизација емулзија са биодеградабилним емулгаторима услед формирања ламеларне фазе течностно кристалног и/или гел кристалног типа је показана и у ранијим публикацијама (Jakšić и сар., 2012; Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; 2013; 2011; 2009; Савић, 2004; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Микрографије ЕЕ емулзија након израде су указале на ређу конзистенцију емулзија стабилизације конвенционалним емулгатором (што је уочено и органолептичком анализом (Табела 15)). Познато је да емулзије које садрже традиционалне нејонске мешане емулгаторе често показују значајне структурне промене током чувања, некада од млечне конзистенције након израде до получврсте конзистенције након чувања. Ове промене су последица одложене хидратације ПОЕ група и последично бубрење масних алкохола (Eccleston, 1997a); 1997b); Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). Код плацебо узорка МПл1 (Слика 15 а)) је забележена боља анизотропија и присуство малтешких крстова у односу на плацебо узорак ЕПл2 (Слика 14 б) и Слика 15 б)), што додатно може указати на претходну констатацију о бољој стабилизацији и формирању течних кристала након израде код МЕ емулзија у односу на ЕЕ емулзије. На микрографији

узорка ME45ПГУ (Слика 15 в)) се најбоље уочава присуство малтешких крстова, што потенцијално може указати на боље структурно уређење и стабилизацију овог емулзионог система са овим ЕПДЈ. На светлосној микрографији узорка ME70ЕтУ су уочене „рупице ваздуха“, што евентуално може указати да је највероватније дошло до процеса коалесценције капи у овом узорку (Слика 14 б)) (Тасић-Костов, 2013). Узорак MEВУ је показао неуједначене капи на светлосној микрографији (Слика 15 г)). Скоро све ЕЕ емулзије су након израде показале врло малу способност преламања поларизоване светлости и скоро да се једва могу уочити течни кристали. Узорак ЕЕСуД није показао скоро уопште преламање светлости (Слика 15 и)). Способност уочавања организације течних кристала око уљаних капи зависи и од природе уља, што је у случају биљних уља израженије и не уочавају се кристалне структуре у овим емулзионим системима (Savić и сар., 2014). Додатно, у емулзионим узорцима са већим уљаним садржајем чешће се може уочити, поред регуларних ламеларних гел и течних кристалних фаза, додатна фаза течних кристала око уљаних капи, организована у форми омотача. Могуће је да током емулзификације долази до стварања дезорганизованих течних кристалних структура ламеларног типа, које се могу формирати на граници уљаних капи или да буду насумично распрострањене унутар континуалне фазе (Savić и сар., 2014). На светлосној микрографији овог узорка су уочене слободне уљане капи, што на основу претходно наведеног, може указати да вероватно долази до нарушавања филма насталог у присуству мешаних емулгатора на граници капи унутрашње тј. уљане фазе (Слика 14 и)). Ово може указати и на евентуално неки вид инкомпатибилности између биљних уља и употребљених емулгатора. У прилог томе иду и резултати који показују постојање неуједначних капи на микрографијама узорка МЕСуД и ЕЕЕСуД (Табела 16 и Слика 24 д) и и)).



Слика 16. Светлосне микрографије узорака 180 дана након израде под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) МЕ70ЕтУ; в) МЕ45ПГУ; г) МЕВУ; д) МЕСуД; ж) ЕПл2; е) ЕЕ70ЕтУ; ж) ЕЕ45ПГУ; з) ЕЕВУ; и) ЕЕСуД



Слика 17. Поларизационе микрографије узорака 180 дана након израде под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) МЕ70ЕтУ; в) МЕ45ПГУ; г) МЕВУ; д) МЕСуД; њ) ЕПл2; е) ЕЕ70ЕтУ; ж) ЕЕ45ПГУ; з) ЕЕВУ; и) ЕЕСуД

Светлосна и поларизациона микроскопија узорака након 180 дана чувања на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и заштићени од сунчеве светлости, је такође показала присуство анизотропије, али мањег интензитета у односу након израде. И након чувања уочене су ламеларне фазе течно кристалног и гел кристалног типа и очувана је униформност величине капи код већине узорака. На Слици 16. су приказане светлосне микрографије, а на Слици 17. поларизационе микрографије узорака 180 дана након израде, чиме је дат увид у течно кристалну микроструктуру МЕ емулзија и ЕЕ емулзија након чувања и чиме се омогућава расветљавање одређених аспеката релевантних за процену прелиминарне физичке стабилности испитиваних узорака након чувања под нормалним условима (температура од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, заштићени од светлости). МЕ емулзије су након 180 дана показале међусобно сличне карактеристике у структурној организацији и стабилизацији система и боље очување микроструктуре у односу на ЕЕ емулзије. На микрографији МПл1 (Слика 17 а)) се и даље могла уочити поларизација по ивицама уљаних капи и ламеларна гел фаза између континуалне фазе. На овом узорку је уочена униформна величина капи и након чувања (Табела 16). На микрографији узорка МЕ45ПГУ (Слика 17 в)) је уочена најбоља поларизација и након чувања, односно уочено је најбоље очување формираних фаза течних кристала услед стабилизације система. На светлосној микрографија овог узорка (Слика 16 в)) се види да овај узорак има најуниформнију и најједначенију величину капи (Табела 16) у односу на величину капи осталих испитиваних емулзија са ЕПДЈ. За узорак МЕВУ су добијени резултати слични узорку МЕ45ПГУ, док је за узорке МЕ70ЕтУ и МЕСуд (Слика 16) показана мања униформност величине капи, али релативно добра анизотропија. Микроскопском анализом је потврђена ређа конзистенција ЕЕ емулзије након 180 дана чувања у односу на МЕ емулзије, али добра у односу на конзистенцију показану 7 дана након израде. Вероватно да је након чувања дошло до накнадне структурације система у смислу очвршћавања при чему су емулзије успоставиле бољу получврсту конзистенцију у односу након израде, о чему је већ било претходно речи (Eccleston, 1997a), 1997b; Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). И након чувања је показана боља стабилизација система фазом течних кристала код МЕ емулзија него код ЕЕ емулзија. На микрографији узорка ЕЕВУ (Слика 17 з)) није уочена коалесценција капи, док је код узорака ЕЕ45ПГУ и ЕЕВУ (Слика 17 ж), з)) дошло до неког облика одвајања фаза, што потенцијално може указати на евентуалну нестабилност емулзионог система (Тасић-Костов, 2013).

Тип примењеног емулгатора и/или инкорпорираног ЕПДЈ нису значајно утицали на структуру течних кристала испитиваних емулзионих система ни након израде, ни након чувања. Ипак, за МЕ емулзије је показано израженије присуство течних кристала у односу на ЕЕ емулзије, тиме и боља стабилизација система, а самим тим и карактеристике МЕ емулзија. Емулзије са 45ПГУ (Слика 15 в ж)) су показале боље, а емулзије са СуД лошије структурно уређење, односно присуство течних кристала у структури. Добијени резултати испитивања стабилизације емулзија фазом течних кристала указују да се испитивани емулгатори могу користити као добри стабилизатори емулзионих система са киселим активним супстанцама, у нашем случају ЕПДЈ. Додатно, резултати добијени након 180 дана чувања указују на задовољавајућу прелиминарну стабилност испитиваних емулзија са ЕПДЈ. На способност испитиваних мешаних емулгатора (и конвенционалних и биодеградабилних) да буду добри и стабилни носачи за активне супстанце природног порекла указали су и други аутори (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2015; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2009; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010). Емулзије стабилизоване ламеларном фазом течних кристала и/или гел кристалног типа имају велики потенцијал за хидратацију коже, што је свакако значајна особина и за козметичке и фармацеутске производе (Jakšić и сар., 2012; Savić и сар., 2014; 2013; 2011; 2009; Савић, 2004; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010).

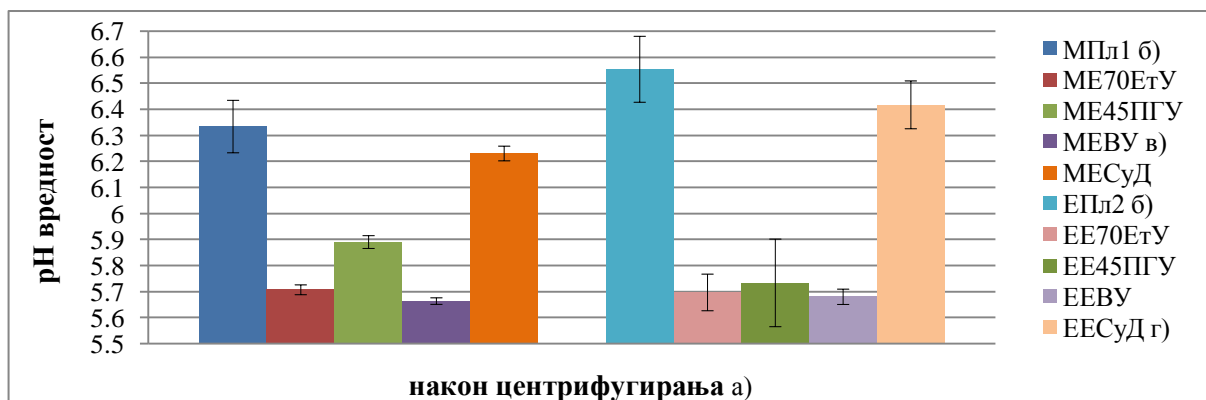
4.2.2.2. Метода центрифугирања емулзија са ЕПДЈ

Физичка стабилност емулзија од великог је значаја за процену њиховог рока трајања. Једна од метода испитивања физичке стабилности емулзионих система је и метода центрифугирања (Васиљевић и сар., 2009; 2007). Након извођења теста центрифугирања, физичко-хемијска прелиминарна стабилност испитиваних емулзионих система је процењена праћењем органолептичких особина узорака, одређивањем рН вредности као и поларизационом и светлосном микроскопијом, и мерењем величине капи, пре и након центрифугирања (Табела 1, Графикон 8, Сlike 14 и 15).

Након центрифугирања све формулисане емулзије задржале су своје првобитне органолептичке карактеристике. Плацебо узорци су и даље били беле боје, емулзије са ЕПДЈ бледо беж боје, различитих нијанси, сви су и даље били сјајни, без мириса, добре конзистенције, хомогености и размазивости. Ни у једном узорку није дошло до

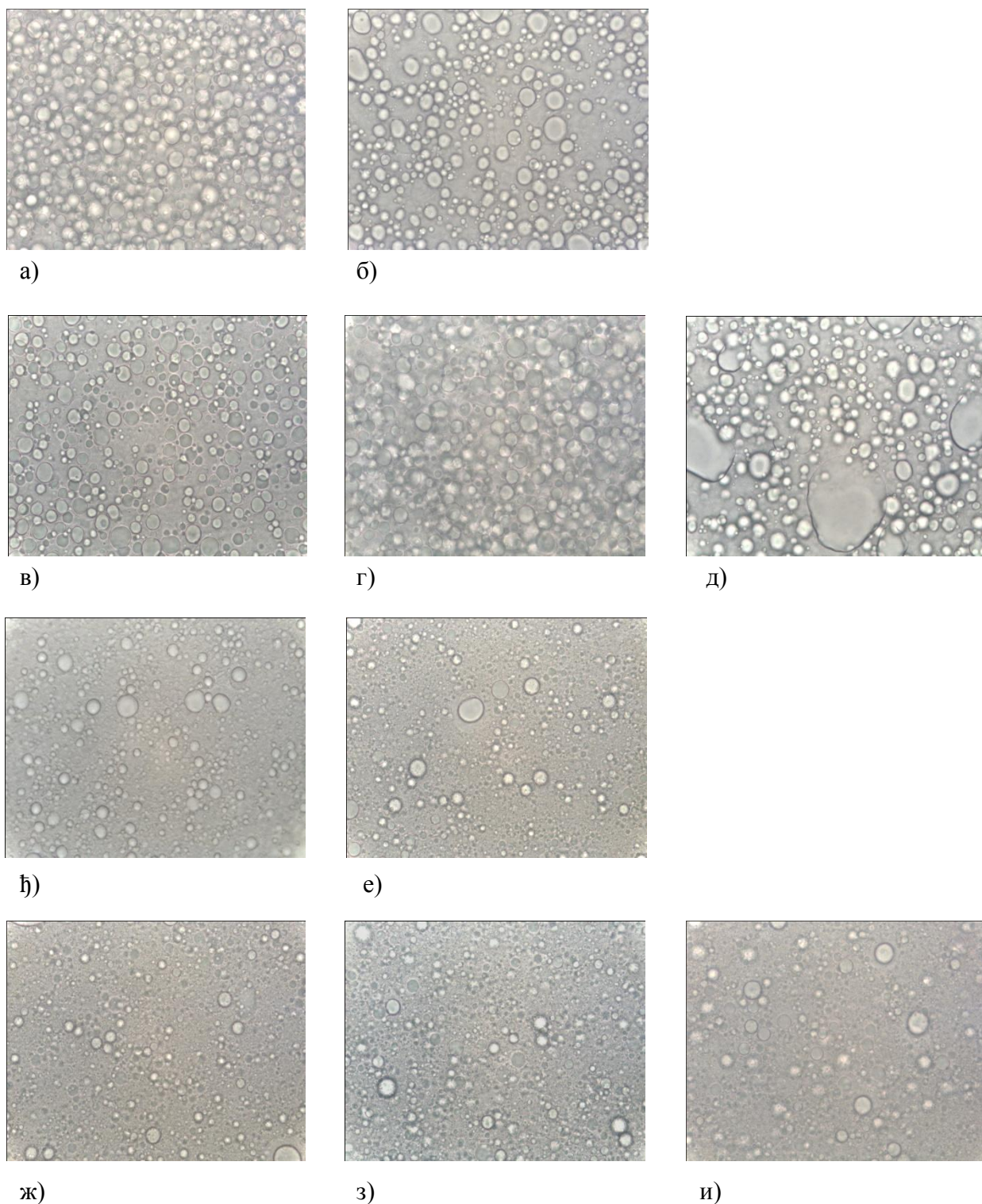
сепарације фаза емулзионог система, односно, сви узорци су остали стабилни након центрифугирања.

pH вредности испитиваних емулзија са ЕПДЈ након центрифугирања су биле значајно ниже у односу на вредности добијене одмах након израде (Графикон 8), и кретале су се од $5,66 \pm 0,01$ до $6,55 \pm 0,12$ pH јединица (Графикон 10). Вредности су и даље остале у оквиру препоручених вредности за производе намењене за примену на кожу (Lodén, 2003). Значајна разлика у pH вредностима емулзија након центрифугирања у односу на примењени емулгатор није постојала, али је зато постојала у односу на примењени ЕПДЈ. За плацебо узорке су показане (као и након израде) значајно више pH вредности у односу на узорке са 70ЕтУ, 45ПГУ и ВУ. Унутар МЕ емулзија је показана међусобно значајна разлика у вредностима pH, која је једино изостала између узорака МЕ70ЕтУ и МЕВУ. Оваква међусобна разлика није уочена унутар ЕЕ емулзија, код којих је само узорак ЕЕСуД показао значајно више pH вредности у односу на pH вредности осталих узорака са ЕПДЈ (Графикон 7).

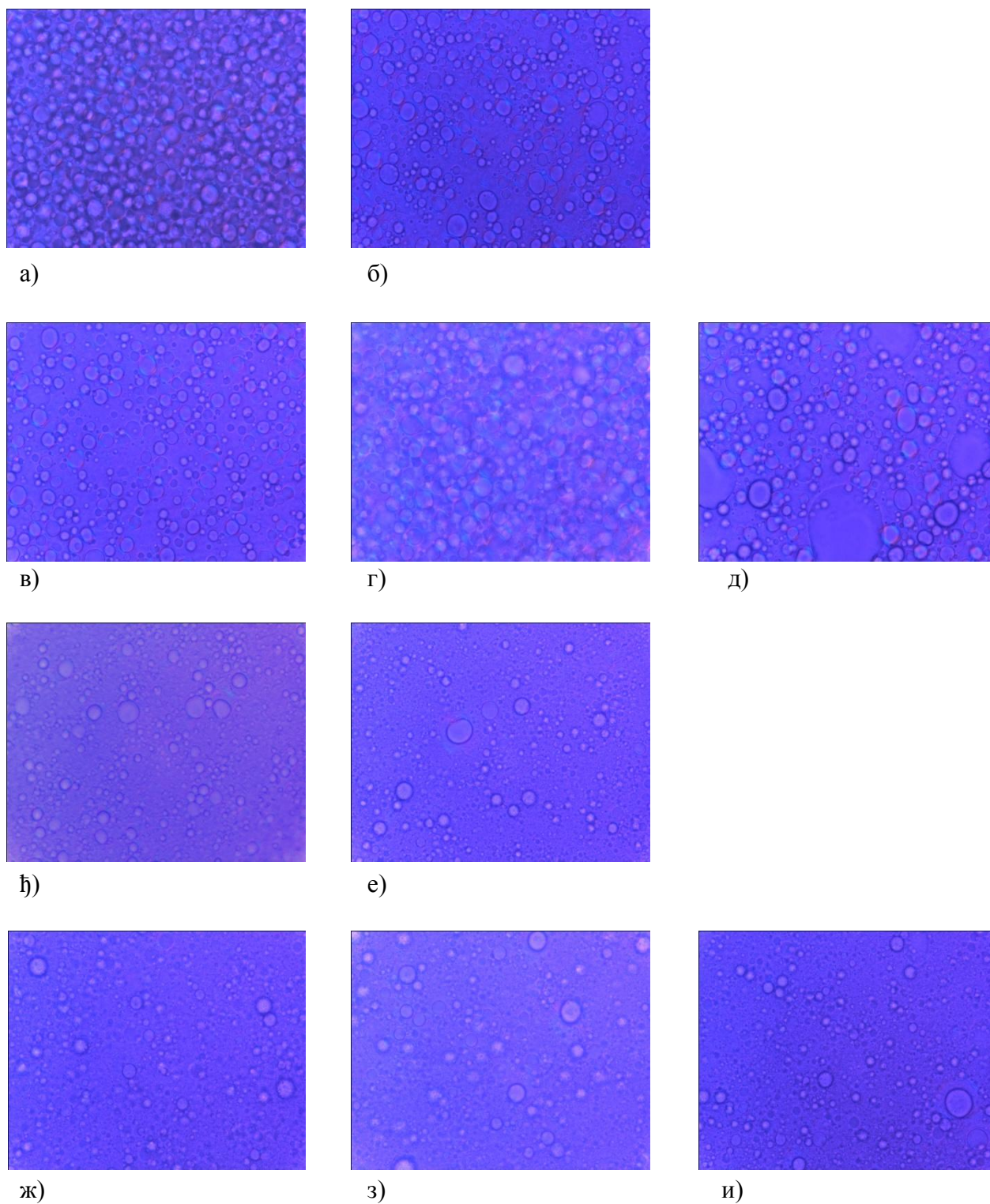


- а) - pH вредност узорака након центрифугирања vs након израде
 б) - pH вредност Пл узорака vs емулзија са 70ЕтУ, 45ПГУ, ВУ
 в) - pH вредност МЕВУ vs МЕ70ЕтУ, МЕ45ПГУ и МЕСуД
 г) - pH вредност ЕЕСуД vs ЕЕ70ЕтУ, ЕЕ45ПГУ и ЕЕВУ

Графикон 10. pH вредност емулзија са ЕПДЈ стабилизираних конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима након центрифугирања. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности у односу на вредности пре центрифугирања проверена је Студент т-тестом.



Слика 18. Светлосне микрографије узорака након центрифугирања под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) ME70EtУ; в) ME45ПГУ; г) MEВУ; д) MEСуД; ж) ЕПл2; е) EE70EtУ; ж) EE45ПГУ; з) EEВУ; и) EESуД



Слика 19. Поларизационе микрографије узорака након центрифугирања, под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) ME70EtY; в) ME45ПГУ; г) MEBY; д) MESCyD; ж) EПл2; е) EE70EtY; ж) EE45ПГУ; з) EBY; и) EESCyD

Микроанализом узорака након центрифугирања (Слика 18 - светлосне, и Слика 19 - поларизационе микрографије) је показано да је структурно уређење узорака остало непромењено, и да није дошло до нарушавања успостављене стабилизације емулзија фазом течних кристала. Сви узорци су показали задовољавајућу прелиминарну стабилност након центрифугирања. За плацебо узорак МПл1 је показана боља анизотропија након центрифугирања, јер на поларизационој микрографији након центрифугирања нису уочени уклопљени мехурићи ваздуха, у односу на микрографију снимљену 7 дана након израде (Слика 14 а)), на основу чега би се могло претпоставити да је центрифугирањем ваздух изашао из емулзионог система и да је успостављена боља структурација система (Слика 18 а)). Имајући у виду и структуре емулзија са уљаним ЕПДЈ забележене светлосном микроскопијом 7 дана након израде, добијеним микрографијама за емулзије са Суд након центрифугирања, делом је потврђено постојање неке врсте инкомпатибилности између биљних уља и мешаних емулгатора (Savić и сар., 2014). МЕ емулзије су показале бољу прелиминарну стабилност у односу на ЕЕ емулзије, имајући у виду и микрографију плацебо узорка МПл1, код кога је и након центрифугирања било израженије присуство течних кристала у структури у односу на ЕПл2. Врста примењеног емулгатора, односно додавање и промена врсте испитиваних киселих ЕПДЈ нису показали значајан утицај на испитиване карактеристике основног носача (органолептичке и рН вредност), а нису довели ни до значајног до нарушавања структуре течних кристала у емулзионим системима. Стабилност емулзионих система са испитиваним емулгаторима и природним активним супстанцама је и раније показана, што иде у прилог показаној прелиминарној стабилности испитиваних емулзија са ЕПДЈ (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2015; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2015; 2009; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010)

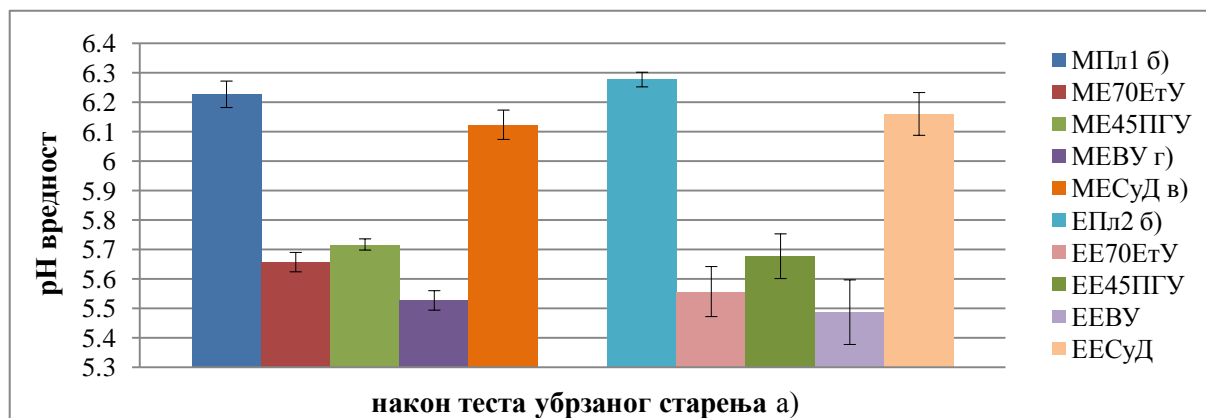
4.2.2.3. Метода теста убрзаног старења емулзија са ЕПДЈ

Физичка стабилност емулзија од великог је значаја за процену очувања органолептичких, апликативних и структурних карактеристика током различитих услова чувања, а тиме и њиховог рока трајања. Физичка стабилност емулзионих система се може проценити извођењем различитих тестова убрзаног старења, такозваних цикличних температурних стрес тестова (Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013; Васиљевић и сар., 2009; 2007). Након спровођења температурног теста стреса вршено је органолептичко испитивање (визуелно посматрање) и мерење рН вредности испитиваних емулзија, као и поларизациона и светлосна микроскопија и мерење

величине капи. Иницијална мерења спроведена су 7 дана након израде узорака (поглавље 4.2.1. у деловима 4.2.1.1.; 4.2.1.2.1. и 4.2.2.1.) а потом након температурних промена при чему је вршено међусобно поређење.

Након спроведеног теста убрзаног старења скоро сви испитивани узорци су углавном задржали своје првобитне органолептичке особине. И даље су плацебо узорци били беле боје, емулзије са ЕПДЈ бледо беж до окер боје, сјајни, без мириса, нешто ређе конзистенције и хомогености и даље добре размазивости. МЕСуд и ЕЕСуд су били најсветлије нијансе, скоро бели, а узорци са 45ПГУ су били најтамнији. Узорак МЕ45ПГУ је био најгушће конзистенције и визуелно најбољи у односу на остале испитиване узорке. Код већине узорака није дошло до класичне сепарације фаза емулзионог система након теста убрзаног старења, тј. након стрес температурних промена.

рН вредности узорака након теста убрзаног старења су биле значајно ниже у односу на рН вредности измерене одмах након израде (Графикон 8), и кретале су се од 5,49 до 6,28 рН јединица (Графикон 11), што се свакако може приписати утицају инкорпорираних киселих ЕПДЈ, као активних супстанци и њихових рН вредности на рН вредност формулисаних емулзија (Део 4.1.2.2.1). Утицај киселих КАС на рН вредност емулзионог система је показан и раније (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Savić и сар., 2015; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013). Измерене рН вредности за испитиване емулзије са ЕПДЈ након теста убрзаног старења су и даље остале у оквиру препоручених вредности за производе намењене за примену на кожу (Lodén, 2003). Тип примењеног емулгатора није значајно утицао на рН вредности узорака након теста убрзаног старења, док је тип ЕПДЈ имао значајан утицај, посебно код МЕ емулзија. Плацебо узорци су показали значајано веће рН вредности у односу на емулзије са активним ЕПДЈ, што није био случај у односу на емулзије са Суд, МЕСуд и ЕЕСуд су показале такође значајно високе вредности рН у односу на остале емулзије, док су узорци са ВУ имали најниже рН вредности у односу на све емулзије (као и услед иницијалних мерења, пре теста (Графикон 8)). МЕВУ је такође показао значајано нижу рН вредност након убрзаног старења у односу на МЕ45ПГУ, МЕСуд и МЕ70ЕтУ, што свакако може бити последица одређене рН вредности за ВУ-ЕПДЈ, која је била најнижа у односу на рН вредности других ЕПДЈ (Графикон 1).



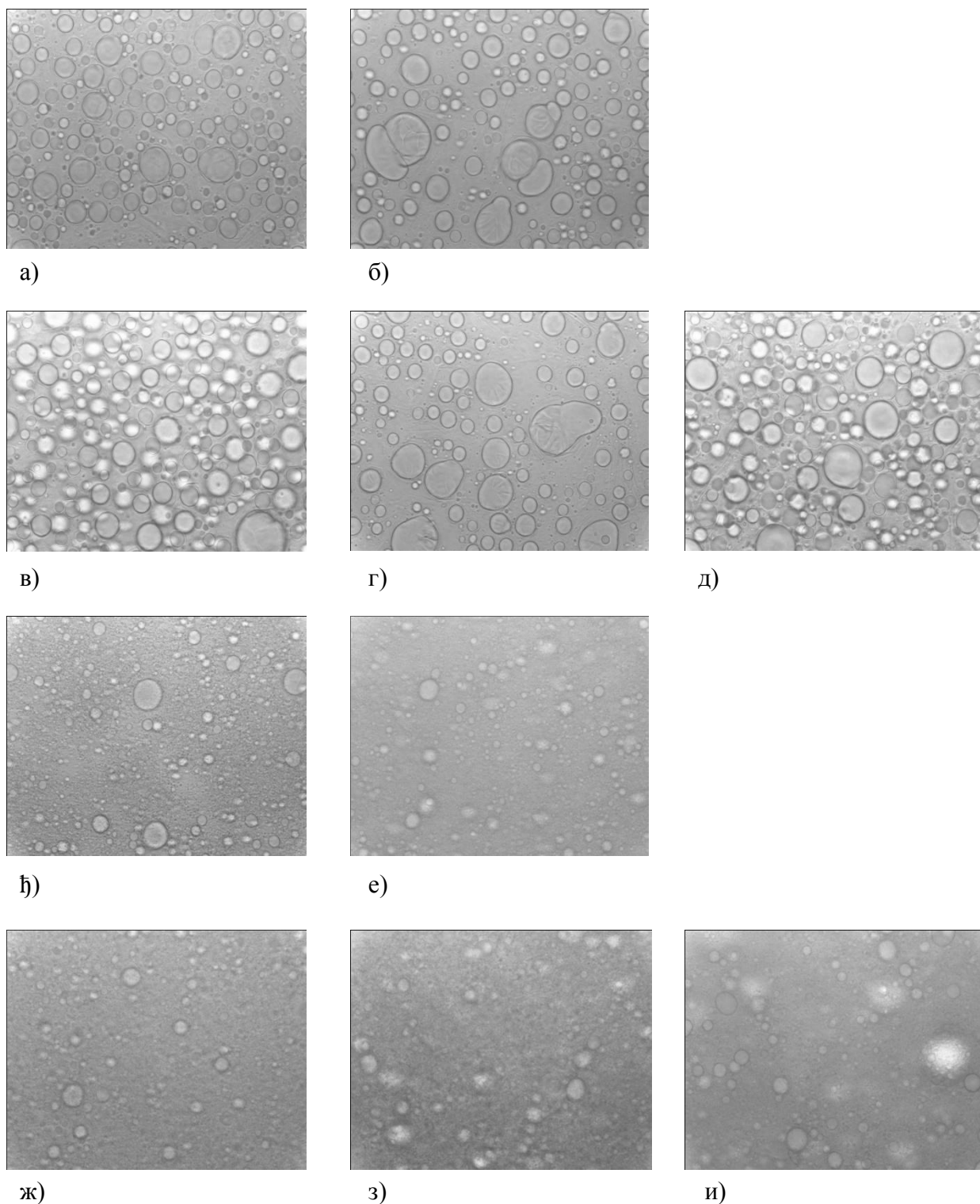
- а) - рН вредност емулзија након теста убрзаног старења vs након израде
 б) - рН вредност Пл узорака vs емулзије са ЕПДЈ, осим са СуД
 в) - рН вредност МЕСуД vs остале МЕ емулзије
 г) - рН вредност МЕВУ vs МЕ45ПГУ, МЕСуД и МЕ70ЕтУ

Графикон 11. рН вредност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима након теста убрзаног старења. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности у односу на вредности добијене пре теста убрзаног старења проверена је Студент т-тестом.

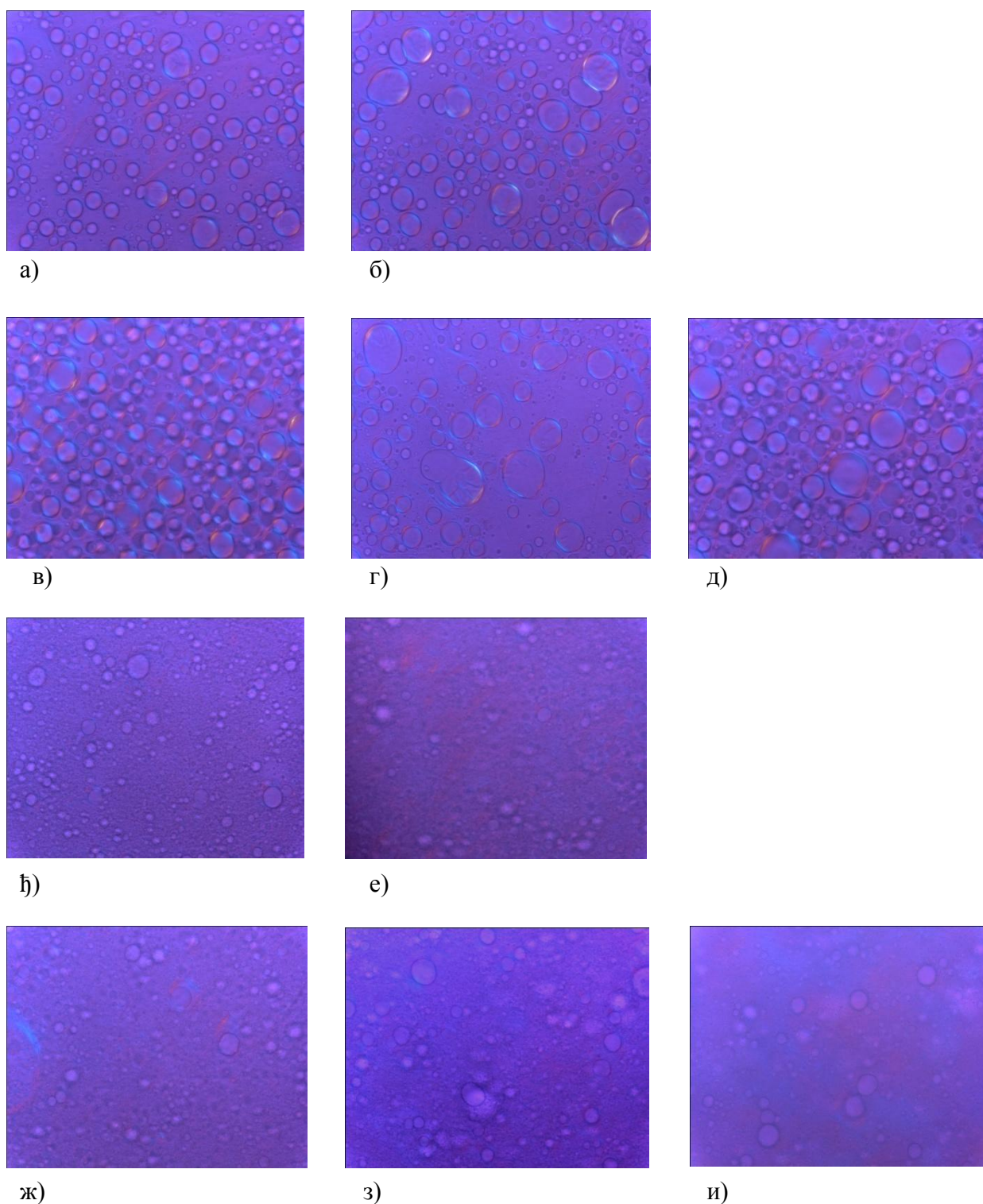
Микрографије формулисаних емулзија након теста убрзаног старења (Слика 20 и Слика 21) су указале да код већине узорака није дошло до промене структуре течних кристала након температурних промена. МЕ емулзије су показале бољу анизотропију након цикличних температурних промена у односу на стабилизацију конвенционалним емулгатором, што може указати на бољу стабилизацију емулзионог система услед додавања ЕПДЈ, као и очување задовољавајуће стабилности у односу на ЕЕ емулзије. Микрографије ЕЕ емулзија су након убрзаног старења указале на промену унутар структуре течних кристала, као потенцијално неки вид нестабилности система, што делимично може бити и последица способности конвенционалног емулгатора да доведе до накнадне промене у структури емулзија током убрзаног теста старења, односно температурних промена, што се може одразити на карактеристике саме емулзије (Arsić и сар., 2011; Eccleston, 1997a); Лукић, 2015; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2015; 2009; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010). Код узорака МПл1 и МЕ45ПГ је и након температурних промена било најизраженије присуство деформисаних малтешких крстова и ламеларне фазе унутар континуалне фазе (Слика 20 а), в)). Узорак МЕ45ПГУ је показао најбољу стабилизацију система у односу на

остале узорке (Слика 21 в)), што је у складу са органолептичким испитивањем, где је одмах уочено да овај узорак има најбољу и најгушћу конзистенцију и да је показао стабилност визуелним посматрањем. На светлосној микрографији узорка ME70ЕтУ (Слика 20 в)) је уочено да је дошло до коалесценције капи, што се на поларизационој микрографији (Слика 21 в)) може додатно видети да је дошло до флокулације и до нарушавања фазе течних кристала. На микрографијама узорка МЕВУ је такође забележена незнатна промена у структури течних кристала, при чему је уочена нешто ређа конзистенција. Може се уочити да је дошло до флокулације, да је очуван слој око капи, али да је почео да пуца. Узорак МЕСуд (Слика 21 д)) је показао добру уједначеност капи (Табела 16). ЕЕ емулзије су показале слабије структурно уређење након температурних промена у односу на МЕ емулзије. На микрографијама МЕСуд и ЕЕСуд узорака (Слике 20 и 21) је уочена коалесценција капи у емулзионом систему, при чему су се визуелно виделе и издвојене уљане капи на површини, што се може претпоставити да је можда дошло до издвајања уљане фазе из емулзионе структуре, мада није уочено класично одвајање фаза (што је у складу са органолептичком анализом узорка након теста убрзаног старења). Измена у структури емулзија са нешто већом количином уља у систему је и раније показана и објашњена (Arsić и сар., 2011; Savić и сар., 2014). Најбоље формиране капи унутар ЕЕ емулзија и најбоље структурно уређење након температурних промена је показао узорак ЕЕ45ПГУ (Слика 21 в)), али је и код њега уочено да је дошло до накнадне измене у структури, што може бити последица примењеног конвенционалног емулгатора који у свом саставу садржи ПОЕ групе (Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013).

Добијени резултати испитивања стабилности емулзија са ЕПДЈ у тесту убрзаног старења могу указати на задовољавајућу прелиминарну стабилност формулисаних емулзија, да се испитивани емулгатори могу користити као добри носачи за ЕПДЈ, као и да додатак ЕПДЈ као активне супстанце делимично утиче на испитиване карактеристике, али не утиче значајно на структуру течних кристала основног емулзионог носача, што је у складу са литературним подацима (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2015; Savić и сар., 2015; Savić и сар., 2015; 2009; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010)



Слика 20. Светлосне микрографије узорака након теста убрзаног старења под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) ME70EtY; в) ME45ПГУ; г) MEВУ; д) МЕСуД; ђ) ЕПл2; е) EE70EtY; ж) EE45ПГУ; з) EEBY; и) EECyD



Слика 21. Поларизационе микрографије узорака након теста убрзаног старења, под увеличањем 400 пута: а) МПл1; б) МЕ70ЕтУ; в) МЕ45ПГУ; г) МЕВУ; д) МЕСуд; ж) ЕПл2; е) ЕЕ70ЕтУ; ж) ЕЕ45ПГУ; з) ЕЕВУ; и) ЕЕСуд

4.2.2.4. Величина капи испитиваних емулзија са ЕПДЈ

Дескриптивном анализом микрографија ни код једног узорка није уочена значајна разлика у величини капи. За тачнију процену утврђена је средња вредност величине свих 60 пребројаних капи, одмах након израде и након 180 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, као и након центрифугирања и након цикличног температурног теста стреса. Запажено је да је у случају ЕЕ емулзија средња вредност величине капи генерално била знатно мања него код МЕ емулзија. Ово би можда могло да буде последица примењене концентрације и врсте емулгатора за стабилизацију емулзија, при чему је концентрација конвенционалног емулгатора *EmulgadeSE* била нижа у односу на биодеградабилни *MontanovTM* у основним формулацијама (што се одразило и на органолептичка својства емулзија, наиме, емулзије стабилизоване конвенционалним емулгатором биле су ређе конзистенције). Тип коришћеног ЕПДЈ је делимично утицао на величину капи унутар емулзионог система. За плацебо узорке је показана значајно мања величина капи у односу на емулзије са активним ЕПДЈ, док су међусобно ови узорци (МПл1 и ЕПл2) показали сличне вредности. Из Табеле 16, а у складу са микрографијама емулзија, види се да је при иницијалном мерењу највећа средња вредност величине капи забележена код узорка МЕСуд, а најмања код МЕ70ЕтУ. За емулзије са 70ЕтУ је генерално одређена мања величина капи у односу на емулзије са другим ЕПДЈ, док су емулзије са воденим и уљаним ЕПДЈ углавном показивале веће вредности величине капи. Узорак МЕ70ЕтУ је имао значајно ниже вредности величине капи у односу на остале емулзије стабилизоване биодеградабилним емулгаторима. Ово можда може бити последица густине и бистрине екстраката који су инкорпорирани у емулзије, с обзиром да су етанолни екстракти били најређи и најбистрији, па је дистрибуција капи другачија код њих. Такође, пропиленгликолни и уљани ЕПДЈ као гушћи су утицали и на стабилизацију и могуће формирање емулзија са већим дијаметром капи. У Табели 16 је приказана величина капи свих узорака измерене одмах након израде и након 180 дана чувања, као и након центрифугирања и цикличног теста стреса, тј. теста убрзаног старења.

Табела 16. Величина капи узорака измерена након израде и након 180 дана чувања на 22±2°C, као и након центрифугирања и теста убрзаног старења

Емулзија	Величина капи након израде	Величина капи након 180 дана чувања	Величина капи након центрифугирања	Величина капи након теста убрзаног старења
	(µm)			
МПл1	7,05±5,69 ^{а), б)}	10,43±4,70	10,15±4,59 ^{б)}	14,13±8,71 ^{ж), з)}
МЕ70ЕтУ	8,54±3,91 ^{а), б)}	11,43±5,58	9,49±4,86 ^{б)}	14,27±8,38 ^{ж), з)}
МЕ45ПГУ	13,66±4,96 ^{а)}	11,96±4,49	8,77±4,39 ^{б)}	15,99±8,09 ^{ж), з)}
МЕВУ	12,63±7,42 ^{а)}	11,26±4,27	11,79±4,96 ^{б)}	13,77±11,32 ^{ж), з)}
МЕСуд	13,89±8,16 ^{а)}	9,77±5,08	12,09±6,79 ^{б)}	13,23±7,70 ^{ж), з)}
ЕПл2	7,64±3,33 ^{г)}	7,29±4,41 ^{г)}	7,24±3,51 ^{е)}	6,50±5,40 ^{ж)}
ЕЕ70ЕтУ	9,76±6,14	6,77±4,12 ^{г)}	6,46±4,55 ^{е)}	6,65±3,31 ^{ж)}
ЕЕ45ПГУ	9,34±4,27	7,55±3,76 ^{г)}	7,05±4,36 ^{е)}	8,06±3,96 ^{ж)}
ЕЕВУ	10,62±6,19	6,87±2,95 ^{г)}	8,41±5,16 ^{е)}	8,85±4,89 ^{ж)}
ЕЕСуд	9,79±7,45	6,05±2,59 ^{г)}	6,17±2,75 ^{е)}	10,19±9,46 ^{ж)}

Резултати су приказани као средња вредност ± SD и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена, као и након центрифугирања и теста убрзаног старења проверена је Студент т-тестом.

- а) - Након израде - МЕ емулзије vs ЕЕ емулзије
- б) - МПл1 vs МЕ45ПГУ, МЕВУ, МЕСуд
- в) - МЕ70ЕтУ vs МЕ45ПГУ, МЕВУ, МЕСуд
- г) - ЕПл2 vs ЕЕ емулзије са ЕПДЈ
- д) - величина капи ЕЕ емулзија након израде vs након чувања
- е) - Након центрифугирања - МЕ емулзије vs ЕЕ емулзије
- ж) - ЕЕ емулзије - након израде vs након центрифугирања
- з) - Након израде vs након теста убрзаног старења
- и) - Након убрзаног старења - МЕ емулзије vs ЕЕ емулзије

Након чувања у периоду од 180 дана на температури од 22±2°C, величина капи унутрашње фазе испитиваних емулзија се није значајно променила, мада је углавном дошло до благог смањења величине капи, посебно код ЕЕ емулзија, где је смањење било значајно. Након органолептичког испитивања утврђена је блага разређеност система, али није дошло до визуелног одвајања фаза, иако је код неких узорака микрографијом утврђено укрупњавање и сједињавање капи, због чега се могло очекивати повећање величине капи, што ипак није показано након анализе величине капи у емулзијама са ЕПДЈ. Могуће да је због благог разводњавања емулзија, дистрибуција капи била неравномерна, а с обзиром да се микроскопира само део емулзионог узорка, величина капи не може у потпуности бити релевантан параметар за

процену стабилности. Добијени резултати би евентуално могли указати да је, током свих испитивања величине капи емулзија са ЕПДЈ (након израде, након чувања, центрифугирања или након теста убрзаног старења), величина капи узорака била око 10 μ m, што може указати на потенцијалну стабилност испитиваних емулзија, с обзиром да величина капи испод и око 10 μ m одговара стабилним у/в емулзионим системима (Савић, 2004).

Након центрифугирања узорака, средња вредност величине измерених капи је била већа само код МПл1 и МЕ70ЕтУ, док су остали узорци показали ниже вредности него пре центрифугирања. Код ЕЕ емулзија су показане значајно ниже вредности величине капи након центрифугирања у односу на МЕ емулзије. Такође, ове емулзије су показале значајно ниже вредности и у односу на иницијална мерења. За емулзије са Суд је углавном показано да су имале капи највеће величине, док су емулзије са 70ЕтУ током испитивања показивале најмање капи, што је у складу са осталим испитивањима. Код МЕ емулзија су након теста убрзаног старења углавном уочене веће капи у односу на иницијална мерења, могуће као последица промене конзистенције очвршћавањем (Eccleston, 1997a); Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013). Код ЕЕ емулзија су забележене и знатно ниже вредности величине уочених капи у односу на вредности одређене пре теста стреса. Смањење величине капи код ЕЕ емулзија након центрифугирања и након теста стреса је најреалније могуће објаснити чињеницом да су узорци за бројање капи били само мали део израђене пробе и да величина капи није у потпуности релевантан параметар за процену физичке стабилности емулзија (Eccleston, 2001; 1997a); 1997b); Korhonen и сар., 2002; Савић, 2004).

4.2.3. HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и воћних киселина у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ

4.2.3.1. HPLC анализа садржаја ПФ једињења у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ, стабилованих конвенционалним и биодеграбилним мешаним емулгаторима

У испитиваним емулзијама је, као и у ЕПДЈ, анализиран садржај ПФ једињења. ПФ једињења су идентификована и стандардизован је њихов укупан садржај у емулзијама са ЕПДЈ (Табела 17). Хроматограми идентификованих ПФ једињења у МЕ

емулзијама и ЕЕ емулзијама су приказани на Слици 22, док су спектри и структурне формуле идентификованих ПФ једињења приказане на Слици 10.

Једињења која су идентификована скоро у свим испитиваним емулзијама са ЕПДЈ одмах након израде била су: епикатехин, у највећој концентрацији од 285,37 mg/100g код ЕЕ70ЕтУ и процијанидин Б2 (53,22 mg/100g код МЕВУ), хлорогенска киселина (1,26 mg/100g код ЕЕ70ЕтУ) док су кафена киселина, протокатехинска киселина, изокверцетин, кемферол-3-О-глукозид и флоридзин били присутни у концентрацијама нижим од 1,0 mg/100g емулзије (Табела 17 а)). Ова ПФ једињења су била најзаступљенија и у испитиваним ЕПДЈ (Табела 12 а)), али у знатно већим концентрацијама у односу на садржај у емулзијама, с обзиром на концентрацију ЕПДЈ (6%) примењену у изради емулзија са ЕПДЈ. Гална киселина и пирогалол нису идентификовани у испитиваним емулзијама за разлику од одређивања у ЕПДЈ, у којима су били заступљени у вишим концентрацијама у односу на остала ПФ једињења. Деривати кверцетина, флоридзина, епикатехина и хлорогенске киселине такође нису идентификовани у испитиваним емулзијама. Могуће да емулзиони системи нису омогућили потпуно ослобађање ових ПФ једињења и да претходна припрема емулзија са ЕПДЈ која је претходила анализи је била погоднија за анализу осталих идентификованих ПФ једињења.

Садржај ПФ једињења након израде се кретао од 0,001 до 0,29% (за ЕЕ70ЕтУ). Емулзије са ВУ и Суд су имале најнижи садржај ПФ једињења у односу на остале испитиване емулзије. Просечан садржај ПФ једињења у МЕ емулзијама је био око 0,04% док је у ЕЕ емулзијама био 0,10%.

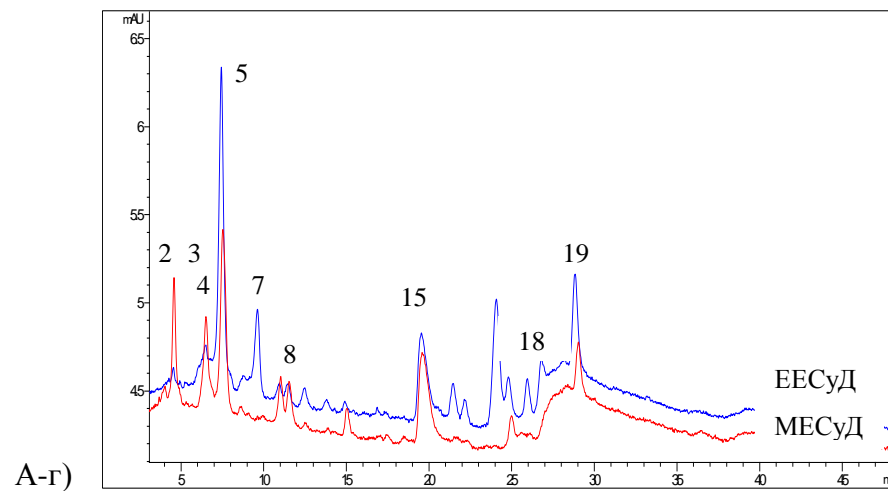
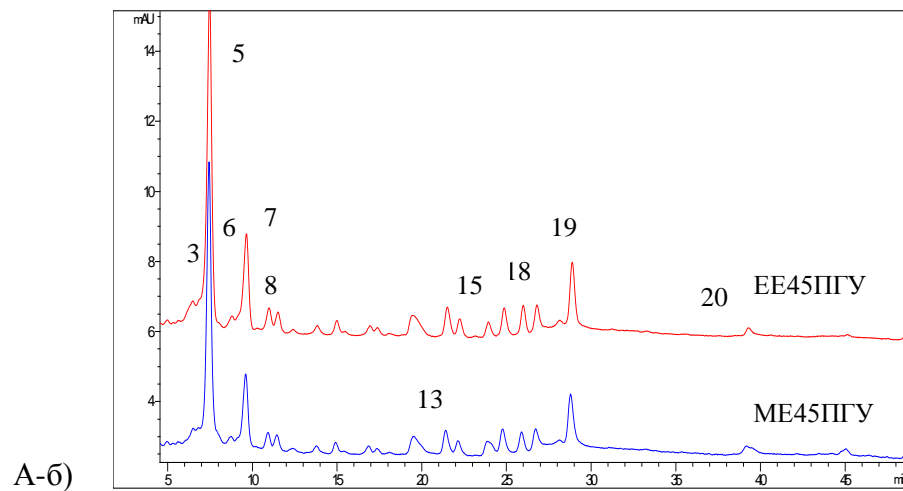
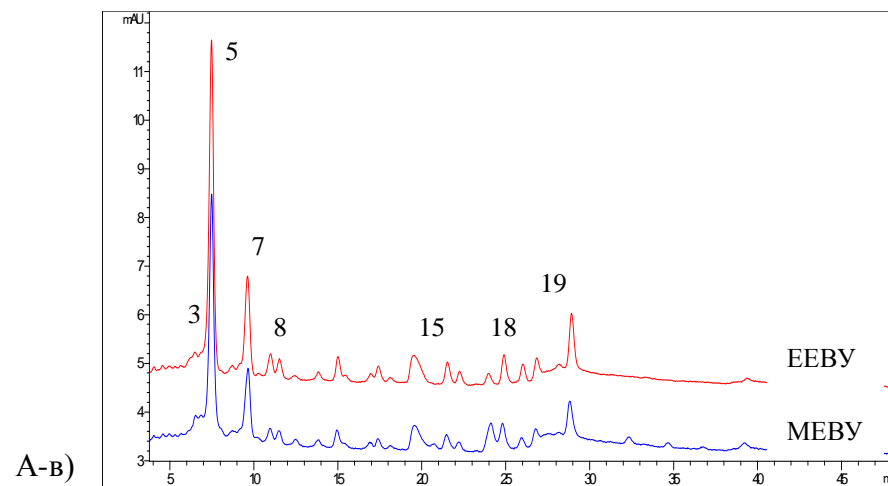
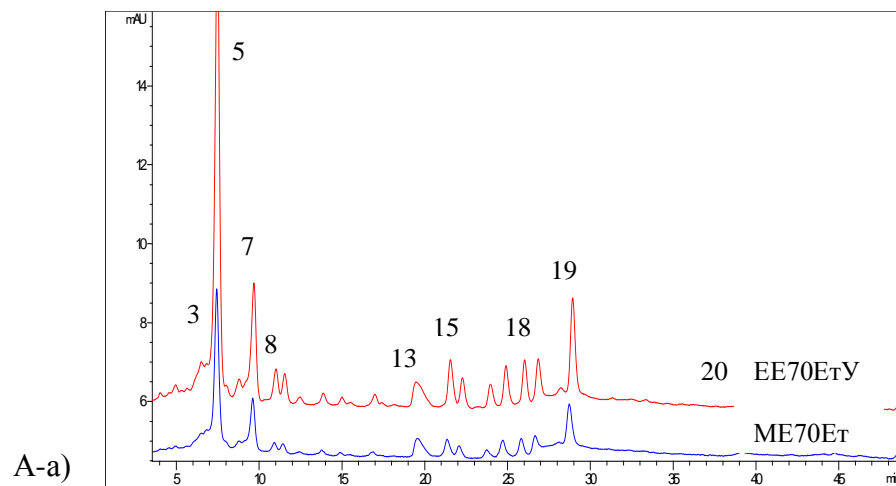
Након чувања у периоду од годину дана на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ је генерално дошло до смањења садржаја ПФ једињења у испитиваним емулзијама са ЕПДЈ, и вредности су биле ниске код свих испитиваних емулзија (око 0,002% и ниже).

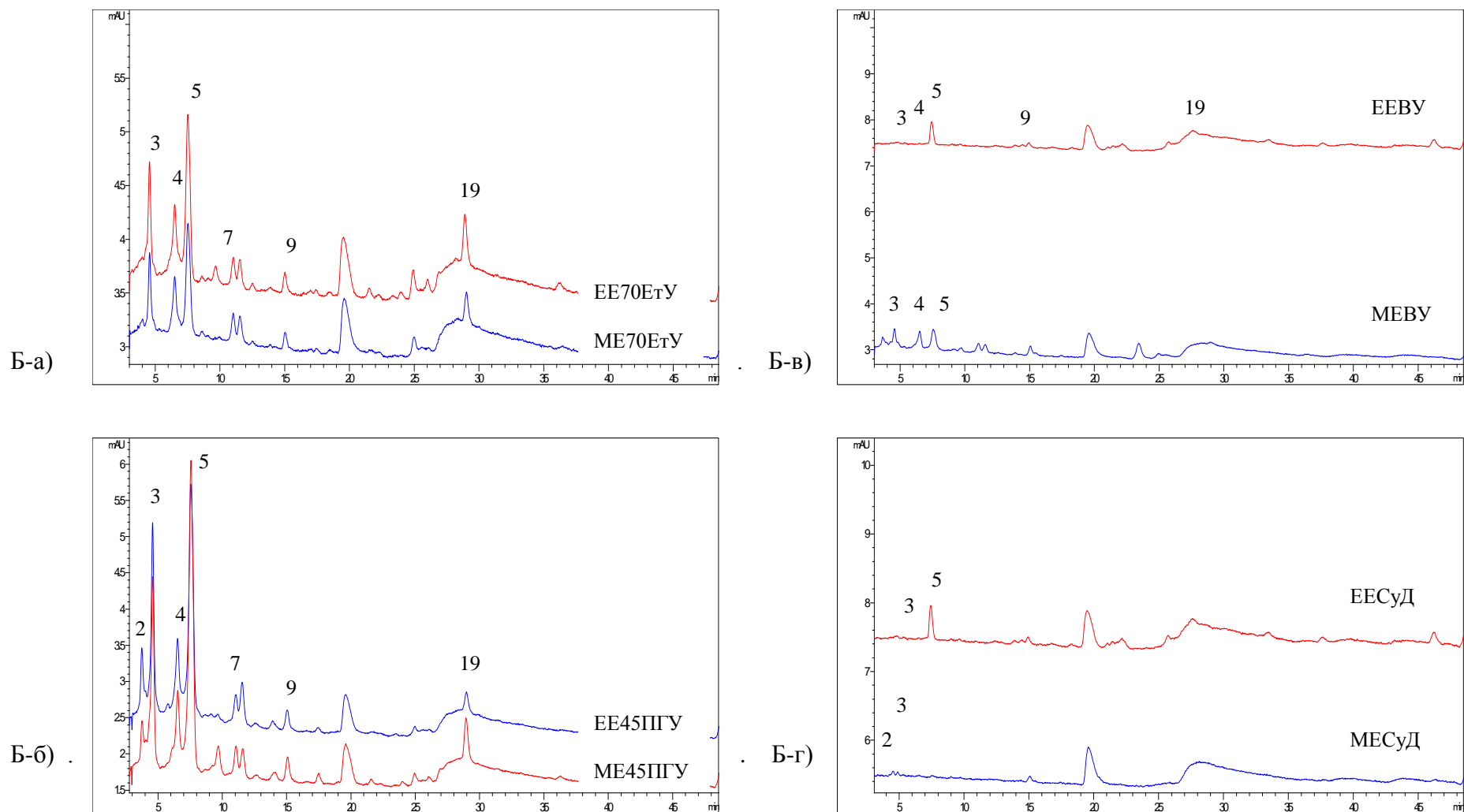
Табела 17. Квалитативни и квантитативни садржај ПФ једињења у емулзијама са ЕПДЈ: а) након израде

Полифенолна једињења (ПФ)		МЕ70ЕтУ	МЕ45ПГУ	МЕВУ	МЕСуД	ЕЕ70ЕтУ	ЕЕ45ПГУ	ЕЕВУ	ЕЕСуД
		mg ПФ / 100g емулзије - након израде							
1	Гална киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Пирогалол	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Протокатехинска киселина	-	-	-	-	0,16	0,13	0,09	-
4	Катехин	-	-	0,52	0,68	-	-	-	-
5	Хлорогенска киселина	0,41	0,86	0,08	0,2	1,26	1,09	0,74	0,28
6	Процијанидин Б2	-	-	53,22	-	-	32,15	-	-
7	Кафена киселина	0,03	0,03	-	0,02	0,03	0,02	0,01	0,04
8	Епикатехин	-	87,53	-	53,68	285,37	130,22	38,66	35,63
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Скополетин	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	0,03	0,05	0,007	-	-	-	-	-
14	Изокверцетин	0,07	0,10	-	0,04	0,17	0,12	0,01	0,08
15	Етил етар протокатехинске киселине	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	0,06	0,08	-	-	0,16	0,11	0,05	0,04
18	Флоридзин	0,47	0,70	-	0,24	1,01	0,83	0,03	-
19	Кверцетин	-	-	-	-	0,02	0,05	-	-
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Дериват флоридзина	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	-	-	-	-	-	-	-
Укупан садржај mg/100g емулзије		1,07	89,35	53,83	54,86	288,34	164,72	35,59	36,07
Процентуални садржај (%)		0,001	0,09	0,05	0,05	0,29	0,16	0,04	0,04

б) Садржај ПФ једињења у емулзијама са ЕПДЈ након годину дана чувања

Полифенолна једињења (ПФ)		МЕ70ЕтУ	МЕ45ПГУ	МЕВУ	МЕСуД	ЕЕ70ЕтУ	ЕЕ45ПГУ	ЕЕВУ	ЕЕСуД
		mg ПФ / 100g емулзије - након годину дана чувања							
1	Гална киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Пирогалол	-	0,12	-	0,67	-	0,07	-	-
3	Протокатехинска киселина	0,13	0,07	0,08	0,06	0,15	0,02	0,12	0,14
4	Катехин	-	-	0,51	-	1,6	1,53	0,08	-
5	Хлорогенска киселина	0,13	0,42	0,05	-	0,19	0,57	0,27	0,68
6	Процијанидин Б2	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Кафена киселина	-	-	-	-	0,01	0,02	0,02	-
8	Епикатехин	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>p</i> -кумарна киселина	-	0,01	-	-	-	0,007	-	-
10	Скополетин	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Синапинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Елагинска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Хиперозид	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Изокверцетин	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Етил етар протокатехинске киселине	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Нарингин	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Флоридзин	0,39	0,11	-	-	0,18	0,24	0,02	-
19	Кверцетин	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Флоретин	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Дериват кверцетина	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Дериват флоридзина	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Дериват хлорогенске	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ферулна киселина	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Дериват епикатехина	-	-	-	-	-	-	-	-
Укупан садржај mg/100g емулзије		0,65	0,73	0,64	0,73	2,13	2,46	0,51	0,82
Процентуални садржај (%)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,002	0,002	0,00	0,00





Слика 22. Хроматограми идентификованих ПФ једињења на 325 nm из Табеле 17. у испитиваним емулзијама са ЕПДЈ: А - након израде; Б - након годину дана чувања: а) ME70EтУ - EE70EтУ; б) ME45ПГУ - EE45ПГУ; в) MEВУ - EEВУ; г) MEСуд - EECуд

4.2.3.2. HPLC анализа садржаја воћних киселина у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ, стабилованих конвенционалним и биодеграбилним мешаним емулгаторима

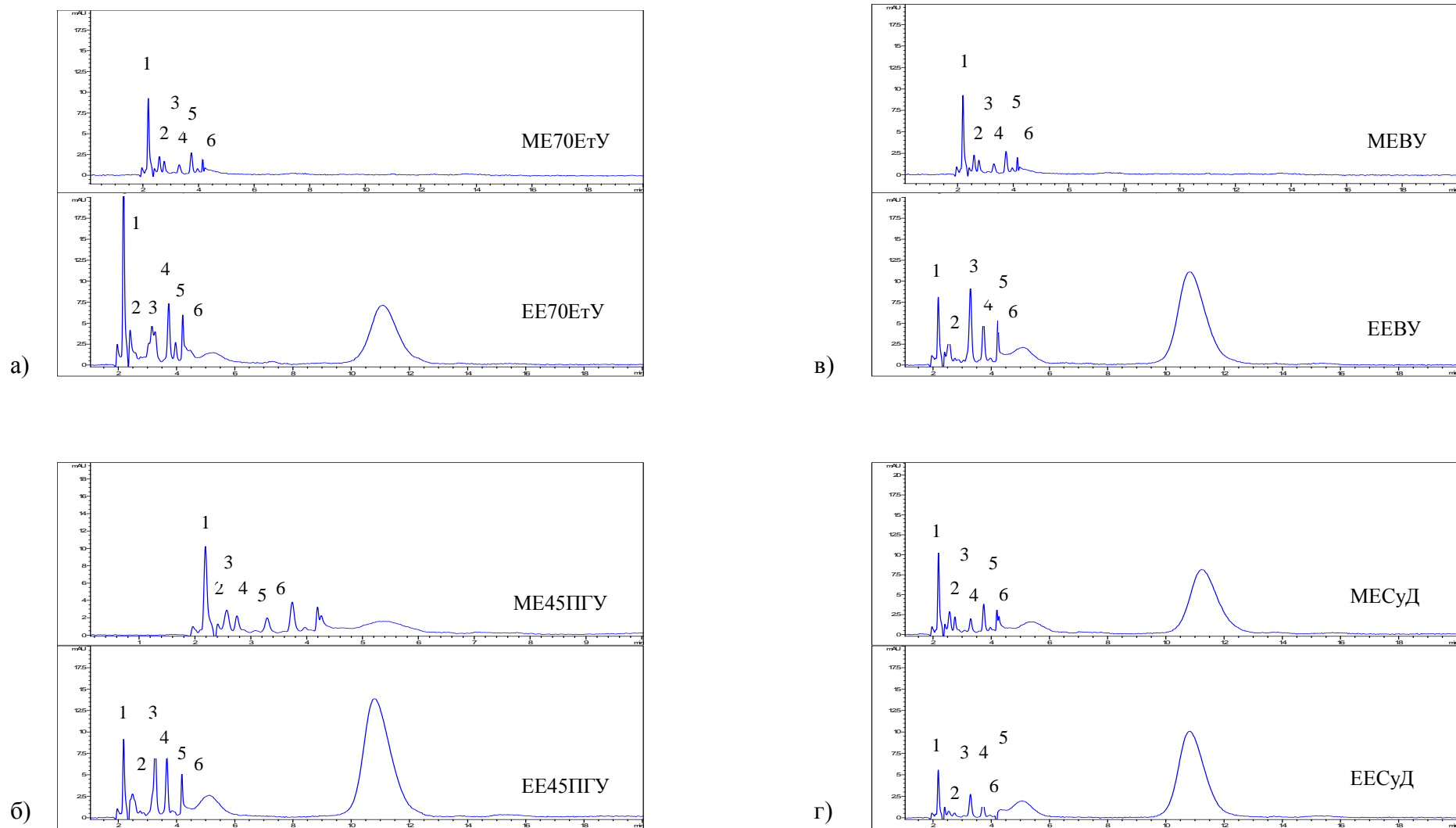
Табела 18. Квалитативни и квантитативни садржај воћних киселина у емулзијама са ЕПДЈ након израде и након годину дана чувања на 22±2°C.

Емулзија	Време	Воћне киселине (ВК)							Укупан садржај	
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.		
		лимунска	јабучна	ћилибарна	винска	пиро грожђана	млечна	*	mg/100 g	%
МЕ емулзије										
МЕ70ЕтУ	израда	1,35	19,75	200,58	6,45	2,79	21,07	-	251,99	0,25
	1 год.	0,73	16,09	130,66	6,11	0,46	5,99	-	160,04	0,16
МЕ45ПГУ	израда	0,22	13,29	43,40	3,27	1,90	7,19	-	69,27	0,07
	1 год.	0,17	10,15	25,87	1,44	1,46	5,09	-	44,18	0,04
МЕВУ	израда	0,21	18,96	138,29	14,10	2,07	4,19	-	177,82	0,18
	1 год.	0,15	10,94	137,69	12,02	0,49	3,85	-	165,14	0,17
МЕСуД	израда	0,51	13,42	103,62	12,88	2,04	8,92	-	141,39	0,14
	1 год.	0,49	6,60	71,65	8,93	0,17	7,09	-	94,93	0,09
ЕЕ емулзије										
ЕЕ70ЕтУ	израда	1,36	18,22	156,05	5,84	3,22	13,79	-	198,48	0,20
	1 год.	0,35	14,27	81,64	5,81	1,29	4,39	-	107,75	0,11
ЕЕ45ПГУ	израда	0,19	14,97	-	2,77	3,75	4,55	-	26,23	0,03
	1 год.	0,15	14,91	-	1,69	3,50	2,52	-	22,77	0,02
ЕЕВУ	израда	0,16	18,29	95,14	12,44	3,13	3,81	-	132,97	0,13
	1 год.	0,13	11,34	73,25	6,18	1,43	2,93	-	95,26	0,10
ЕЕСуД	израда	0,42	9,47	85,27	11,56	0,76	12,35	-	120,13	0,12
	1 год.	0,29	3,41	-	6,52	0,19	-	-	10,41	0,01
Просечан садржај mg/100 g	израда	0,55	15,80	102,79	8,66	2,46	9,48	-	139,79^{a)}	0,14
	1 год.	0,31	10,96	65,09	6,09	1,12	3,98	-	87,56	0,09

* оксална киселина, L-аскорбинска киселина, хининска киселина и бадемова киселина - у истраживању је анализиран и садржај ових ВК, али оне нису детектоване ни у једној испитиваној емулзији са 6% ЕПДЈ, ни након израде ни након чувања, па нису појединачно приказане у Табели 18.

Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен Tukey's тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

^{a)} - садржај ВК у емулзијама након израде vs након годину дана



Слика 23. Хроматограми детектованих ВК након израде из Табеле 18. на 220 nm у испитиваним емулзијама са ЕПДЈ: а) ME70EtY-EE70EtY; б) ME45ПГУ-EE45ПГУ; в) MEBy-EEBy; г) MЕСyД-EECyД; (структурне формуле ВК су приказане на Слици 11. Б.)

Садржај ВК (квалитативни и квантитативни) у емулзијама са ЕПДЈ је приказан у Табели 18. Хроматограми идентификованих ВК у испитиваним емулзијама су приказани на Слици 23. У испитиваним МЕ емулзијама и ЕЕ емулзијама са стандардизованим концентрацијама ВК у ЕПДЈ детектоване су исте ВК (лимонска, јабучна, ћилибарна, винска, пирогрођана и млечна киселина) као и у ЕПДЈ. Оксална киселина, *L*-аскорбинска киселина, хининска киселина и бадемова киселина нису детектоване ни у испитиваним емулзијама са ЕПДЈ.

Ћилибарна киселина је након израде и у емулзијама са ЕПДЈ била присутна у највећој концентрацији (просечно око 102,79 mg/100g емулзије), као и код испитиваних ЕПДЈ. Садржај јабучне киселине је након израде био око 15,80 mg/100g емулзије, млечне киселине је био просечно око 9,48 mg/100g емулзије. Садржај лимонске киселине у емулзијама са ЕПДЈ је након израде био најнижи (просечан садржај 0,55 mg/100g емулзије) у односу на остале идентификоване ВК (Табела 18).

Тип коришћеног емулгатора за стабилизацију испитиваних емулзија није значајно утицао на садржај ВК у емулзијама (Табела 18). Ипак, показан је незначајно бољи просечан садржај ВК (0,16%) у МЕ емулзије након израде у односу на садржај у ЕЕ емулзијама (0,12%). Такође, садржај ВК није се знатно мењао ни у односу на врсту коришћеног ЕПДЈ. Ипак, показан је најнижи садржај ВК након израде у емулзијама са 45ПГУ (од 0,03% до 0,07%). Процентуални садржај ВК у емулзијама са ЕПДЈ након израде је био у распону од 0,03% до 0,25%. У емулзијама са уљаним ЕПДЈ је након израде утврђен добар садржај ВК у односу на остале емулзије (Табела 18) (посебно имајући у виду да је садржај ВК у полазним уљаним ЕПДЈ био нижи у односу на садржај у осталим ЕПДЈ). Једно од објашњења може бити да је уље добро екстраховало ВК из ПДЈ, али да је приликом екстракције на неки начин везало ВК, а да је тек након инкорпорирања ЕПДЈ у емулзијама дошло до ослобађања ВК из уља (Arsić и сар., 2011).

Након чувања од годину дана на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, дошло је генерално до знатног смањења укупног садржаја ВК у емулзијама са стандардизованим ЕПДЈ (0,09%) у односу на садржај након израде (0,14%). Веће смањење садржаја су показале ЕЕ емулзије и просечан садржај је био 0,06%, док је садржај код МЕ емулзија био 0,11%. Ово може потенцијално указати на незнатно бољу стабилност садржаја ВК у МЕ емулзијама, а тиме и ефикасност самих МЕ емулзија. Емулзије израђене са ВУ су током времена доста добро очувале садржај ВК, скоро на истом нивоу (Табела 18), а затим емулзије са 70ЕтУ. Код емулзија са 45ПГУ је и након чувања показан најнижи

садржај ВК у односу на остале емулзије. До највећег смањења у садржају је дошло код емулзија са уљаним ЕПДЈ. Иако је садржај ВК у овим емулзијама био добар након израде, садржај ВК након чувања је био доста мањи него у осталим емулзијама, посебно код ЕЕСуд (Табела 18).

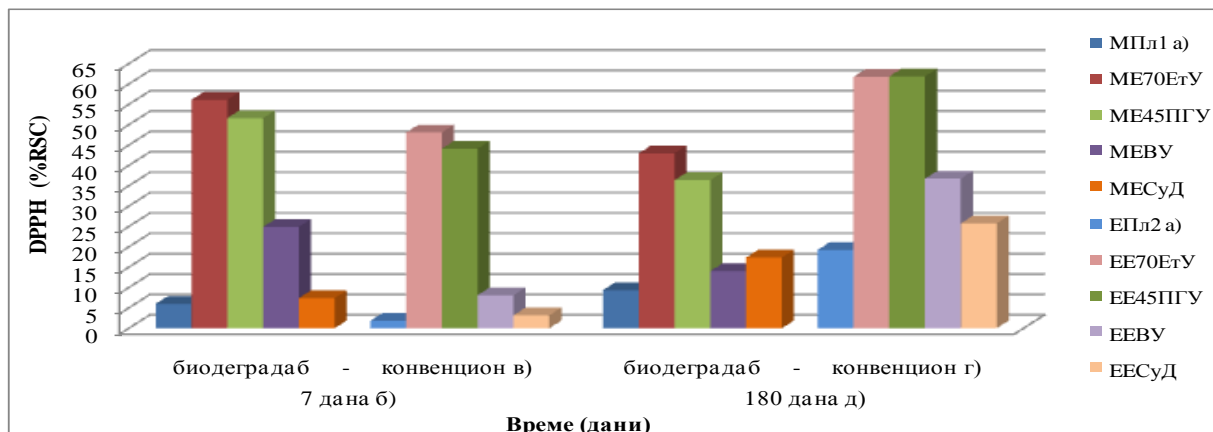
Добијени резултати за просечан садржај ВК у испитиваним емулзијама након израде (0,14%), са 6% било ког ЕПДЈ стандардизоване концентрације ВК и стабилизоване било којим емулгатором, указују на задовољавајући и стабилан садржај ВК у емулзијама у односу на стандардизован просечан садржај ВК у ЕПДЈ након израде (до 2,5%) и примењену концентрацију ЕПДЈ у емулзијама (конц. 6%) (Stojiljković и сар., 2018) (Табела 13).

4.2.4. *In vitro* антиоксидативна активност емулзија са ЕПДЈ

In vitro испитивање АА је изведено са циљем да се процени могућност/оправданост примене ЕПДЈ као антиоксидативне КАС у (дермо)козметичким производима. На основу испитивања ЕПДЈ (Делови 4.1.3. и 4.1.5.), може се претпоставити да ЕПДЈ представљају добар извор биоактивних супстанци са антиоксидативним деловањем. ЕПДЈ који су показали најбољи антиоксидативни потенцијал и највећи садржај антиоксидативних ПФ једињења и ВК су инкорпорирани у емулзионе носаче стабилизоване мешаним емулгаторима (конвенционалним и биодеграбилним). АА ових емулзија је испитивана одређивањем способности „хватања“ слободних радикала (DPPH метод). Мерење је спроведено одмах након израде емулзија, као и 180 дана након чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ заштићене од директне сунчеве светлости. Резултати DPPH теста су приказани као %RSC (Графикон 12).

%RSC вредност за МПл1 и ЕПл2 узорке била је 1,85 и 6,0 %RSC након 7 дана и 9,36 и 19,25 %RSC након 180 дана, респективно (Графикон 12). Сви узорци који су садржали било који ЕПДЈ, као биоактивну супстанцу, показали су значајно бољу *in vitro* АА у односу на плацебо узорке и након 7 и након 180 дана. Бољи *in vitro* антиоксидативни ефекат испитиваних емулзија са ЕПДЈ може се приписати присуству самих ЕПДЈ као КАС, односно, присуству претходно идентификованих ПФ једињења и ВК са антиоксидативним ефектима у ЕПДЈ и у емулзијама са ЕПДЈ (Графикон 2, Табела 12 и Табела 17). Узорци са различитим ЕПДЈ а стабилизовани истим емулгатором су међусобно показали значајну разлику у %RSC након 7 дана. %RSC вредности за испитиване узорке кретале су се у распону од 3,18 %RSC за ЕЕСуд до

56,13 %RSC за ME70EtY. Бољу AA током целокупног периода испитивања су показале емулзије са 70EtY и 45ПГУ у односу на остале емулзије. Незнатно бољу *in vitro* AA након 7 дана израде су показале ME емулзије (од 7,24 %RSC - узорак MECyД, до 56,13 %RSC за узорак ME70EtY), у односу на EE емулзије (3,18 %RSC за узорак EECyД до 48,10 %RSC за узорак EE70EtY).



- а) - AA плацебо узорака vs AA узорака са ЕПДЈ
 б) - Након 7 дана - AA узорака са ЕПДЈ међусобно
 в) - EE емулзије - AA након 7 дана vs 180 дана
 г) - Након 180 дана - AA ME емулзија vs EE емулзија
 д) - Након 180 дана - AA узорака са ЕПДЈ међусобно, осим EE70EtY vs EE45ПГУ

Графикон 12. Антиоксидативна активност емулзија са ЕПДЈ стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима (%RSC) након 7 и 180 дана израде. Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења и упоређивани у односу на примењени ЕПДЈ и емулгатор једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, а промена вредности током времена проверена је Студент т-тестом.

Као контрола свакој од испитиваних ME емулзија коришћен је узорак који је садржао 2% α -токоферола у истом емулзионом носачу стабилованом биодеградабилним емулгаторима. Ова концентрација α -токоферола у емулзијама које су служиле за поређење AA је изабрана као најчешће коришћена концентрација у комерцијалним козметичким производима (Di Mambro и сар., 2003). Етанолни раствор α -токоферола као контроле је показао концентрационо-зависну AA изражену као способност неутрализације слободних радикала (одређене DPPH тестом). Концентрације α -токоферола више од 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ нису показале бољу AA (резултати нису приказани табеларно ни графички). α -токоферол, као референтни антиоксиданс, испољио је неупоредиво бољу AA у односу на испитиване емулзије са ЕПДЈ у смислу способности неутрализације слободних радикала (што потврђују и измерене %RSC вредности од 7,24 до 56,13 % RSC за ME емулзије, односно 21,4 до 89,8 %RSC за

референтни раствор). Ови резултати, као и резултати претходних студија (Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013), указали су на јачу АА α -токоферола у односу на АА ЕПДЈ након инкорпорирања у емулзијама. Ипак, с обзиром да је чист раствор α -токоферола додат у емулзионе носаче у много већим концентрацијама него испитивани ЕПДЈ, као извор антиоксидативних супстанци, могло се очекивати да ће испољити већу способност неутрализације слободних радикала.

Након 180 дана чувања дошло је до промена у АА испитиваних узорака, регистрованих применом DPPH теста (Графикон 12). Након 180 дана измерене вредности су се кретале од 14,03 %RSC за МЕБУ до 61,87 %RSC за ЕЕ45ПГУ. Плацебо узорци су и након 180 дана чувања показали значајно ниже вредности АА у односу на узорке са активним ЕПДЈ, а стабилизировани истим емулгаторима. МЕ емулзије су након 180 чувања углавном показале ниже вредности %RSC у просеку за 20-25% у односу на %RSC вредности измерене након 7 дана чувања. Једино је узорак МЕСуд показао незнатно повећање АА (за 10,15 %RSC јединица) након 180 дана чувања на $22\pm 2^\circ\text{C}$ у односу на вредности након 7 дана. ЕЕ емулзије су показале значајно повећање АА након чувања (61,87 %RSC за ЕЕ45ПГУ до 25,77 %RSC за ЕЕСуд, за ЕПл2 19,25 %RSC) у односу на базалне вредности. Највеће повећање АА је и овде показао узорак са уљаним ЕПДЈ (ЕЕСуд - око 8 пута више). Може се приметити да емулзије са Суд показују слабију АА одмах након израде у односу на АА након чувања. Вероватно да уље коришћено као екстрагенс, услед присуства незасићених масних киселина у структури, на неки начин везује ПФ антиоксидативна једињења, услед чега ПФ не могу да покажу одмах своју АА, и да тек након стајања долази до ослобађања антиоксидативних супстанци и испољавања АА (Aburjai и Natsheh, 2003; Arsić и сар., 2014; 2011; Prottey, 1976). Тип коришћеног емулгатора и коришћеног ЕПДЈ су показали значајан утицај на вредности %RSC измерених након 180 дана чувања. ЕЕ емулзије су након 180 дана показале значајно више вредности %RSC у односу на МЕ емулзије. Емулзије са 70ЕтУ и 45ПГУ су и након 180 дана показале најбољу АА.

ЕПДЈ након инкорпорирања у оба испитивана носача задржали су своју АА, иако слабију у односу на *in vitro* одређену АА самих ЕПДЈ (Део 4.1.5.). Може се претпоставити да је највероватније део ЕПДЈ остао заробљен у структурама које стабилизују испитиване емулзије (присуство течних кристала и код МЕ и код ЕЕ емулзија (Део 4.2.2.1.)) што је потенцијално могло да доведе до снижавања АА ових биљних антиоксиданаса након инкорпорирања у поменуте носаче (Di Mambro и

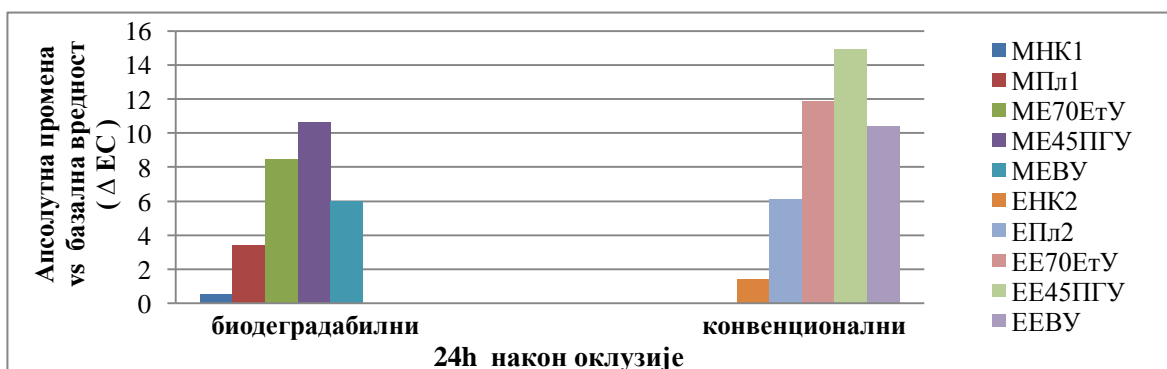
Fonseca, 2005; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; Тасић-Костов, 2013). Такође, ефикасно растварање ЕПДЈ инкорпорираних у носаче (у циљу потпуног ослобађања антиоксидативних компоненти из структура течних кристала унутар емулзије) неопходно је да би мерење АА емулзионих узорака било што прецизније (Di Mambro и Fonseca, 2005). Иако је у овој студији у ту сврху коришћен екстракциони медијум (полисорбат-20/Н₂О у односу 1:5 (m/m)) који су користили и други истраживачи у својим испитивањима (Tasić-Kostov и сар., 2010; 2012; Тасић-Костов, 2013), могло би се претпоставити да је додатни разлог смањене АА ЕПДЈ у емулзијама можда непотпуно ослобађање ЕПДЈ из структура које стабилизују емулзије (Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2010; 2012; Тасић-Костов, 2013). Све наведено може додатно бити, поред смањеног садржаја активних ПФ једињења и ВК у ЕПДЈ током времена, и разлог смањене АА емулзија са ЕПДЈ након чувања (након 180 дана у односу на АА након 7 дана) (Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2010; 2012; Тасић-Костов, 2013). Резултати ове студије потврдили су, свакако, потенцијалну погодност формулисаних емулзија стабилованих мешаним емулгаторима (и конвенционалним и биодеградабилним) да буду носачи за 6% ЕПДЈ са аспекта антиоксидативне ефикасности, као и да је допринос ЕПДЈ као активне супстанце у остваривању антиоксидативног ефекта испитиваних емулзија неоспоран. Такође, формулисане емулзије са 6% стандардизованим ЕПДЈ би потенцијално могле да буду класификоване за примену као (дермо)козметички производи у превенцији и/или третману промена и/или болести на кожи узроковане оксидативним стресом.

4.2.5. *In vivo* карактеризација емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе

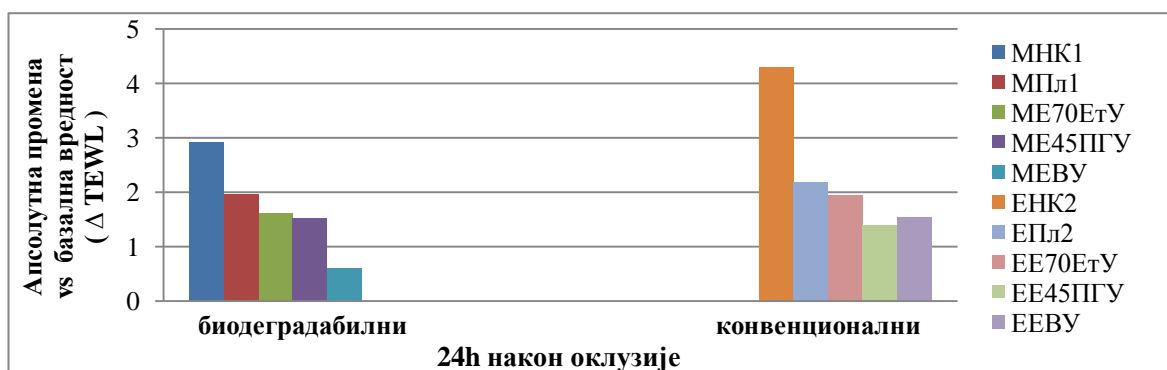
4.2.5.1. Испитивање иритационог потенцијала емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе

Испитивање иритационог потенцијала као дела испитивања безбедносног профила је битан део испитивања (дермо)козметичких производа и представља законску обавезу произвођача (Лукић, 2014; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2014; 2010; Тасић-Костов, 2013; Vinardell и Mitjans, 2008). На здравој кожи добровољаца испитиван је *in vivo* иритациони потенцијал, као део испитивања безбедности примене емулзија са одабраним ЕПДЈ након њихове једнократне апликације на кожи и оклузије у трајању од 24 сата (Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013).

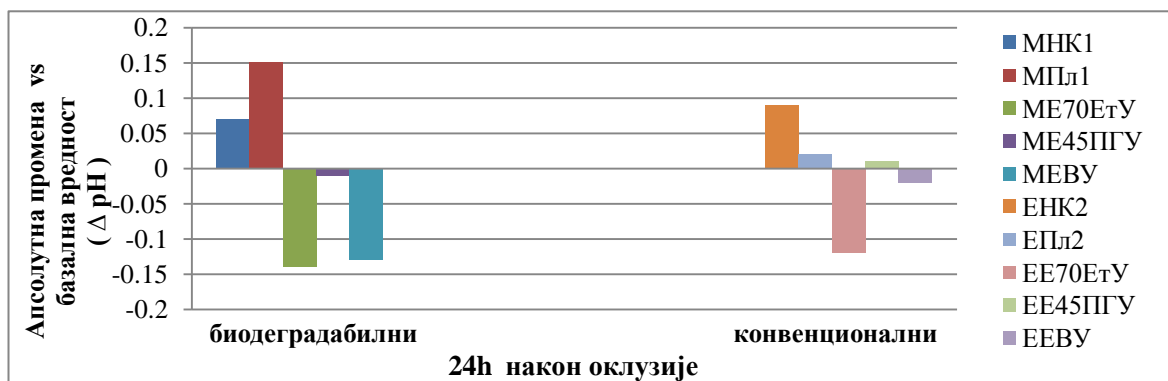
Одсуство или веома низак ниво иритационог потенцијала, односно, повољан безбедносни профил емулзија на бази оба испитивана мешана емулгатора (конвенционални - *EmulgadeSE* и биодеградабилни емулгатор - *MontanovTM*) испитиван је и потврђен и у ранијим студијама (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Savić и сар., 2015; Савић, 2004; Tasić-Kostov и сар., 2012, 2010). У складу са овим литературним подацима, као и на основу резултата добијених у *in vitro* испитивању безбедности и ефикасности примене ЕПДЈ на културама ћелија (Део 4.1.6.), могло би се претпоставити да ће испитиване емулзије са 6% стандардизованих ЕПДЈ, стабилизоване било којим од примењених емулгатора, показати одсуство иритационог потенцијала и у *in vivo* испитивању, као један од аспекта испитивања безбедне примене. На Графикону 13. су приказане апсолутне промене мерених параметара након апликације испитиваних узорака под оклузијом у трајању од 24h, у односу на базалну вредност (ΔEC , $\Delta TEWL$, ΔpH и ΔEI).



- a) а) - EC након оклузије vs EC базално
 б) - ΔEC за ME70EtY, ME45ПГУ vs ΔEC МНК1
 в) - ΔEC за ME70EtY, ME45ПГУ vs ΔEC МПл1
 г) - ΔEC за ЕПл2, EE70EtY, EE45ПГУ vs ΔEC ЕНК1
 д) - ΔEC за EE70EtY, ME45ПГУ vs ΔEC ЕПл1



б)



в)



г)

Емулзије	ЕС	TEWL	pH	EI
	Δ ± SD			
МНК1	0,57±7,71	2,92±5,67	0,07±0,54	9,07±31,85
МПл1	3,40±5,30	1,97±5,05	0,15±0,53	1,00±29,82
ME70ЕтУ	8,45±6,59	1,60±2,86	-0,14±0,42	-1,50±47,52
ME45ПГУ	10,65±8,52	1,52±3,90	-0,01±0,52	-4,86±42,97
МЕВУ	5,99±9,01	0,59±2,80	-0,13±0,38	-6,93±40,13
ЕНК2	1,42±9,59	4,30±11,67	0,09±0,38	8,08±45,55
ЕПл2	6,12±9,12	2,18±2,39	0,02±0,50	1,92±28,55
EE70ЕтУ	11,88±8,30	1,95±8,72	-0,12±0,77	-5,69±50,14
EE45ПГУ	14,90±9,84	1,39±8,03	0,01±0,48	-9,69±29,67
EEВУ	10,45±7,23	1,55±7,83	-0,02±0,47	-6,85±39,80

д)

Графикон 13. *In vivo* одређени иритациони потенцијал, тј. безбедносни профил испитиваних емулзија са ЕПДЈ. Резултати су приказани на графикону као апсолутне промене биофизичких параметара: а) ΔЕС, б) ΔTEWL, в) ΔрН и г) ΔЕИ у односу на базалне вредности, д) Δ ± SD, мерених након апликације испитиваних узорака (емулзије са ЕПДЈ и обе контроле - НК и Пл) под оклузијом у трајању од 24h. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен *Tukey's* тест, док је поређење добијених вредности након оклузије у односу на базалне вредности извршено Студент т-тестом.

Након 24h оклузије долази до значајног пораста нивоа хидратисаности коже на коју је претходно апликована било која од испитиваних емулзија са 6% стандардизованог ЕПДЈ као и плацебо узорак (забележен је пораст у односу на базално измерене вредности) (највише за МЕ емулзије $\Delta EC 10,65 \pm 8,52$ за МЕ45ПГУ и за ЕЕ емулзије $14,90 \pm 9,84$ за ЕЕ45ПГУ). Пораст овог параметра регистрован је и на нетретираној кожи под оклузијом. Повећање параметра ЕС на свим испитиваним деловима подлактица могло би се приписати добрим делом самој оклузији. Међутим, показано је и да су све емулзије са активним ЕПДЈ након примене у односу на нетретиране контроле ефикасније хидратисале кожу (Графикон 13 а)). Значајно веће ЕС вредности након примене емулзија са ЕПДЈ регистроване су и у односу на ЕС вредности након наношења плацебо узорака. У том контексту, повећање хидратисаности коже након примене емулзија са ЕПДЈ, као КАС, би се највећим делом могло приписати присуству влажећих активних супстанци (воћних киселина, као и ПФ једињења) у испитиваним ЕПДЈ и емулзијама са ЕПДЈ (Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010), а делом и самој оклузији и емулзионом носачу. Тип коришћеног емулгатора је показао значајан утицај на хидратисаност коже након наношења емулзија са ЕПДЈ. ЕЕ емулзије су показале значајно бољи утицај на хидратисаност коже након оклузије у односу на МЕ емулзије. Међутим, може се приметити да МПл1 у односу на МНК1 није показао значајно повећање хидратисаности коже, док је ЕПл2 у односу на ЕНК2 показао значајно повећање. Ово би могло да укаже на чињеницу да, можда, већа хидратисаност коже до које долази након наношења ЕЕ емулзија је већим делом последица деловања самог емулзионог носача. Односно, нешто већа количина воде у основној формулацији у ЕЕ емулзијама у односу на МЕ емулзије, је остала као „слободна“ вода (ланци ПОЕ из конвенционалног емулгатора, који због своје хидрофилности, имају способност да интензивно везују воду, нису још увек везали воду), и она би потенцијално могла иницијално додатно да хидратише кожу након наношења ЕЕ емулзија (Табела 9) (Eccleston, 1997; Тасић-Костов, 2013).

Након апликације сваке од испитиваних емулзија са ЕПДЈ услед оклузије у трајању од 24 сата, измерене вредности за TEWL биле су веће, али без значајности у односу на базалне вредности. $\Delta TEWL$ за испитиване узорке са биоактивним ЕПДЈ у односу на $\Delta TEWL$ за обе одговарајуће контроле је била незнатно мања (Графикон 13 б)). Ови налази могу указати на потенцијално добар утицај формулисаних емулзија обогаћених са 6% ЕПДЈ након оклузије у трајању од 24 сата на баријерну функцију

коже. Добијени резултати могу указати да, највероватније, сама оклузија доводи до смањења баријерне функције SC-a, а самим тим и пораста TEWL-a и да повећање вредности TEWL-a у односу на одговарајуће базалне вредности није последица примене емулзија са ЕПДЈ. У прилог томе иду и добијени резултати за делове коже која су служила као нетретирана контрола под оклузијом (НК), где је дошло до незнатног пораста вредности TEWL-a. Тип коришћеног ЕПДЈ, као и тип коришћеног емулгатора нису значајно утицали на промену вредности параметра TEWL.

Киселе рН вредности локално апликованих производа најчешће доводе до иритације коже, при чему је често ова иритација праћена и појавом еритема, смањујући физиолошку рН вредност коже (Smith, 1996; Tasić-Kostov и сар., 2012). Уколико се посматрају промене рН вредности третиране коже (пре и након апликације испитиваних узорка са киселим ЕПДЈ под оклузијом) и упореде са променама исте вредности обе нетретиране контроле (Графикон 13 в)) може се закључити да је дошло до незнатног пада рН коже на местима третираним сваким од узорка који је садржао 6% неког од испитиваних ЕПДЈ (који су и сами показали благо киселе рН вредности) (Делови 4.1.2.2.1. и 4.2.1.2.1.) (Stojiljković и сар., 2016а)). Ово се може објаснити и киселом природом испитиваних ЕПДЈ, односно присуством воћних киселина, као киселих активних супстанци у ЕПДЈ, тј. емулзијама са ЕПДЈ (Stojiljković и сар., 2018; 2016а); Тасић-Костов, 2013).

Смањење рН коже након апликације испитиваних узорка није довело до њене иритације. Треба нагласити изостанак значајне промене параметра ЕИ у односу на базалну вредност након третмана сваким од испитиваних емулзионих узорка, имајући у виду да је иритација коже углавном праћена значајним порастом управо овог параметра (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Savić и сар., 2011, 2009; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013). Све емулзије са 6% стандардизованог ЕПДЈ су након наношења довеле до незначајног пада ЕИ у односу на базалне вредности, што може ићи у прилог чињеници да ове емулзије са ЕПДЈ не доводе до иритације, већ је и умањују након оклузије. Такође, треба напоменути да је до незнатног повећања ЕИ дошло на нетретираним местима у односу на базалне вредности, вероватно као последица оклузије. Плацебо узорци су такође довели до незнатно благог повећања параметра ЕИ, али доста мање него на нетретираним местима (Графикон 13 г)). Такође, емулзије са ЕПДЈ су довеле до незнатног смањења вредности ЕИ у односу на обе одговарајуће контроле, и додатно умањиле иритацију коже насталу услед оклузије. На основу овога би се потенцијално могло закључити да емулзиони носачи након наношења на кожу

вероватно делом умањују насталу иритацију коже (Лукић, 2013; Савић, 2015; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013), која настаје превасходно као последица оклузије, али и да је присуство ЕПДЈ у емулзијама веома битно као и да је допринос ЕПДЈ у смислу смањења настале иритације након оклузије неоспоран. Односно, присуство антиоксидативних ПФ једињења и ВК са влажећим ефектом у испитиваним ЕПДЈ и емулзијама са ЕПДЈ у највећем обиму доводе до побољшања општег стања коже након примене емулзија под оклузијом, и умањују насталу иритацију узроковану самом оклузијом. Умањење иритације на местима где су наносене емулзије са ЕПДЈ је, вероватно и делом, последица добре хидратације након наношења емулзија са ЕПДЈ, услед присуства ЕПДЈ као извора влажећих и антиоксидативних супстанци (Stojiljković и сар., 2018). Тип коришћеног ЕПДЈ није значајно утицао на промену ЕИ параметра. Иако не постоји значајна разлика у типу коришћеног емулзионог носача, из резултата се може претпоставити да биодеграбилни емулгатори доводе до мање иритације коже ($\Delta E I$ за МПл1 је било $1,00 \pm 29,82$) у односу на конвенционалне носаче ($\Delta E I$ за ЕПл2 $1,92 \pm 28,55$). У прилог томе иде и чињеница да емулзије стабилизоване оваквим конвенционалним емулгаторима могу иритирати кожу и повећати параметре ЕИ и TEWL (Bárány и сар., 2000; Тасић-Костов, 2013).

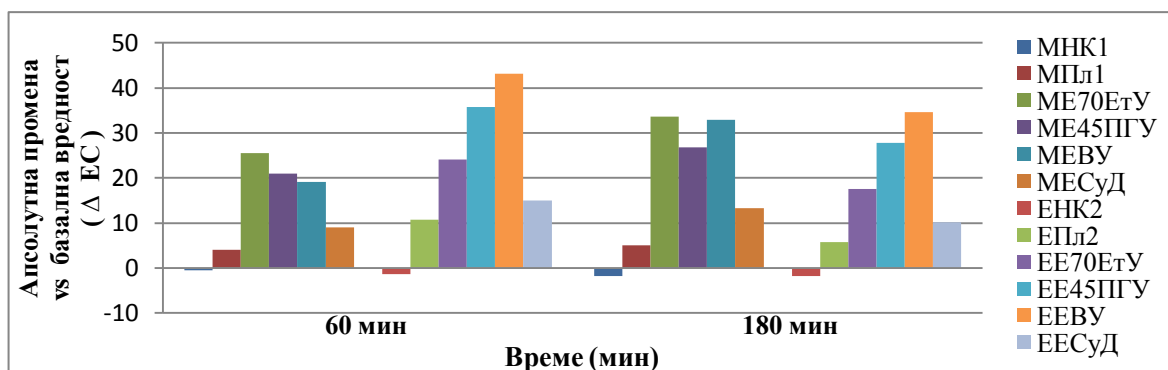
Испитиване емулзије су показале повољне ефекте на кожи под одређеним условима и нису довеле до иритације коже након наношења под оклузијом, што може указати на повољан *in vivo* неиритирајући потенцијал емулзија са ЕПДЈ као дела испитивања безбедносног профила испитиваних емулзија са 6% ЕПДЈ, стабилованих мешаним емулгаторима (у смислу изостанка локалних нежељених ефеката, изостанка негативног утицаја на рН коже и њена баријерна својства и повећања њене хидратације).

4.2.5.2. Процена ефикасности емулзија са ЕПДЈ - биофизичке методе

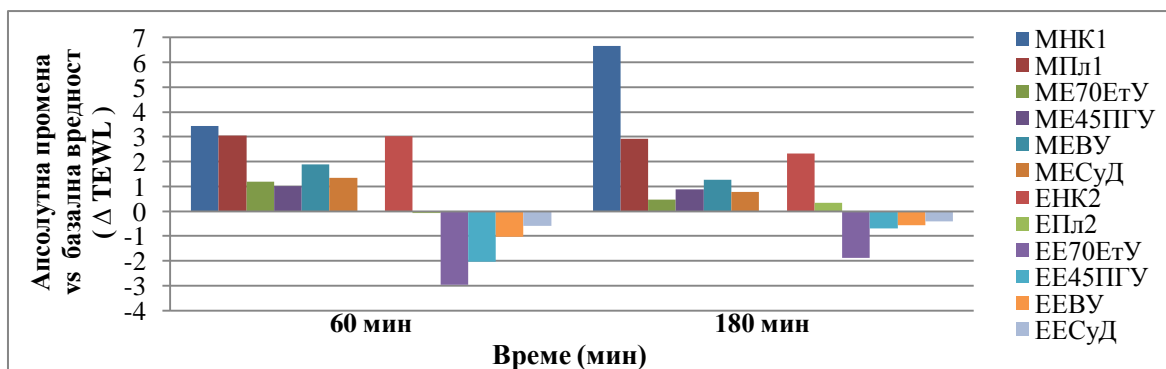
4.2.5.2.1. In vivo испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – краткотрајна студија

У складу са водичима, препорукама и ранијим научним публикацијама, као и могућношћу сарадње са испитаницима и поштовања упутстава за адекватно спровођење испитивања, и у односу на број испитаника који су учествовали у овој студији (Arsić и сар., 2011; Berardesca, 1997; 1999; Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Jaksić и сар., 2012; Regulation (EC) No 1223/2009; Лукић, 2014; Mahrhauser и сар., 2015; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2014;

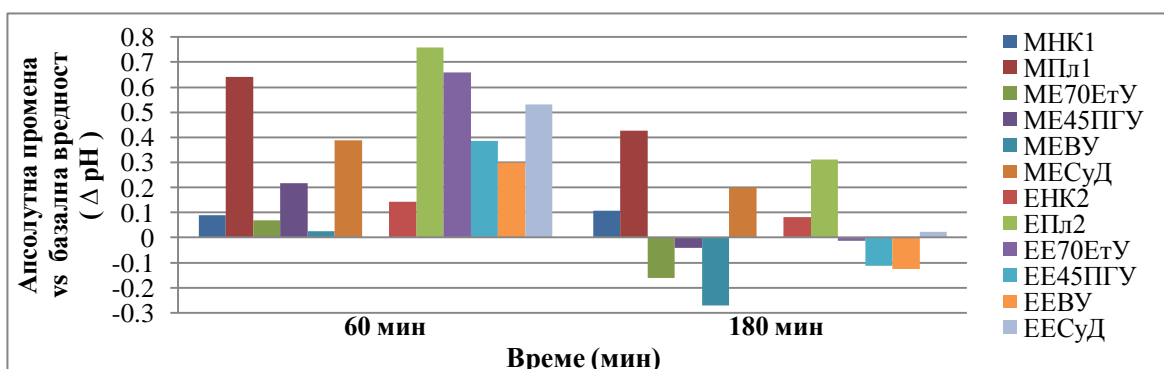
Тасић-Костов, 2013; Žugić и сар., 2015) извршено је прелиминарно испитивање краткотрајне ефикасности испитиваних емулзија са ЕПДЈ, које може послужити као основ за даља испитивања ефикасности емулзија са ЕПДЈ. Резултати ове прелиминарне студије су послужили и за дефинисање и избор емулзија са ЕПДЈ које су коришћене у дуготрајној студији ефикасности на већем броју испитаника у оквиру ове докторске дисертације. Испитивање ефикасности емулзија са 6% стандардизованих ЕПДЈ на кожи здравих хуманих добровољаца у краткотрајној прелиминарној студији вршено је мерењем специфичних биофизичких параметара на кожи у краткотрајној трочасовној студији. Мерени су: ЕС у циљу процене влажећег ефекта, TEWL у циљу процене утицаја емулзија са ЕПДЈ на кожну баријеру, ЕИ и рН коже у циљу процене степена иритације и оштећења која би могла настати као последица примене емулзија са киселим активним супстанцама (ЕПДЈ) на кожу као и МI у циљу процене утицаја емулзија са 6% ЕПДЈ на боју коже, и потенцијалну способност емулзија са ЕПДЈ за посветљивањем коже. Резултати су приказани на Графикону 14, као апсолутне промене мерених параметара у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ ЕС, Δ TEWL, Δ рН, Δ ЕИ и Δ MI). Мерења су спроведена иницијално (базалне вредности) као и 60 мин, односно 180 мин након апликације испитиваних узорака.



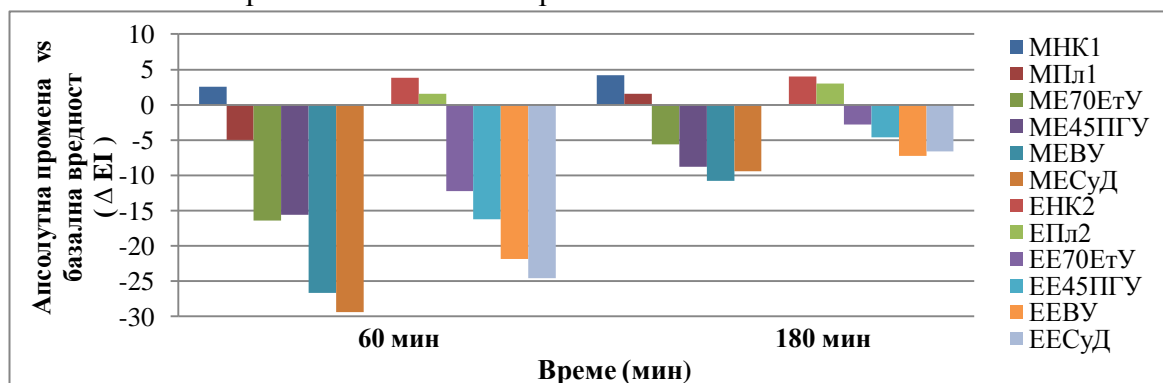
- а) а) - ЕС након 60 мин vs ЕС базално
 б) - ЕС након 180 мин vs ЕС базално
 в) - Δ ЕС након 60 мин за ME70EтУ и ME45ПГУ vs након 60 мин МНК1
 г) - EE емулзије - Δ ЕС 60 vs Δ ЕС 180
 д) - Δ ЕС након 60 мин за EE45ПГУ и EEBУ vs Δ ЕС након 60 мин ЕНК2



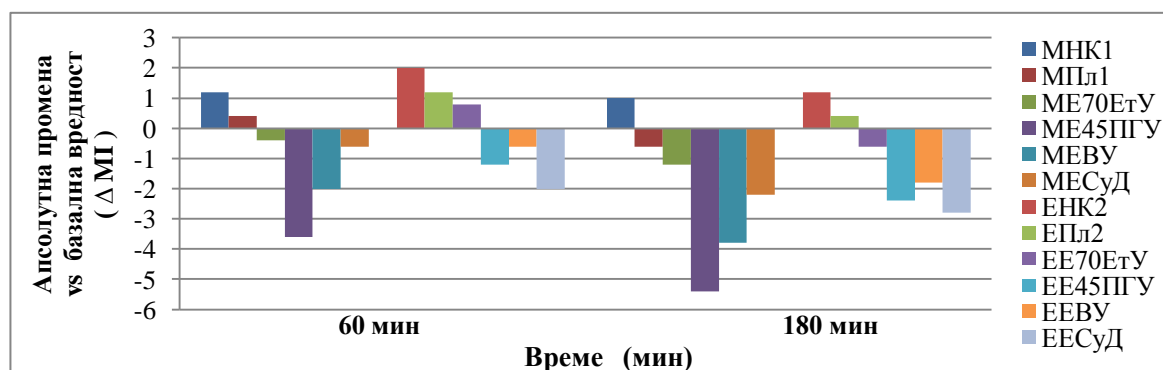
- б) а) - Δ TEWL МЕ емулзија vs Δ TEWL ЕЕ емулзија
 б) - TEWL МЕ емулзија након 60мин vs TEWL базално
 в) - TEWL МЕ емулзија након 180мин vs TEWL базално



- в) а) - pH након 60 мин vs pH базално
 б) - Δ pH након 60 мин vs Δ pH након 180 мин



- г) а) - Δ EI након 60 мин vs Δ EI након 180 мин
 б) - EI МЕ емулзија након 60 мин vs EI базално



д)

Емулзије	ЕС		TEWL		рН		ЕИ		МИ	
	60 мин	180 мин	60 мин	180 мин	60 мин	180 мин	60 мин	180 мин	60 мин	180 мин
	$\Delta \pm SD$									
МНК1	-0,44±1,87	-1,78±1,85	3,44±2,66	6,67±7,94	0,09±0,16	0,11±0,34	2,6±16,13	4,20±21,88	1,20±9,12	1,00±8,06
МПл1	4,04±6,24	5,02±8,99	3,06±3,37	2,92±2,85	0,64±0,42	0,43±0,57	-5,00±29,83	1,60±33,95	0,40±4,77	-0,60±2,97
МЕ70ЕтУ	25,50±10,12	33,70±23,43	1,18±0,16	0,46±2,64	0,07±0,84	-0,16±0,71	-16,40±33,08	-5,60±31,29	-0,40±6,19	-1,20±8,34
МЕ45ПГУ	21,04±20,89	26,76±28,51	1,02±1,41	0,88±1,15	0,22±0,32	-0,04±0,62	-15,60±5,77	-8,80±19,31	-3,60±6,47	-5,4±18,72
МЕВУ	19,14±11,69	32,92±29,66	1,90±1,44	1,28±1,43	0,03±0,28	-0,27±0,39	-26,60±5,59	-10,80±19,34	-2,00±6,12	-3,8±12,36
МЕСуд	9,10±2,54	13,3±16,77	1,34±0,61	0,78±0,69	0,39±0,23	0,20±0,22	-29,40±9,15	-9,40±5,27	-0,60±9,61	-2,20±9,78
ЕНК2	-1,38±3,20	-1,76±3,78	3,02±6,85	2,34±4,65	0,14±0,57	0,08±0,73	3,80±8,87	4,00±18,21	2,00±10,70	1,20±11,67
ЕПл2	10,78±5,57	5,84±5,01	-0,06±1,06	0,34±0,53	0,76±0,84	0,31±0,57	1,60±33,72	3,00±26,14	1,20±11,07	0,40±13,79
ЕЕ70ЕтУ	24,18±30,43	17,64±32,24	-2,96±3,02	-1,88±3,83	0,66±0,65	-0,01±0,15	-12,20±39,01	-2,80±10,21	0,80±17,29	-0,6±12,89
ЕЕ45ПГУ	35,82±25,13	27,84±26,96	-2,04±2,09	-0,68±2,35	0,39±0,44	-0,11±0,29	-16,20±45,99	-4,60±39,20	-1,20±7,29	-2,4±12,18
ЕЕВУ	43,16±21,63	34,70±22,34	-1,02±1,71	-0,56±2,53	0,30±0,34	-0,13±0,13	-21,80±48,89	-7,20±39,20	-0,6±13,87	-1,80±9,98
ЕЕСуд	14,98±6,58	10,12±5,86	-0,6±0,41	-0,42±0,88	0,53±0,41	0,02±0,14	-24,6±18,8	-6,60±40,65	-2,0±14,19	-2,8±19,87

ђ)

Графикон 14. *In vivo* ефикасност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) у краткотрајној студији. Резултати су приказани као апсолутне промене биофизичких параметара: а) Δ ЕС, б) Δ TEWL, в) Δ рН, г) Δ ЕИ, д) Δ МИ у односу на базалне вредности, ђ) $\Delta \pm SD$, мерених након апликације испитиваних узорака током времена. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен, *Tukey's* тест, док је поређење добијених вредности у различитим временским интервалима извршено Студент т-тестом.

Све испитиване емулзије са ЕПДЈ су показале значајно повећање ЕС, односно, сви узорци су значајно повећали хидратисаност коже након наношења на кожу здравих добровољаца, и након 60 минута и након 180 минута у односу на базалне вредности (Графикон 14 а)). Значајна разлика у хидратационом потенцијалу емулзија са ЕПДЈ није постојала у односу на врсту коришћеног ЕПДЈ, мада су емулзије са воденим екстрактом (ВУ) показале најбољи ефекат хидратације у односу на остале испитиване емулзије са ЕПДЈ (Δ ЕС 32,92±29,66 за МЕВУ и 34,7±22,34 за ЕЕВУ). Могуће да је добар влажећи ефекат емулзија са ВУ последица деловања ВК из ВУ-ЕПДЈ, као добрих влажећих агенаса, чији је процентуални садржај одређен и показан као добар у емулзијама са ВУ-ЕПДЈ у односу на емулзије са осталим ЕПДЈ (Део 4.1.4.2. и Део 4.2.3.2.). Емулзије са екстрактом добијеним сунцокретовим уљем, посебно ЕЕСуд, су показале најслабији влажећи потенцијал (Δ ЕС 13,3±16,77 за МЕСуд и 10,12±5,86 за ЕЕСуд), вероватно услед ниже концентрације воћних киселина као влажећих супстанци. Све емулзије са ЕПДЈ су показале незнатно бољи влажећи ефекат у односу на обе контроле. Δ ЕС за МЕ70ЕтУ (Δ ЕС 25,5±10,12) и МЕ45ПГУ (Δ ЕС 21,04±20,90)

након 60 мин је била значајно већа у односу на Δ ЕС за МНК1 (Δ ЕС $-0,44 \pm 1,87$) након 60 мин. Δ ЕС за ЕЕ45ПГУ (Δ ЕС $35,82 \pm 25,13$) и ЕЕВУ (Δ ЕС $43,16 \pm 21,63$) након 60 мин је такође била значајно већа од Δ ЕС за ЕНК2 (Δ ЕС $-1,38 \pm 3,20$) након 60 мин. Сходно добијеним резултатима у овој прелиминарној *in vivo* студији, могло би се претпоставити да присуство ВК, као и ПФ једињења, у ЕПДЈ значајно утиче на повећање хидратисаности коже након краткотрајне примене емулзија са ЕПДЈ, и да је допринос ЕПДЈ, као активне супстанце у остваривању влажећег ефекта формулисаних емулзија, неоспоран. Присуство емолијенаса у емулзијама са ЕПДЈ као и присуство фаза течних кристала које стабилизују емулзије, такође делом повећавају хидратисаност коже након наношења емулзија, што је и раније показано (Лукић, 2014; Савић, 2004; Савић, 2015; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Значајна разлика у повећању хидратисаности коже у односу на примењени емулгатор није постојала. ЕЕ емулзије су 60 мин након наношења довеле до незнатно веће хидратисаности коже у односу на МЕ емулзије, док је након 180 мин регистровано да емулзије стабилизоване било којим од коришћених мешаних емулгатора, а са инкорпорираним истим ЕПДЈ доводе до сличног повећања хидратисаности коже. Хидратисаност коже током 180 минута након наношења ЕЕ емулзија је била значајно већа у односу на базално добијене вредности. Већа хидратација коже 60 мин након наношења ЕЕ емулзија могуће да може бити последица бољег иницијалног влажећег ефекта, односно бољег стартног ослобађања веће количине воде из самих ЕЕ емулзија. Такође, ЕЕ емулзије су у основној формулацији имале нешто већу количину воде, која као слободна вода, је могла допринети иницијално бољој хидратацији коже. Повољан влажећи ефекат емулзија стабилованих мешаним емулгаторима у краткотрајној студији су показали и други аутори (Arsić и сар., 2011; Савић, 2015, Тасић-Костов, 2013). Коришћени конвенционални емулгатор, иако стабилизује ЕЕ емулзије фазом течних кристала, он у свом хидрофилном делу садржи велики број ПОЕ група, које због своје јаке хидрофилности могу интензивно да везују воду током времена, па долази до накнадне структурације, односно очвршћавања, што потенцијално може резултовати лошим карактеристикама емулзија и ефектима које могу да покажу током времена, због чега је влажећи ефекат ових емулзија и био слабији након 180 минута у односу на МЕ емулзије (Eccleston, 1997a); Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013). МЕ емулзије су показале задовољавајући прелиминарни влажећи ефекат на кожи, који је значајно испољен након 180 мин након наношења и који је био незнатно бољи у односу на

ефекат који су показале ЕЕ емулзије након 180 минута. Формулисане МЕ емулзије стабилизоване фазом течних кристала, која је слична и компатибилна са структуром липида у SC-у поседују већи потенцијал за инкорпорирање великог броја и хидрофилних и липофилних супстанци (Makai и сар., 2003; Тасић-Костов, 2013), при чему пружају већу могућност контролисане и одложене хидратације коже (Junginger, 1997; Савић, 2004; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013). Такође, МЕ емулзије су показале и бољи садржај ВК, које поседују добар влажећи потенцијал, у односу на ЕЕ емулзије, чиме се потенцијално може објаснити и боља способност хидратације коже након наношења МЕ емулзија (Лукић, 2014; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013).

Тип ЕПДЈ инкорпорираних у емулзијама стабилованих било којим коришћеним емулгаторима није значајно утицао на промену TEWL-а након апликације узорака (током трочасовног испитивања). Емулзија EE70EtY је у највећој мери штитила интегритет коже (Δ TEWL је било $-1,88 \pm 3,83$ након 180 мин), али без значајности у односу на остале емулзије (Графикон 14 б)). Врста примењеног емулгатора за стабилизацију емулзија са 6% ЕПДЈ показала је значајан утицај на TEWL. Након 60 минута од апликације испитиваних узорака, ЕЕ емулзије довеле су до смањења TEWL-а, али тај тренд није настављен током трочасовне анализе. Поред способности да својим ПОЕ ланцима везују воду (Eccleston, 1997a); 1997b); Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013) и тиме допринесу смањењу влажећег потенцијала током времена, познато је да примена емулзија стабилованих традиционално коришћеним емулгаторима повећава TEWL током времена и показује неповољан утицај на баријерна својства коже услед промена које изазивају на нивоу ламеларних липида SC-а и интерцелуларног матрикса (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013). За разлику од ЕЕ емулзија, МЕ емулзије нису довеле до значајнијих промена TEWL вредности током целокупног периода испитивања. Одсуство промена у TEWL вредностима након наношења МЕ емулзија могло би се објаснити сличношћу течне кристалне структуре узорака стабилованих биодеградабилним емулгаторима са структуром физиолошких липида коже (Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013).

Примена свих емулзија (независно од примењеног ЕПДЈ или емулгатора) је довела до значајног повећања рН вредности коже 60 мин након апликације у односу на базалне вредности рН коже. Резултати указују да ЕЕ емулзије доводе до незнатно већег повећања рН коже након 60 мин од апликације у односу на МЕ емулзије. Могуће да након 60 мин од апликације није још увек дошло до ослобађања киселих ВК из

емулзија и инкорпорираних ЕПДЈ које би довеле до смањења рН вредности коже. Након 180 мин од апликације скоро сви испитивани узорци довели су до незнатног смањења рН вредности коже, што се свакако може објаснити киселом природом активних ЕПДЈ и њиховим рН вредностима (Графикон 1). Утицај рН вредности активних супстанци у емулзијама на рН вредност коже након апликације емулзија су показали и други аутори (Лукић, 2014; Савић, 2004; Савић, 2015; Тасић-Костов, 2013). Врста коришћеног ЕПДЈ није значајно утицала на рН вредности коже у овом испитивању (Графикон 14 в)). Након примене емулзија са Суд на кожи испитаника је и након 180 минута регистровано незнатно повећање рН вредности у односу на базално измерене рН вредности коже. Емулзије са ВУ су довеле до највећег смањења рН вредности коже током времена у односу на остале емулзије, што се свакако може објаснити чињеницом да је овај екстракт показао и најниже рН вредности у односу на остале екстракте (Део 4.1.2.2.1, Графикон 1). Тип емулгатора, такође, није значајно утицао на рН вредности коже испитаника након апликације емулзија током времена.

Треба посебно напоменути одсуство значајног утицаја испитиваних емулзија са ЕПДЈ на промену ЕИ параметра (у односу на базалне вредности) након апликације (независно од врсте ЕПДЈ или емулгатора) и у односу на обе контроле, имајући у виду да је иритација коже генерално праћена повећањем овог параметра (Лукић, 2014; Савић, 2004; Савић, 2015; Тасић-Костов, 2013). Шта више, примена емулзија са активним ЕПДЈ је довела до незнатног смањења ЕИ параметра током целокупног трочасовног прелиминарног испитивања, чиме је на неки начин потврђен неиритирајући потенцијал и потенцијална безбедна примена испитиваних емулзија са ЕПДЈ током краткотрајне апликације. Може се претпоставити да присуство биоактивних ПФ једињења и воћних киселина у ЕПДЈ може показати повољне ефекте на кожи здравих испитаника након краткотрајне апликације емулзија са ЕПДЈ, као и да не доводи до иритације коже након њихове примене. Повољне неиритирајуће, односно антииритирајуће ефекте емулзија са ПФ једињењима и ВК из групе α -хидрокси киселина, као активним супстанцама и стабилизоване истим емулгаторима су показали и други аутори (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Тип примењеног ЕПДЈ није значајно утицао на вредности ЕИ параметра, као ни тип примењеног емулгатора. Ипак, МЕ емулзије су показале незнатно боље ефекте у односу на ЕЕ емулзије у смислу нижег иритационог потенцијала и бољег потенцијалног безбедносног профила (Графикон 14

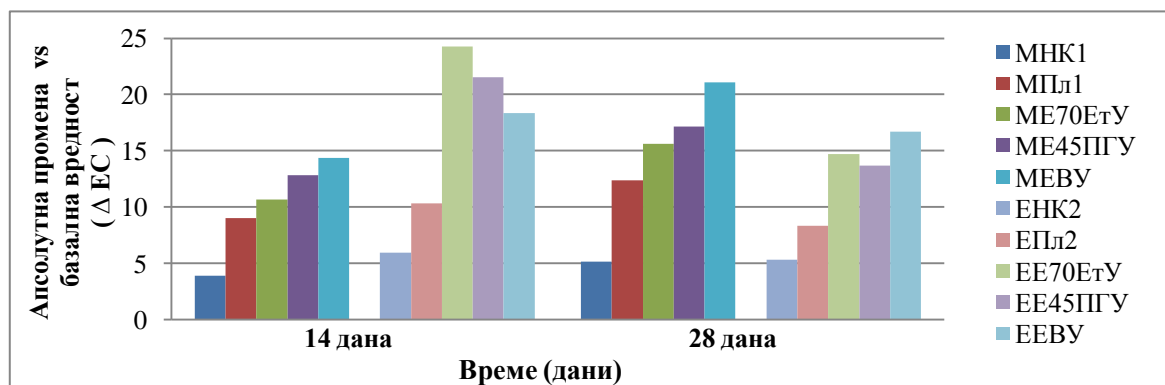
г)), што је донекле у складу са раније публикованим резултатима (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013).

Резултати прелиминарног испитивања утицаја формулисаних емулзија са ЕПДЈ на боју коже указују на промену боје третиране коже након 180 мин апликације емулзија. Односно, долази до смањења вредности параметра МI након апликације емулзија са ЕПДЈ (независно од примењеног ЕПДЈ или емулгатора) на кожу здравих испитаника након 60 и 180 минута у односу на обе контроле (нетретирано место и плацебо узорак) које не доводе до смањења МI параметра. МЕ емулзије су довеле до незнатно већег смањења параметра МI након апликације током времена у односу на ЕЕ емулзије, што се може приписати и бољем садржају ВК у МЕ емулзијама, као добрих ексфолијантних супстанци, у односу на садржај у ЕЕ емулзијама (Табела 18). Повољан ефекат у смислу посветљивања коже након примене производа са ВК из групе α -хидрокси киселина је показан и раније (Тасић-Костов, 2013). Емулзије са 45ПГУ су довеле до већег смањења испитиваног параметра у односу на остале емулзије, као и у односу на обе контроле, посебно МЕ45ПГУ ($\Delta M I -5,4 \pm 18,72$ након 180 мин) (Графикон 14 д)). Сходно томе, добијени резултати указују на задовољавајући прелиминарни ефекат бељења/посветљивања коже након наношења емулзија са ЕПДЈ, што се може искористити као допринос за даља испитивања, па је на основу резултата ове студије у оквиру ове докторске дисертације и испитан потенцијал емулзија са ЕПДЈ, као добрим извором ВК и ПФ једињења, за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација коже.

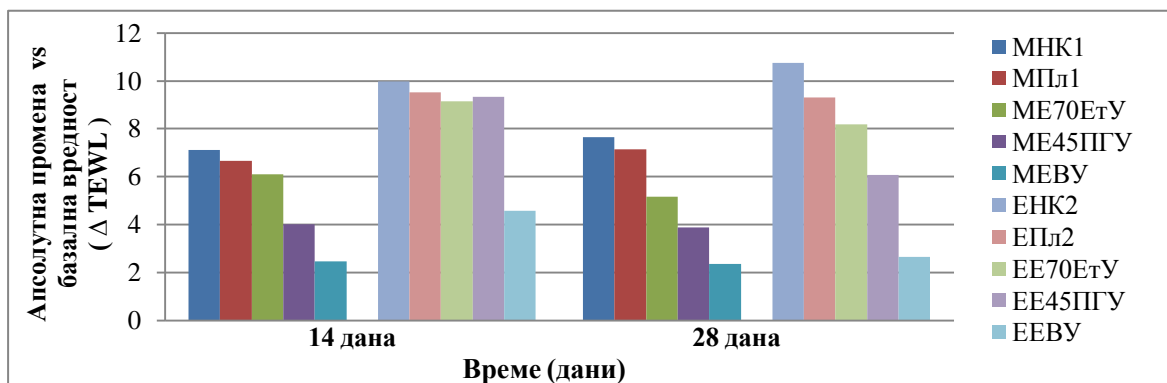
4.2.5.2.2. In vivo испитивање ефикасности емулзија са ЕПДЈ – дуготрајна студија

Производи за влажење коже представљају најбројнију и најчешће коришћену групу (дермо)козметичких производа. Они се могу користити у превенцији и/или моно или адјувантној терапији бројних измењених стања коже, ихтиоза, атопијског дерматитиса, разних дерматоза, болести узрокованих оксидативним стресом и као *anti-age* производи (Lodén, 2003; Васиљевић и сар., 2009; 2007; Mahrhauser и сар., 2015; Савић, 2004; Тасић-Костов, 2013). Ефекат влажења коже није последица деловања производа само на површини коже. Често долази додатно и до функционалних промена у SC-у, због чега се ови производи и сврставају у групу (дермо)козметичких производа (Fendler, 2000). Формулишу се тако да утичу на репарацију оштећеног SC-а, делују хидратантно и уклањају субјективне и објективне симптоме суве коже дајући јој здравији изглед (Gao и сар., 2008). Плод дивље јабуке са територије Србије представља

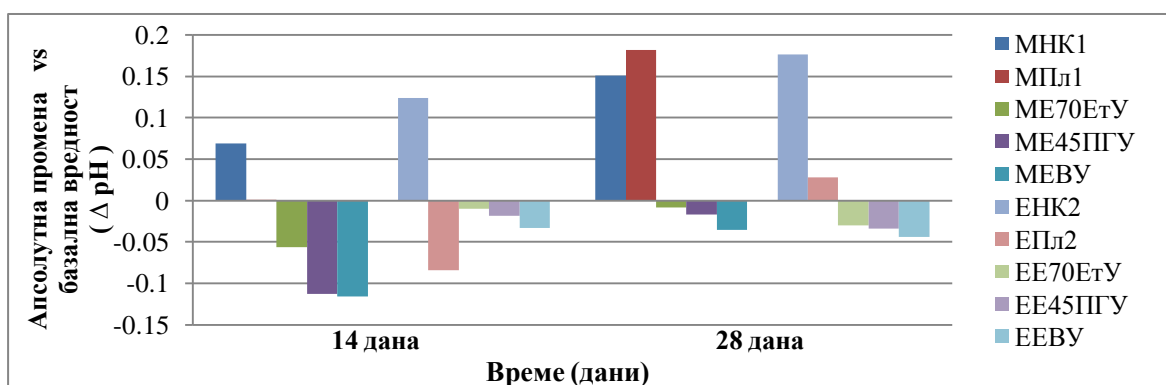
природни извор КАС (ПФ једињења и ВК) (Део 4.1.) (Сарић, 1989; Sivaci, 2006; Stojiljković и сар., 2016а); Туцаков, 1997), чијом апликацијом се потенцијално може побољшати хидратисаност коже и превенирати последице деловања РКВ (Stojiljković и сар., 2018; 2016в)). Сходно томе, *in vivo* ипитивање ефикасности примене емулзија са ЕПДЈ на кожи здравих испитаника је рађено са циљем да се научно потврди исправност традиционалне примене ове биљне сировине код одређених стања коже и да се одабере ефикасан производ намењен за примену на кожу. Испитивање је вршено мерењем одговарајућих биофизичких параметара (ЕС, TEWL, рН и EI) на кожи здравих испитаника у дуготрајној студији током 28 дана апликације узорака. Резултати су приказани на Графикону 15, као апсолутне промене мерених параметара у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ ЕС, Δ TEWL, Δ рН и Δ EI).



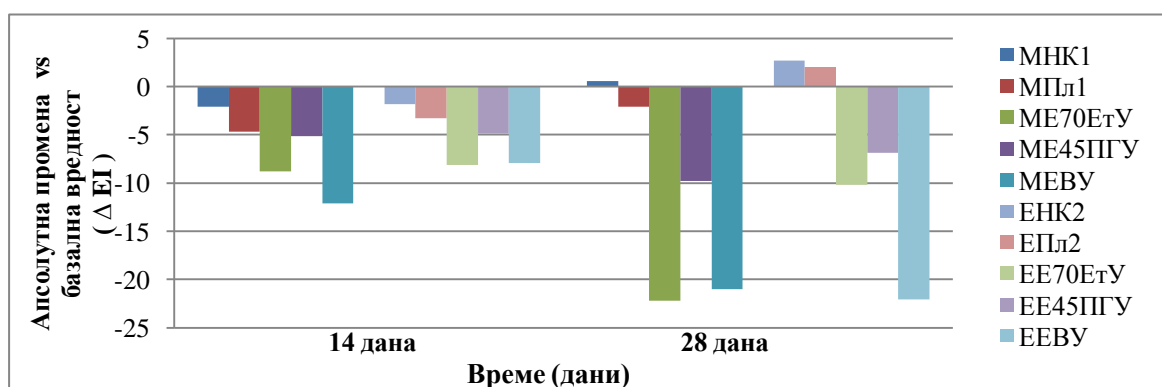
- а) а) - ЕС након 14 дана за МЕ емулзије vs базално
 б) - ЕС након 28 дана за МЕ45ПГУ и МЕВУ vs ЕС базално
 в) - Δ ЕС након 14 дана МЕВУ vs МНК1
 г) - Δ ЕС након 28 дана МЕ емулзија vs МНК1
 д) - Δ ЕС након 28 дана МЕВУ vs МПл1
 е) - ЕС након 14 дана за ЕЕ емулзије vs базално
 ж) - ЕС након 28 дана за ЕЕ емулзије vs базално
 з) - Δ ЕС након 14 дана ЕЕ емулзија vs Δ ЕС ЕНК2
 и) - Δ ЕС након 28 дана ЕЕВУ vs Δ ЕС ЕНК2
 п) - Δ ЕС након 14 дана ЕЕ70ЕтУ, ЕЕ45ПГУ vs Δ ЕС ЕПл2



- б) а) - TEWL након 14 дана ME емулзије vs TEWL базално
 б) - TEWL након 28 дана ME емулзије vs TEWL базално
 в) - Δ TEWL након 14 дана MEВУ vs Δ TEWL МНК1
 г) - TEWL након 14 дана EE емулзије vs TEWL базално
 д) - TEWL након 28 дана ЕПл2, EE70ЕтУ, EE45ПГУ vs TEWL базално



- в) а) - pH након 28 дана МПл1 vs pH базално



- г) а) - EI након 14 дана ME70ЕтУ, MEВУ vs EI базално
 б) - EI након 28 дана MEВУ vs EI базално
 в) - EI након 28 дана EEВУ vs EI базално

Емулзије	ЕС		TEWL		рН		ЕИ	
	14 дана	28 дана	14 дана	28 дана	14 дана	28 дана	14 дана	28 дана
	Δ ± SD							
МНК1	3,88±5,77	5,12±6,19	7,12±6,97	7,65±8,17	0,07±0,41	0,15±0,41	-2,11±16,04	0,56±27,52
МПл1	8,98±5,44	12,38±6,17	6,66±6,73	7,14±6,95	0,01±0,35	0,18±0,24	-4,67±20,17	-2,11±17,18
МЕ70ЕтУ	10,68±7,90	15,63±7,98	6,10±5,47	5,15±3,04	-0,06±0,43	-0,01±0,39	-8,78±25,65	-22,22±22,98
МЕ45ПГУ	12,83±12,69	17,16±8,78	4,00±5,86	3,88±5,06	-0,11±0,52	-0,02±0,58	-5,11±26,55	-9,78±21,82
МЕВУ	14,38±9,44	21,06±6,96	2,45±3,06	2,35±3,74	-0,12±0,48	-0,04±0,56	-12,11±10,54	-21,00±24,69
ЕНК2	5,91±8,23	5,32±7,48	9,98±9,87	10,76±15,31	0,12±0,53	0,18±0,57	-1,80±26,26	2,70±15,99
ЕПл2	10,29±6,70	8,32±9,98	9,51±13,60	9,30±12,50	-0,08±0,45	0,03±0,40	-3,30±31,86	2,00±30,89
ЕЕ70ЕтУ	24,24±12,56	14,70±11,33	9,14±9,32	8,17±13,37	-0,01±0,44	-0,03±0,46	-8,10±24,82	-10,20±29,46
ЕЕ45ПГУ	21,54±13,09	13,69±9,07	9,32±11,59	6,06±9,75	-0,02±0,36	-0,03±0,52	-4,90±30,44	-6,90±29,66
ЕЕВУ	18,36±10,60	16,70±8,79	4,58±7,76	2,65±6,35	-0,03±0,52	-0,04±0,52	-7,90±30,05	-22,10±23,45

д)

Графикон 15. *In vivo* одређена ефикасност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) у дуготрајној студији од 28 дана. Резултати су приказани као апсолутне промене биофизичких параметара: а) ΔЕС, б) ΔTEWL, в) ΔрН и г) ΔЕИ у односу на базалне вредности; д) Δ ± SD, мерених након апликације испитиваних узорака током времена. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), након чега је рађен *Tukey's* тест, док је поређење добијених вредности у различитим временским интервалима извршено Студент т-тестом.

Све формулисане емулзије са активним ЕПДЈ су показале незнатно бољи влажећи ефекат у односу на обе одговарајуће контроле (нетретирано место и плацебо узорак) (Графикон 15 а)). Добра хидратација коже која је забележена након апликације плацебо узорака у односу на нетретирано место, је вероватно последица присуства различитих емолијенаса у основној формулацији (Табела 9) (Stojiljković и сар., 2018). Добијени резултати који показују бољу хидратисаност коже након примене емулзија са активним ЕПДЈ у односу на хидратисаност након примене Пл узорака (као и нетретираног места) указују да је присуство хидросолубилних влажећих активних супстанци у ЕПДЈ (ПФ једињења и ВК) највероватније највећим делом утицало на бољи хидратантни ефекат емулзија са ЕПДЈ. Позитиван влажећи ефекат емулзија са влажећим активним супстанцама је и раније показан (Arsić и сар., 2011; Savić и сар., 2011; Stojiljković и сар., 2018; 2016в); Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Апликација сваке од испитиваних емулзија са ЕПДЈ је довела до значајног пораста влажности коже (ЕС параметра) и након 14 и 28 дана апликације у односу на базалне вредности, без обзира на тип употребљеног ЕПДЈ или емулгатора. Значајно повећање хидратисаности коже је једино изостало код узорка МЕ70ЕтУ након 28 дана у односу на базалну вредност (ΔЕС је било 15,63±7,98). Након 14 дана апликације

МЕВУ, дошло је до значајног повећања влажности коже у односу на МНК1, док су након 28 дана све МЕ емулзије довеле до значајно веће хидратисаности у односу на МНК1. МЕВУ је након 28 дана апликације показао и значајну разлику у хидратисаности коже у односу на МПл1. МЕВУ је показао најмању електричну проводљивост у односу на све остале емулзије током целокупног испитивања (Графикон 9), што може указати на специфично структурирање система са ВУ, односно уклапање воде из ВУ интерламеларно унутар течних кристала, који омогућују постепено и одложено ослобађање воде, а тиме и продужену хидратацију коже након наношења (Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013). Све ЕЕ емулзије су довеле до значајно боље хидратације коже након 14 дана апликације у односу на ЕНК2, док је након 28 дана значајна разлика у ЕС параметру постојала само између ЕЕВУ и ЕНК2. ЕЕ емулзије су показале и бољи потенцијал хидратације коже и у односу на ЕПл2 током целокупног периода испитивања, али су само узорци ЕЕ70ЕтУ и ЕЕ45ПГУ након 14 дана апликације показали значајну разлику у ЕС у односу на ЕС измерену након апликације ЕПл2. Већа хидратисаност коже након апликације испитиваних емулзија са ЕПДЈ као КАС и стабилованих било којим емулгаторима у односу на нетретирана места може указати на синергизам влажећих активних супстанци из ЕПДЈ (воћних киселина и ПФ једињења), примењених емолијенаса и емулзионих носача, док у односу на Пл узорке је већа хидратација коже вероватно највећим делом последица деловања само влажећих хидросолубилних активних супстанци из ЕПДЈ (ВК и ПФ). Значајна разлика у ЕС параметру између испитиваних узорка није постојала у односу на примењени тип ЕПДЈ, али се може рећи да је најбољи ефекат хидратације коже након 28 дана испитивања показао узорак МЕВУ ($\Delta\text{ЕС } 21,06 \pm 6,96$) у односу на све остале емулзије и ЕЕВУ ($\Delta\text{ЕС } 16,7 \pm 8,79$) у односу на ЕЕ емулзије. Емулзије са ВУ су показале добар садржај ВК, као добрих влажећих супстанци (Табела 18), што је, вероватно, највећим делом утицало и на добар хидратантни ефекат емулзија које их садрже. Емулзије са ВУ су вероватно показале бољи ефекат хидратације коже након апликације, делимично и због веће количине воде присутне у воденом ЕПДЈ, услед коришћења воде као екстрагенса приликом екстракције (Део 3.2.1.1.). Значајна разлика у хидратантном ефекту је постојала између емулзија у односу на примењени тип емулгатора. ЕЕ емулзије су након 14 дана апликације показале значајно већи потенцијал хидратације коже у односу на МЕ емулзије, при чему овај тренд није настављен. Наиме, након 28 дана од апликације ЕЕ емулзија дошло је до незнатног пада хидратисаности коже у односу на хидратисаност

након 14 дана, док су МЕ емулзије показале незнатно повећање хидратисаности коже у односу на хидратисаност након 14 дана апликације. МЕ емулзије су након 28 дана апликације значајно више хидратисале кожу и у односу на ЕЕ емулзије. ЕЕ емулзије су у систему имале више „слободне“ воде услед основне формулације (Табела 9), услед чега је већа количина воде била у старту доступна за ефикаснију иницијалну хидратацију коже, док је временом дошло до незнатног пада хидратисаности коже. Може се додатно претпоставити и да до смањења хидратације коже након 28 дана апликације емулзија у односу на 14 дана, долази и услед конкуренције за слободну воду између емулзионог носача и коже. Коришћени конвенционални емулгатор у свом хидрофилном делу садржи велики број ПОЕ група, које због своје јаке хидрофилности могу интензивно да везују воду током времена, па долази до накнадне структурације (промене конзистенције очвршћавањем), што потенцијално може резултовати лошим апликативним и естетским особинама емулзија и ефектима које могу да покажу током времена, због чега је влажећи ефекат ових емулзија и био слабији током времена као и у односу на МЕ емулзије у дуготрајној студији (Eccleston, 1997a); 1997b); Лукић, 2014; Savić и сар., 2014; Тасић-Костов, 2013). Такође, с обзиром да је и плацебо узорак МПл1 након 28 дана апликације показао бољи влажећи ефекат у односу на ЕПл2, може се претпоставити, што иде у прилог претходној констатацији, да основна формулација и боље уређење течних кристала унутар емулзионог система МЕ емулзија, утиче на *in vivo* ефекат хидратације коже. Формулисана МЕ емулзије стабилизоване фазом течних кристала, која је слична и компатибилна са структуром липида у SC-у поседују већи потенцијал за инкорпорирање великог броја и хидрофилних и липофилних супстанци (Makai и сар., 2003; Тасић-Костов, 2013), при чему пружају већу могућност контролисане и одложене хидратације коже (Arsić и сар., 2011; Junginger, 1997; Савић, 2004; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013), па су током дуготрајне студије испитивања ефикасности показале повољнији ефекат на влажност коже у односу на ЕЕ емулзије. Показан је и бољи садржај активних супстанци (ПФ једињења и ВК) (Део 4.2.3.) у МЕ емулзијама у односу на ЕЕ емулзије, што је свакако додатно утицало на повољне карактеристике МЕ емулзија.

Сprovedено *in vivo* испитивање ефикасности формулисаних емулзија са ЕПДЈ показало је да је допринос влажећих активних супстанци из ЕПДЈ у остваривању влажећег ефекта на кожи након примене формулисаних емулзија неоспоран (Stojiljković и сар., 2018). Присуство емолијенаса у емулзијама са ЕПДЈ као и присуство фаза течних кристала које стабилизују емулзије, такође делом повећавају

хидратисаност коже након наношења емулзија, што су показали и други аутори (Лукић, 2014; Савић, 2004; Савић, 2015; Тасић-Костов, 2013). Може се, генерално, рећи да је синергизам влажећих активних супстанци из ЕПДЈ и примењених емолијенаса и емулзионих носача (стабилизација фазом течних кристала) у испитиваним емулзијама значајан за остваривање влажећег потенцијала испитиваних емулзија у дуготрајној *in vivo* студији испитивања ефикасности (Arsić и сар., 2011; Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013).

Мерење и праћење TEWL параметра се често користи у процени промена које настају у баријерној функцији коже након апликације испитиваних узорак (Mahrhauser и сар., 2015). Добијени резултати у овој студији су показали да је дошло до значајног повећања TEWL параметра у односу на базалне вредности и након 14 дана и након 28 дана апликације испитиваних узорак и плацебо узорак (Графикон 15 б)). Ипак, промене у вредностима TEWL параметра добијених након наношења емулзија са активним ЕПДЈ су и даље биле незнатно мање у поређењу са обе одговарајуће контроле (плацебо узорци и нетретирана места), што свакако може указати на чињеницу да формулације са ЕПДЈ мање утичу на баријерну функцију коже у односу на основне формулације (плацебо узорци). Узорак МЕВУ је након 28 дана апликације показао значајно смањење TEWL параметра у односу на МНК1. Примена емулзија са ЕПДЈ је током времена довела до незнатног смањења TEWL параметра након 28 дана апликације у односу на вредности измерене након 14 дана, што је показано и ранијим испитивањима (Savić и сар., 2009; Tasić-Kostov и сар., 2012). На нетретираним местима на кожи је, такође, дошло до повећања TEWL параметра током времена. Плацебо узорци су показали значајно повећање TEWL параметра у односу на базалне вредности и након 14 и након 28 дана. Ово може указати на чињеницу да, могуће, да до трансепидермалног губитка воде и оштећења баријерне функције коже долази деловањем самих емулзионих носача, пре свега конвенционалног емулгатора (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013), који доводи до већег губитка воде у односу на МЕ емулзије, али без значајности. Такође, треба нагласити да је за биодеграбилне емулгаторе још раније показано да имају повољнији неиритирајући потенцијал и да су потенцијално безбеднији носачи за активне супстанце (Лукић, 2014; Савић, 2004; Savić и сар., 2009; Stojiljković и сар., 2018; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Инкорпорирани ЕПДЈ у емулзијама, као извори биоактивних влажећих ВК и ПФ једињења су позитивно деловали на баријерну функцију коже након наношења емулзија са ЕПДЈ и током времена је дошло до смањења TEWL

параметра (Графикон 15 б)). Значајна разлика у промени TEWL параметра није постојала у односу на примењени ЕПДЈ. Након 28 дана апликације, МЕВУ је показао најмањи утицај на баријерну функцију коже ($\Delta\text{TEWL } 2,35 \pm 3,74$) као и ЕЕВУ ($\Delta\text{TEWL } 2,65 \pm 6,35$). Резултати указују да ЕПДЈ као КАС у свим емулзијама након апликације емулзија, могу да доведу до смањења TEWL параметра током времена и да позитивно делују на баријерну функцију коже током дуготрајне примене.

С обзиром да је површина коже прекривена хидрофилно-липофилним слојем са релативно високим садржајем воде, директно електрохемијско мерење рН коже је могуће спровести, у циљу праћења утицаја емулзија са ЕПДЈ на рН коже (Лукић, 2014; Савић, 2004; Savić и сар., 2009; Тасић-Костов, 2013). Мерењем рН коже здравих испитаника пре и након апликације испитиваних емулзија у периоду од 28 дана, показано је да рН вредности коже остају непромењене током дуготрајне примене емулзија са ЕПДЈ и да присуство активних киселих ВК из ЕПДЈ не утичу значајно на рН вредност коже. рН вредности коже се нису значајно мењале током испитиваног периода након апликације емулзија, без обзира на примењени ЕПДЈ или емулгатор (Графикон 15 в)). С обзиром да су рН вредности емулзија биле ниже (Део 4.2.1.2.1) у односу на рН вредности коже здравих испитаника, а да су биле више у односу на рН вредности ЕПДЈ (Део 4.1.2.2.1), могло се очекивати да емулзије са киселим ЕПДЈ (воћне киселине из ЕПДЈ) утичу на рН коже испитаника након апликације, у правцу незнатног смањења рН вредности коже у односу на базално измерене вредности, што је и регистровано. Ови резултати су у складу са литературним подацима (Лукић, 2014; Stojiljković и сар., 2018; 2016в); Тасић-Костов, 2013). Једино је МПл1 довео до значајног повећања рН вредности коже након 28 дана апликације у односу на базалну вредност. Емулзије са ВУ, као најкиселије (Делови 4.1.2.2.1 и 4.2.1.2.1) су показале највећи утицај на промену рН коже испитаника након апликације емулзија са оба типа емулгатора ($\Delta\text{рН}$ након 28 дана апликације МЕВУ је било $-0,04 \pm 0,56$, за ЕЕВУ $-0,05 \pm 0,52$). Највећи утицај на рН коже узорак МЕВУ је показао након 14 дана ($\Delta\text{рН} -0,12 \pm 0,48$). Тип коришћеног емулгатора није значајно утицао на промену рН коже. Ипак, може се уочити разлика између МЕ емулзија и ЕЕ емулзија, у смислу да МЕ емулзије током времена доводе до повећања рН вредности коже у односу на рН вредности регистроване након 14 дана апликације узорака. Вероватно да, током времена, ови емулзиони системи постепено ослобађају киселе ВК из инкорпорираних ЕПДЈ, чију киселост кожа сама, активацијом свог пуферског система постепено неутралише (Savić и сар., 2009; Stojiljković и сар., 2018). ЕЕ емулзије након 28 дана

апликације доводе до пада рН вредности коже у односу на вредности забележене након 14 дана након апликације, што може указати на чињеницу да се екстракти из овог система ослобађају брзо и да вероватно физиолошки пуферски системи коже са извесним „кашњењем“ неутралишу њихов кисели утицај на рН коже или у знатно мањој мери неутралишу киселе ВК. Значајно је рећи и да је рН вредност ЕПл2 била нижа у односу на рН вредност МПл1 (Део 4.2.1.2.1. и Графикон 8), па се може претпоставити да је сам емулзиони носач код ЕЕ емулзија додатно утицао на промену рН вредности. Значајна промена рН вредности коже након 28 дана апликације свих испитиваних емулзија са ЕПДЈ у односу на базалне вредности, као и у односу на вредности након 14 дана, није регистрована.

Смањење ЕИ параметра (Графикон 15 г)), у односу на обе контроле након апликације испитиваних емулзија са ЕПДЈ у периоду од 28 дана и одсуство значајнијег утицаја испитиваних емулзија са ЕПДЈ на промену ЕИ параметра би могло да се доведе у везу са неиритантним ефектом самих ЕПДЈ односно емулзија са ЕПДЈ након дуготрајне апликације на кожу, имајући у виду да је иритација коже генерално праћена повећањем овог параметра (Лукић, 2014; Савић, 2004; Савић, 2015; Тасић-Костов, 2013). Тип коришћеног ЕПДЈ као и тип коришћеног емулгатора нису значајно утицали на промену ЕИ. МЕ емулзије су показале незнатно бољи неиритантни ефекат (бољи безбедносни профил) у односу на ЕЕ емулзије, које услед присуства ПОЕ ланаца у конвенционалном емулгатору могу потенцијално иритирати кожу и нарушити баријерну функцију коже, што је и раније показано (Bárány и сар., 2000; Лукић, 2014; Тасић-Костов, 2013). Резултати добијени за плацебо узорке, додатно потврђују претходну констатацију, при чему је МПл1 довео до незнатног смањења, а ЕПл2 до незнатног повећања ЕИ параметра након 28 дана апликације емулзија. МЕ емулзије су показале и бољи садржај биоактивних ПФ једињења и воћних киселина, који су својим позитивним антиоксидативним и влажећим ефектима допринеле антииритантном ефекту испитиваних емулзија. МЕ70ЕтУ је показао значајно смањење ЕИ параметра након 14 дана апликације у односу на базалну вредност ($\Delta EI -22,22 \pm 22,98$), док је МЕВУ довео до значајног смањења ЕИ и након 14 дана и након 28 дана (ΔEI након 14 дана је била $-12,11 \pm 10,54$, а након 28 дана $\Delta EI -21 \pm 24,69$). Ове емулзије су показале и најбољи садржај биоактивних једињења (ПФ једињења и воћних киселина), што се и одразило на повољне неиритантне карактеристике. Примена ЕЕВУ је након 28 дана значајно утицала на ЕИ параметар у односу на базалну вредност ($\Delta EI -22,1 \pm 23,45$). Повољне неиритирајуће ефекте, чак и антииритантне ефекте емулзионих формулација

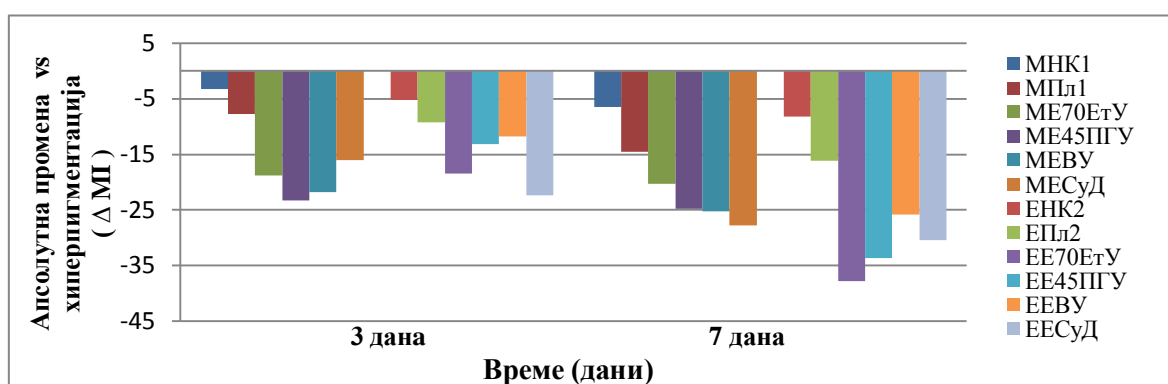
намењених за примену на кожу и са влажећим биоактивним супстанцама (α -хидрокси киселине, ПФ једињења, уља) су показали и други аутори (Arsić и сар., 2011; Лукић, 2014; Савић, 2004; Savić и сар., 2015; Tasić-Kostov и сар., 2012; 2010; Тасић-Костов, 2013). Може се претпоставити, на основу добијених резултата и резултата добијених из претходно наведених публикација, да присуство биоактивних ПФ једињења и воћних киселина у ЕПДЈ може показати повољне ефекте на кожи здравих испитаника након дуготрајне примене емулзија са ЕПДЈ, као и да не доводи до иритације коже након њихове примене. Све емулзије са ЕПДЈ су током дуготрајног *in vivo* испитивања показале повољне ефекте у смислу нешкодљивости и безбедности примене. Односно, показано је да долази до већег смањења ЕИ параметра након наношења емулзија са ЕПДЈ у односу на обе одговарајуће контроле, што иде у прилог потенцијалном *in vivo* неиритантном потенцијалу емулзија са ЕПДЈ, као дела испитивања безбедносног профила формулисаних емулзија са ЕПДЈ.

4.2.5.3. Испитивање способности емулзија са ЕПДЈ за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи

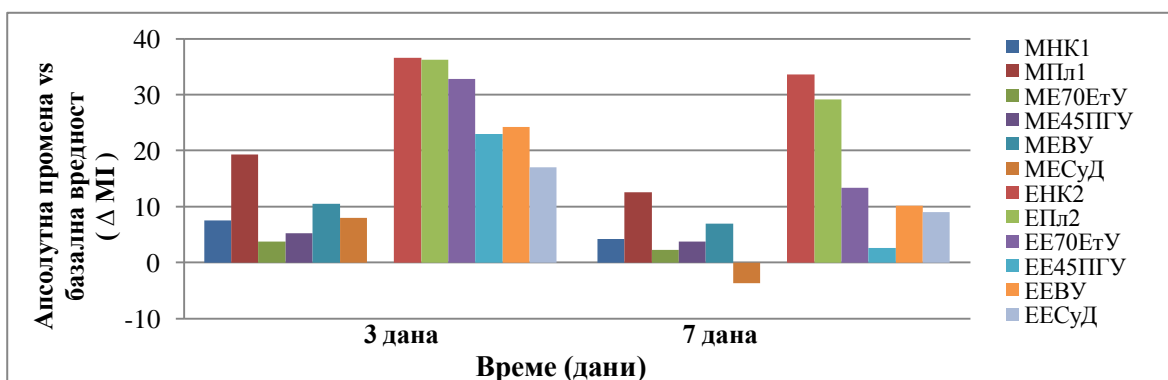
У складу са сазнањима и резултатима из ранијих научних публикација, водичима и препорукама, као и могућношћу сарадње са испитаницима и придржавања упутстава за адекватно спровођење испитивања, и у односу на број испитаника који су учествовали у овој студији (Arsić и сар., 2011; Berardesca, 1997; 1999; Colipa Guidelines for the Efficacy of Cosmetic Products, 2008; Chisvert и сар., 2007; Dahl и сар., 2013; Gupta и сар., 2006; Halder и Richards, 2004; Jaksić и сар., 2012; Pantelić и Lukić, 2014; Regulation (EC) No 1223/2009; Solano и сар., 2006; Тасић-Костов, 2013; Tatljak-Nikolić и сар., 2013) извршено је прелиминарно испитивање способности емулзија са ЕПДЈ за посветљивање вештачки изазваних хиперпигментација коже (хемијским агенсима), које може послужити и као основ за даља испитивања. Паралелно је праћен и ЕИ параметар, како би се утврдило да ли и у којој мери након наношења емулзија са ЕПДЈ долази до смањења евентуално настале иритације коже узроковане вештачки изазваном хиперпигментацијом (Графикон 17).

Имајући у виду да је употреба хидрохинона, једног од најефикаснијих и најчешће коришћених КАС које испољавају ефекат посветљивања коже након локалне примене, строго ограничена, (Gupta и сар., 2006; Halder и Richards, 2004; Ladizinski и сар., 2011; Solano и сар., 2006; Tatljak-Nikolić и сар., 2013; Zhu и Gao, 2008), све више су актуелна истраживања нових природних КАС које испољавају (дермо)козметички

ефекат посветљивања коже и/или тамних флека/хиперпигментација на кожи (Chisvert и сар., 2007; Dahl и сар., 2013; Draelos и сар., 2010; Draelos, 2008; Shin и Park, 2014; Tatljak-Nikolić и сар., 2013; Тасић-Костов, 2013; Usuki и сар., 2003; Zhu и Gao, 2008; Wiechers и сар., 2004). Ова истраживања су показала да примена производа са природним активним супстанцама са способношћу посветљивања коже су показала исти, чак и бољи ефекат посветљивања у односу на често коришћен хидрохинон, а безбеднији су и сигурнији за примену. Правилном и дужом применом (дермо)козметичких производа, реално је очекивати смањење интензитета хиперпигментних промена на кожи (Tatljak-Nikolić и сар., 2013).



- а) а) - MI након 3 дана vs MI након хиперпигментације
 б) - MI након 7 дана vs MI након хиперпигментације
 в) - ЕЕ емулзије - ΔMI након 3 дана vs ΔMI након 7 дана



- б) а) - MI након 3 дана vs MI базално
 б) - ΔMI након 7 дана vs ΔMI након 3 дана

Емулзије	МИ			
	хиперпигментација		базално	
	3 дана	7 дана	3 дана	7 дана
	$\Delta \pm SD$			
МНК1	-3,25±1,50	-6,50±7,85	7,50±7,41	4,25±1,50
МПл1	-7,75±7,68	-14,50±6,46	19,25±17,60	12,50±18,56
МЕ70ЕгУ	-18,75±22,10	-20,25±41,61	3,75±35,03	2,25±17,33
МЕ45ПГУ	-23,25±7,85	-24,75±24,68	5,25±20,14	3,75±12,45
МЕВУ	-21,75±22,29	-25,25±14,98	10,50±23,59	7,00±11,75
МЕСуД	-16,00±11,40	-27,75±12,15	8,00±21,31	-3,75±12,95
ЕНК2	-5,20±31,50	-8,20±16,53	36,60±18,90	33,60±23,43
ЕПл2	-9,20±21,18	-16,20±15,45	36,20±23,89	29,20±28,23
ЕЕ70ЕгУ	-18,40±24,18	-37,80±21,03	32,80±19,90	13,40±22,22
ЕЕ45ПГУ	-13,20±25,49	-33,60±25,71	23,00±10,77	2,60±10,60
ЕЕВУ	-11,80±13,77	-25,80±21,63	24,20±8,90	10,20±8,59
ЕЕСуД	-22,40±16,68	-30,40±12,32	17,00±24,33	9,00±28,31

в)

Графикон 16. *In vivo* одређена способност испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи. Резултати су приказани као апсолутне промене биофизичког параметра ΔMI а) у односу на измерене вредности МИ параметра након вештачки изазване хиперпигментације, б) у односу на базалне вредности, мерених након апликације испитиваних узорака током времена; в) $\Delta MI \pm SD$. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, док је поређење добијених вредности након хиперпигментације и у различитим временским интервалима након апликације емулзија извршено Студент т-тестом.

Резултати прелиминарне студије испитивања способности формулисаних емулзија са ЕПДЈ за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација коже показују да је на свим испитиваним местима (нетретирано место, плацебо узорак и места где су наношене емулзије са активним ЕПДЈ) дошло до пада вредности МИ параметра. Ово свакако да се може приписати и чињеници да је делом дошло до природне десквације коже током времена, односно до природног посветљивања хемијски/вештачки изазване хиперпигментације (Stojiljković и сар., 2018; Тасић-Костов, 2013). Ипак, све испитиване емулзије са ЕПДЈ су након примене показале незнатно бољи ефекат посветљивања вештачки изазваних хиперпигментација на кожи у односу на обе контроле (нетретирана места и плацебо узорци) током целокупног периода испитивања, што би свакако могло да укаже да је допринос ЕПДЈ, као активне супстанце, у посветљивању вештачки изазваних хиперпигментација коже, неоспоран. Воћне киселине, као и ПФ једињења идентификовани и квантификовани у ЕПДЈ

(Делови 4.1.3 и 4.1.4; као и 4.2.3), доводе до додатне ексфолијације/десквамације коже, као и до антиоксидативног ефекта на кожи, чиме доприносе значајно посветљивању изазваних хиперпигментација на кожи. Повољан ефекат формулација са природним активним супстанцама (воћне киселине, полифенолна једињања...) у смислу посветљивања коже је истраживан и показан и раније (Chisvert и сар., 2007; Dahl и сар., 2013; Draelos и сар., 2010; Draelos, 2008; Tatljak-Nikolić и сар., 2013; Тасић-Костов, 2013; Usuki и сар., 2003; Zhu и Gao, 2008; Wiechers и сар., 2004).

Регистрован је и пад вредности МI параметра након примене емулзија са ЕПДЈ у односу на базалне вредности и вредности измерене након вештачки изазване хиперпигментације. Емулзије са ЕПДЈ су углавном показале значајно ниже вредности МI након 3 дана, као и након 7 дана примене у односу на вредности МI измерене након вештачки изазване хиперпигментације (Графикон 16 а)). До смањења МI након 3 дана апликације у односу на вредности добијене након вештачки узроковане хиперпигментације коже вероватно долази, делимично, и услед физиолошки убрзане ексфолијације коже након вештачки изазване хиперпигментације. Тип коришћеног ЕПДЈ у емулзијама није показао значајан утицај на потенцијал емулзија за посветљивање вештачки изазваних хиперпигментација на кожи. Ипак, може се рећи да су емулзије ЕЕ70ЕтУ ($\Delta M I -37,80 \pm 21,03$) и ЕЕ45ПГУ ($\Delta M I - 33,60 \pm 25,71$) након 7 дана примене довеле до највећег смањења МI параметра након хиперпигментације у односу на остале емулзије. Емулзије са Суд су показале добре резултате након 7 дана апликације односу на МI измерене након хиперпигментације: $\Delta M I -30,40 \pm 12,32$ за ЕЕСуд и $\Delta M I -27,75 \pm 12,15$ за МЕСуд. ЕЕ емулзије су показале знатно бољи ефекат посветљивања хиперпигментација након 7 дана апликације у односу након 3 дана апликације. Ипак, значајна разлика у способности посветљивања хиперпигментација коже у односу на тип коришћеног емулгатора није постојала између МЕ емулзија и ЕЕ емулзија.

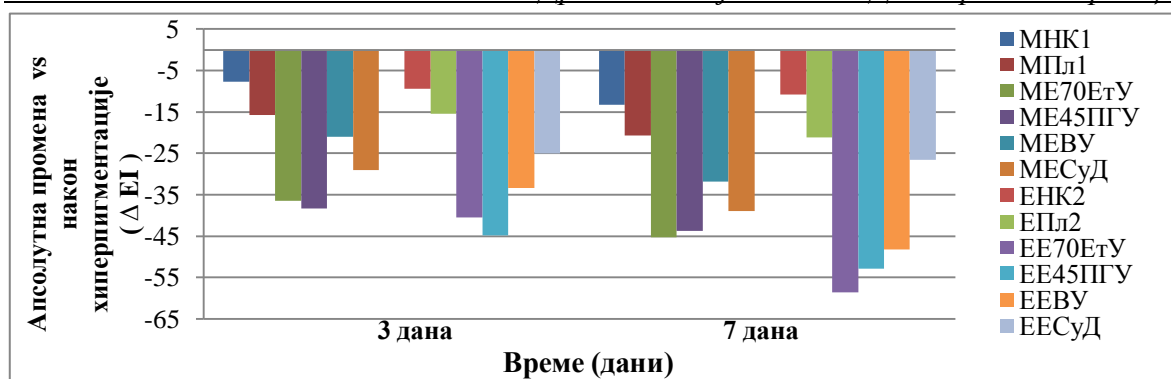
МI параметар коже након 3 дана апликације узорак у односу на базално измерене вредности МI је био значајно већи за све узорке, али нижи у односу на вредности добијене након хиперпигментације, што може указати да је до посветљивања хиперпигментација коже дошло, али не у значајнијој мери. Овај тренд је настављен, па је ова разлика била незначајна након 7 дана апликације узорак, и вредности МI параметра су након 7 дана биле скоро сличне базалним вредностима. Односно, ови резултати могу указати да је дошло до скоро потпуног посветљивања хиперпигментација на кожи након 7 дана примене емулзија са ЕПДЈ (Графикон 16 б)).

Значајна разлика је постојала и између ΔMI у односу на базалну вредност након 7 дана апликације емулзија у односу на ΔMI добијене након 3 дана апликације. До пада вредности MI коже током времена је дошло и код обе контроле (нетретирано место и плацебо), али мање него код емулзија са ЕПДЈ. Оно што се може закључити након поређења вредности MI измерене након 7 дана апликације емулзија са ЕПДЈ у односу на базалне вредности, да су вредности MI након 7 дана апликације емулзија (без обзира на тип ЕПДЈ и тип емулгатора) биле приближне базалним вредностима, односно може се претпоставити да су емулзије са ЕПДЈ показале ефекат посветљивања, као последица и природне ексфолијације коже али и ексфолијације услед деловања ВК из ЕПДЈ. Разлика у MI вредностима коже (након 7 дана апликације и базалне вредности) је била мања након апликације МЕ емулзија у односу на ЕЕ емулзије, што може указати да МЕ емулзије показују незнатно бољи ефекат посветљивања. Показан је и бољи садржај ВК као потенцијалних ексфолијантних супстанци у МЕ емулзијама, што је вероватно утицало на бољи ефекат посветљивања коже након 7 дана апликације МЕ емулзија. Емулзије са 70EtУ су показале најмању разлику између MI вредности измерене након 7 дана апликације у односу на базалне вредности, што може указати на бољи потенцијал ових емулзија у смислу посветљивања хиперпигментација на кожи у односу на остале емулзије са другим ЕПДЈ. Емулзије са овим ЕПДЈ су показале најбољи садржај ВК, што је вероватно и утицало на најбоље позитивне ефекте овог узорка у смислу посветљивања вештачки изазваних хиперпигментација на кожи.

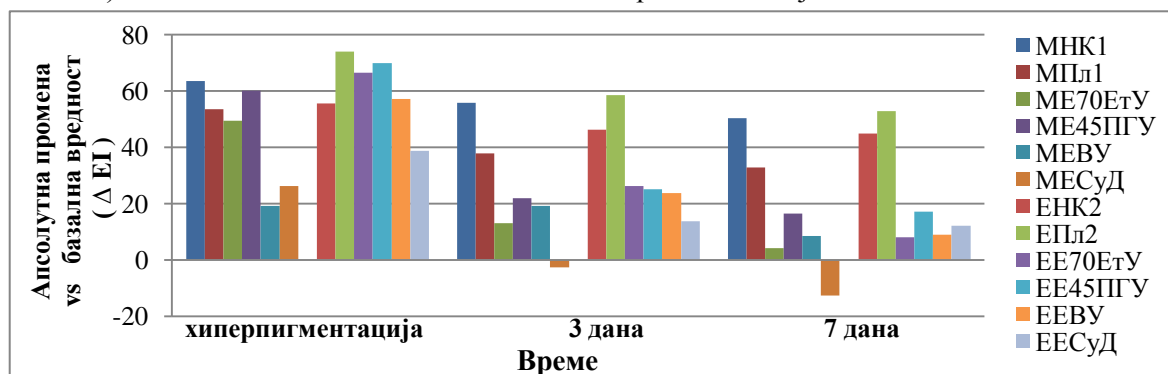
Доринос овом преформулационом испитивању представљају и резултати добијени у студији коју су спровели Stojiljković и сар. (2018). У овој студији је спроведено испитивање способности емулзије са воденим екстрактом ПДЈ стабилизоване биодеградабилним емулгаторима за посветљивање вештачки изазваних хиперпигментација коже, али на већем броју испитаника. Праћена је промена боје коже, односно, мерене су вредности MI параметра, пре, након вештачки изазване хиперпигментације коже и током 7 дана наношења испитиване емулзије. Након 7 дана апликације, испитивана емулзија је показала значајно смањење вредности MI параметра (ΔMI је било $-45,3 \pm 18,55$) у односу на MI параметар након хиперпигментације. Забележена је разлика у вредности MI параметра и у односу на обе контроле. Формулисани козметички крем са 6% стандардизованог воденог екстракта ПДЈ, који је садржао воћне киселине и полифенолна једињења, и стабилизован биодеградабилним алкилполиглукозидним емулгаторима је показао повољан потенцијални ефекат посветљивања хиперпигментација коже, при чему је показано и

да је допринос присутних КАС у испитиваној емулзији неоспоран за остварење наведеног ефекта (Stojiljković и сар., 2018).

Након вештачки изазване хиперпигментације дошло је до значајне иритације коже, што је било и очекивано, док је након 3, односно 7 дана апликације емулзија са ЕПДЈ детектовано значајно смањење изазваних иритација коже (Графикон 17 а)). ΔEI је била већа након 7 дана апликације у односу на вредности измерене након хиперпигментације, као и у односу на ΔEI након 3 дана апликације. Вредности за EI измерене након 7 дана примене емулзија са 70ЕтУ и ВУ су биле најприближније базалним вредностима, што може указати да емулзије са овим ЕПДЈ у највећој мери смањују иритацију коже насталу као последица вештачки изазване хиперпигментације коже. Ови ЕПДЈ су показали и најбољи садржај ПФ једињења са антиоксидативним ефектима и најбољи садржај ВК са влажећим и ексфолијантним ефектима у односу на остале емулзије, што је вероватно утицало и на побољшање антиритантних ефеката примењених емулзија. МЕСуд је показао најбољи ефекат смањења изазване иритације коже након вештачки изазване хиперпигментације (ΔEI након 7 дана апликације је била $-12,75 \pm 50,73$). Овај узорак није показао толико добар садржај биоактивних једињења, али могуће да је услед синергизма биоактивних једињења и самог уља (присутног као екстрагенса) дошло до позитивних ефеката испитиване емулзије (Arsić и сар., 2011). Емулзије са 70ЕтУ су генерално показале најбољи ефекат посветљивања и добар ефекат ублажавања настале иритације у односу на емулзије са осталим ЕПДЈ, док је узорак МЕСуд показао нешто слабије наведене ефекте. ЕПл2 је показао незнатно већу ΔEI након 7 дана апликације у односу на ΔEI нетретираног места, док је МПл1 ипак показао смањење иритације у односу на нетретирано место. Ово може указати да МЕ емулзије показују повољнији утицај на изазване иритације коже у односу на ЕЕ емулзије, што је било и очекивано, имајући у виду да и сами конвенционални емулгатори могу да доведу до иритација коже (Vágány и сар., 2000; Тасић-Костов, 2013). Бољи садржај ПФ једињења и ВК у МЕ емулзијама је вероватно, додатно утицао на повољније карактеристике ових емулзија у односу на ЕЕ емулзије.



а) а) - ЕИ након 3 дана vs ЕИ након хиперпигментације



б) а) - ЕИ након хиперпигментације vs ЕИ базално

Емулзије	ЕИ				
	хиперпигментација		базално		
	3 дана	7 дана	хиперпигмент.	3 дана	7 дана
	Δ ± SD				
МНК1	-7,75±15,92	-13,25±18,73	63,50±29,99	55,75±21,55	50,25±23,51
МПл1	-15,75±25,75	-20,75±22,79	53,50±10,63	37,75±21,96	32,75±18,09
МЕ70ЕтУ	-36,50±25,36	-45,25±23,54	49,50±31,11	13,00±35,50	4,25±18,17
МЕ45ПГУ	-38,25±27,22	-43,75±16,69	60,25±27,44	22,00±27,21	16,50±31,03
МЕВУ	-21,00±11,78	-31,75±42,30	19,25±27,10	19,25±27,10	8,50±17,08
МЕСуД	-29,00±34,36	-39,00±25,88	26,25±34,79	-2,75±29,74	-12,75±50,73
ЕНК2	-9,40±32,60	-10,80±24,51	55,60±51,33	46,20±44,21	44,80±31,18
ЕПл2	-15,40±22,41	-21,20±20,77	74,00±27,47	58,60±40,19	52,80±39,33
ЕЕ70ЕтУ	-40,40±37,51	-58,60±40,58	66,60±33,66	26,20±20,44	8,00±16,90
ЕЕ45ПГУ	-44,80±44,14	-52,80±62,67	70,00±14,44	25,20±37,88	17,20±55,68
ЕЕВУ	-33,40±18,89	-48,20±16,96	57,20±18,86	23,80±20,12	9,00±26,79
ЕЕСуД	-25,00±29,91	-26,60±38,79	38,80±52,88	13,80±28,37	12,20±30,29

в)

Графикон 17. *In vivo* одређен потенцијал иритације у студији испитивања способности испитиваних емулзија са ЕПДЈ и обе контроле (НК и Пл) за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација на кожи. Резултати су приказани као а) апсолутне промене параметра ΔЕИ у односу на измерене вредности ЕИ параметра након вештачки изазване хиперпигментације, као и б) у односу на базалне вредности, мерених након апликације испитиваних узорака током времена; в) ΔЕИ ± SD. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле унутар сваке од појединачних испитиваних група, анализирани су једнофакторском анализом варијансе, након чега је рађен *Tukey's* тест, док је поређење добијених вредности након хиперпигментације и у различитим временским интервалима извршено Студент т-тестом.

5. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

1. У зависности од употребљеног екстрагенса, поларног (70% етанол, 45% пропиленгликол, 80% пропиленгликол, пречишћена вода) или неполарног (пречишћено маслиново уље и сунцокретово уље) и примењене екстракционе методе (мацерација, дигестија, перколација, Soxhlet и ултразвучна екстракција) израђени су екстракти плода дивље јабуке (ЕПДЈ) различитих органолептичких и физичко-хемијских карактеристика, различитог квалитативног и квантитативног садржаја полифенолних (ПФ) једињења и воћних киселина (ВК), као и различите *in vitro* одређене антиоксидативне активности (АА), ефикасности и безбедности примене на фибробластним ћелијама L929 ћелијске линије.
2. Израђени ЕПДЈ су били светло жуто-браон до карамел боје (екстракти добијени Soxhlet екстракцијом били су најтамнији), мириса на коришћену дрогу или примењени екстрагенс (најизраженије код етанолних ЕПДЈ), бистри до благо замућени (водени ЕПДЈ), без видљивих честица. До значајне промене органолептичких особина израђених ЕПДЈ није дошло током целокупног периода испитивања и чувања (365 дана) на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.
3. рН вредности израђених ЕПДЈ непосредно након израде кретале су се у распону од 3,17 за ВМ до 5,48 код 80ПГС. Водени ЕПДЈ су имали најниже рН вредности (од 3,17 за ВМ до 3,37 за ВС), док су 80ПГ-ЕПДЈ имали највише рН вредности (од 4,31 за 80ПГП до 5,48 за 80ПГС). Најнижи индекс преламања након израде одређен је код водених ЕПДЈ (од $1,341\pm 0,001$ за ВС до $1,345\pm 0,003$ за ВМ), док су уљани екстракти показали највише вредности индекса рефракције (од $1,424\pm 0,003$ за МуМ до $1,468\pm 0,002$ за СуМ). Пропиленгликолни ЕПДЈ су имали највећу густину ($1,071\pm 0,002\text{ g/cm}^3$ за 45ПГП), а код уљаних екстраката вредност густине била је у границама од $0,873\pm 0,001$ (МуД) до $0,918\pm 0,001\text{ g/cm}^3$ (СуМ). Значајна промена у рН вредности, индексу преламања светлости и густини испитиваних ЕПДЈ није

показана након 60 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, што може бити један од показатеља физичке стабилности ЕПДЈ у посматраном временском интервалу.

4. Испитивани ЕПДЈ потенцијално могу бити добар извор природних биоактивних ПФ једињења (фенола, флавоноида, танина и антоцијана). Садржај ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ је био различит и кретао се за: феноле у распону од 172,91 до 1556,99 mgГКЕ/100g с.д.; флавоноиде од 3,97 до 182,22 mgРЕ/100g с.д.; танине од 72,73 mgКЕ/100g с.д. до 8872,73 mgКЕ/100g с.д. и антоцијане од 0,70 до 14,63%. Екстракти израђени поларним екстрагенсима су били богатији фенолним једињењима (најбогатији етанолни и пропиленгликолни ЕПДЈ), док су ЕПДЈ добијени неполарним екстрагенсима били богатији флавоноидима, танинима (ЕПДЈ добијени маслиновим уљем) и антоцијанима (ЕПДЈ добијени сунцокретовим уљем). Примењен метод екстракције је имао утицај на садржај ПФ једињења у екстрактима, при чему су ултразвучна екстракција и мацерација биле најпогодније методе за екстракцију ПФ једињења поларним екстрагенсима, а дигестија неполарним екстрагенсима (најбогатији ПФ био је Суд). Soxhlet екстракција је била погодна једино за екстракцију помоћу 80% пропиленгликола. Садржај ПФ једињења у испитиваним ЕПДЈ се смањио током чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ у периоду од две године (0,001 до 6,31%) у односу на садржај одређен непосредно након израде (од 0,02% до 9,68%), а најмањи пад садржаја ПФ једињења током чувања је регистрован код водених ЕПДЈ.
5. У испитиваним ЕПДЈ идентификован је велики број ПФ једињења, а као најзаступљенији идентификовани су: гална киселина, пирогалол, протокатехинска киселина и етил етар протокатехинске киселине, катехин, хлорогенска киселина, процијанидин Б2, кафена киселина, епикатехин, хиперозид, кверцетин и изокверцетин, кемферол-3-О-глукозид и флоридзин. Епикатехин је био заступљен у највећим концентрацијама у већини испитиваних ЕПДЈ (конц. се кретала у распону од 128,86 до 6946,59 mgПФ/100g ЕПДЈ код екстраката добијених поларним екстрагенсима и у концентрацији од 108,56 mgПФ/100g ЕПДЈ за МуД и 5368,11 mgПФ/100g ЕПДЈ за Суд). Процијанидин Б је у ЕПДЈ био заступљен у концентрацији од 88,65 до 2469,59 mgПФ/100g. Испитивани ЕПДЈ су били богати и галном и хлорогенском киселином, пирогалол и катехином, док су остала ПФ једињења идентификована у концентрацијама нижим од 20 mgПФ/100g ЕПДЈ.

6. У испитиваним ЕПДЈ идентификоване су следеће воћне киселине: лимунска киселина, јабучна, ћилибарна, винска, пирогрожђана и млечна киселина. Ћилибарна киселина је била заступљена у ЕПДЈ у највећој концентрацији (од 28,07 до 3595,75 mgVK/100g), а затим јабучна киселина (од 35,32 до 578,05 mgVK/100g ЕПДЈ). Екстракти добијени применом поларних екстрагенаса су били богатији ВК у односу на ЕПДЈ добијене неполарним екстрагенсима непосредно након израде, као и након чувања у периоду од две године на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Извршена је и стандардизација садржаја ВК у испитиваним ЕПДЈ. Екстракти израђени помоћу 70% етанола и воде и методама мацерације и ултразвука су садржале највише ВК непосредно након израде (4,71% за 70ЕтУ и 4,29% за ВМ), док је садржај ВК у МуД и Суд био 2,33% и 2,62%, респективно. Након чувања у периоду од две године, садржај ВК у испитиваним ЕПДЈ је био нижи (у распону од 0,01% за МуМ до 2,98% за ВМ) у односу на садржај одређен непосредно након израде (од 0,28% до 4,71%).
7. Утврђено је да *in vitro* антиоксидативни потенцијал израђених ЕПДЈ зависи од врсте екстрагенаса и метода екстракције, тако да су ЕПДЈ добијени применом поларних екстрагенаса показали бољу АА у односу на ЕПДЈ добијене неполарним екстрагенсима, применом сва три теста - DPPH, FRAP и тест са линолном киселином. Од поларних, екстракти израђени коришћењем 70Ет, 45ПГ и воде, методама ултразвука и мацерације су имали најбољу АА. Највећу АА показао је 70ЕтУ, кроз сва три теста (АА за 70ЕтУ је била 78,43 %RSC, 7,48 mM Fe²⁺ и 95,32 %АОА). Од неполарних екстраката Суд је имао најинтензивнију АА (35,20 %RSC, 7,62 mM Fe²⁺ и 66,88 %АОА). Ултразвучна екстракција код поларних екстрагенаса и дигестија код неполарних су биле најоптималније методе за израду екстраката високе АА. Такође, показана је и добра корелација између АА и укупног садржаја ПФ једињења у ЕПДЈ. Након 180 дана чувања екстраката на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ је показано да су ЕПДЈ и даље имали добру АА, иако мању него непосредно након израде (осим код 80ПГ-ЕПДЈ). Код уљаних ЕПДЈ је дошло до незнатног повећања АА, вероватно као последица ослобађања екстрахованих антиоксидативних активних супстанци (ПФ једињења и ВК) током времена.
8. Применом ЕПДЈ на фибробластним ћелијама L929 ћелијске линије (у конц. од 0,05; 0,2; 0,5; 2,0 и 5,0 vol%) показано је да су сви ЕПДЈ добијени поларним екстрагенсима при ниским концентрацијама (конц. 0.05 и 0.2 vol%) нецитотоксични,

и да водени ЕПДЈ показују и стимулаторни ефекат на вијабилност фибробластних ћелија. Са повећањем концентрације ЕПДЈ (конц. 0.5, 2.0 и 5.0 vol%) наведени стимулаторни ефекат на вијабилност фибробластних ћелија пропорционално изостаје. Показано је да метода екстракције не утиче значајно на цитотоксични ефекат ЕПДЈ, док врста екстрагенса утиче. ЕПДЈ добијени водом као екстрагенсом су били нецитотоксични и имали су најбољи ефекат на вијабилност ћелија (преко 80%) у свим примењеним концентрацијама у односу на остале поларне екстракте. 70Ет и 45ПГ-ЕПДЈ су такође показали повољан ефекат на вијабилност ћелија.

9. ЕПДЈ одређених карактеристика (висок садржај ПФ и ВК, добра *in vitro* АА и повољан ефекат на вијабилност фибробластних ћелија): 70ЕтУ, 45ПГУ, ВУ и Суд, су инкорпорирани у емулзионе системе (кремове у/в типа) стабилизоване конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима (ЕЕ емулзије и МЕ емулзије, респективно) у концентрацији од 6%. Органолептичка испитивања ових емулзија показала су да су након израде емулзије биле бледо беж до окер боје (најтамније са 45ПГУ, најсветлије са Суд). Врста емулгатора имала је утицај на боју (МЕ емулзије су биле тамније боје у односу на одговарајуће ЕЕ емулзије), док су плацебо узорци били беле боје. Сви узорци непосредно након израде су били без мириса, сјајни, полуврсте конзистенције (МЕ емулзије гушћи у односу на ЕЕ емулзије), хомогени и добре размазивости. Након 60 дана, односно 180 и 365 дана чувања на $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ (заштићено од директне светлости), није дошло до значајне промене у органолептичким особинама (осим у размазивости код ЕЕ емулзија која је била незнатно лошија након чувања), што може указати на потенцијалну физичку стабилност формулисаних емулзија са 6% ЕПДЈ.
10. рН вредност емулзија са 6% ЕПДЈ (у распону од $5,69\pm 0,05$ до $6,62\pm 0,11$) показала је зависност од поларности инкорпорираних екстраката. Емулзије са поларним екстрактима имале су ниже рН вредности ($5,69\pm 0,05$ до $5,90\pm 0,01$) од плацебо узорака, док су неполарни екстракти имали више вредности рН (код МЕСуд и ЕЕСуд су регистроване рН вредности $6,58\pm 0,02$ и $6,62\pm 0,11$ респективно). Кисела природа поларних ЕПДЈ је утицала на снижавање рН вредности емулзионих носача. Другачија расподела уљаних екстраката у емулзијама није доводила до промена рН вредности носача. Измерене вредности електричне проводљивости за све израђене емулзије су потврдиле да су испитивани узорци хидрофилне емулзије, тј. емулзије

у/в типа (проводљивост је била изнад $50 \mu\text{S}/\text{cm}$). Стабилна и очувана рН вредност испитиваних емулзија са ЕПДЈ на скоро истом нивоу током целокупног периода испитивања (180 дана) и у оквиру препоручених вредности за производе намењене за примену на кожу, као и стабилна и очувана електрична проводљивост (током 180 дана) могу бити један од показатеља задовољавајуће физичко-хемијске стабилности испитиваних емулзија као и погодности за примену на кожу.

11. Резултати поларизационе и светлосне микроскопије испитиваних емулзија са 6% стандардизованих ЕПДЈ непосредно након израде указали су на стабилизацију емулзија формирањем ламеларно-течно кристалне фазе и/или ламеларног гела, као и на присуство диспергованих капи уљане фазе, које се образују услед присуства мешаних емулгатора у емулзионим системима. Уочено је израженије присуство течних кристала код МЕ емулзија у односу на ЕЕ емулзије, што је последица стабилизације емулзија различитим емулгаторима. Инкорпорирање ЕПДЈ није утицало на емулзиону структуру основног носача. Добијене микрографије након 180 дана чувања на $22 \pm 2^\circ\text{C}$ указују на постојање очуваних структура течних кристала, што може указати на стабилност успостављене микроструктуре емулзија.
12. Резултати добијени анализом органолептичких и физичко-хемијских карактеристика као и поларизационом и светлосном микроскопијом након подвргавања испитиваних емулзија са ЕПДЈ тестовима убрзаног старења (тест центрифугирања и тест цикличних промена температуре) указују да се ради о стабилним емулзионим системима који потенцијално могу бити добри носачи за ЕПДЈ. Најбољу стабилност и најбоље очување структуре течних кристала су показале емулзије са 45ПГУ (посебно МЕ45ПГ), док су најмању стабилност показале емулзије са Суд (посебно ЕЕСуд) код којих је дошло до нарушавања структуре течних кристала и издвајања уљаних капи из емулзионог система.
13. У формулисаним емулзијама са 6% стандардизованих ЕПДЈ идентификован је велики број ПФ једињења, при чему су, непосредно након израде, најзаступљенији били: епикатехин (најзаступљенији у конц. од $285,37\text{mg}/100\text{g}$ емулзије код ЕЕ70ЕтУ), процијанидин Б2, хлорогенска киселина, затим кафена и протокатехинска киселина, изокверцетин, кемферол-3-О-глукозид и флоридзин. Ова ПФ једињења су била најзаступљенија и у израђеним ЕПДЈ (у еквивалентној

количинина). Садржај ПФ једињења зависио је од врсте коришћеног емулгатора (просечан садржај ПФ једињења у ЕЕ емулзијама био је 0,10% док је за МЕ емулзије био 0,04%), што додатно указује на различиту структурираност емулзионих система са конвенционалним односно биодеградабилним емулгаторима. Емулзије са неполарним екстрактима, очекивано су, садржале ниже концентрације ПФ (Суд је била најсиромашнија ПФ једињењима) у односу на емулзије са поларним екстрактима.

14. У формулисаним емулзија са 6% ЕПДЈ идентификоване су следеће ВК: лимунска, јабучна, ћилибарна (у највећој концентрацији од 43,40mg/100g до 200,58mg/100g емулзије), винска, пирогрождјана и млечна киселина (исти профил киселина као и у коришћеним ЕПДЈ). Током целокупног периода испитивања стабилности емулзија (12 месеци) показана је незнатно боља способност МЕ емулзија за очувањем садржаја ВК у односу на ЕЕ емулзије. Садржај ВК у емулзијама са ВУ је остао скоро непромењен током испитиваног периода од годину дана (након 12 месеци садржај ВК је био 0,17% за МЕВУ и 0,10 за ЕЕВУ%). Ове емулзије су и непосредно након израде имале висок садржај ВК (0,18% за МЕВУ и 0,13% за ЕЕВУ).

15. АА активност испитиваних емулзије са различитим ЕПДЈ се непосредно након израде кретала у распону од 3,18 %RSC за ЕЕСуд до 56,13 %RSC за МЕ70ЕтУ и значајно је зависила од врсте примењеног ЕПДЈ и/или врсте емулгатора. АА формулисаних емулзија са ЕПДЈ је била боља у односу на плацебо узорке (након израде од 1,85 до 6,0 %RSC), што може указати на значајан утицај присуства антиоксидативних ПФ једињења и ВК из ЕПДЈ на повећање АА емулзија са ЕПДЈ. Током целокупног периода испитивања (180 дана) најбољу АА су показале емулзије са 70ЕтУ и 45ПГ. Незнатно бољу *in vitro* АА након израде су имале МЕ емулзије (од 7,24 %RSC за МЕСуд до 56,13 %RSC за МЕ70ЕтУ) у односу на ЕЕ емулзије (3,18 %RSC за ЕЕСуд до 48,10 %RSC за ЕЕ70ЕтУ). Након 180 дана чувања дошло је до смањења АА и измерене %RSC вредности су се кретале од 14,03 %RSC за МЕВУ до 61,87 %RSC за ЕЕ45ПГУ, док је код емулзија са Суд дошло до незнатног повећања АА (што указује на специфично структурирање емулзија са уљаним ЕПДЈ). Након 180 дана чувања ЕЕ емулзије су показивале бољи антиоксидативни потенцијал у односу на МЕ емулзије. Испитивање АА указало је на потенцијалну погодност свих формулисаних емулзија да буду носачи за 6% ЕПДЈ са аспекта антиоксидативне

ефикасности (најбоља АА током испитивања је показана за МЕ емулзије и емулзије са 70ЕтУ и 45ПГУ) и као такве би се потенцијално могле користити у превенцији и/или третману различитих промена на кожи узрокованих оксидативним стресом.

16. У *in vivo* студији испитивања иритационог потенцијала емулзија са ЕПДЈ (као сегмента испитивања безбедности примене), утврђени су повољни ефекти примене под оклузијом у смислу: изостанка локалних нежељених ефеката (дошло је до смањења вредности ЕИ након апликације емулзија са ЕПДЈ у односу на контролне узорке); изостанка негативног утицаја на рН коже (дошло је до занемарљивог пада вредности, с тим што се мора узети у обзир и кисела природа ПДЈ и ЕПДЈ као КАС); изостанка неповољног утицаја на баријерна својства коже (дошло је до незнатног повећања TEWL-а, што је највероватније последица саме оклузије); регистровано је повећање хидратације коже (услед присуства влажећих супстанци у ЕПДЈ, а делимично и услед саме оклузије). Изостанак иритације коже и повољнији безбедносни профил емулзија са ЕПДЈ у односу на обе контроле свакако може указати да је присуство ПФ једињења и ВК у ЕПДЈ веома значајно у смислу њиховог антииритантног деловања.

17. Након једнократне апликације формулисаних емулзија са 6% ЕПДЈ (а у периоду од 180 минута по примени) на кожу здравих испитаника долази до повећања влажности коже у односу на базалне вредности (ΔEC од $10,12 \pm 5,86$ до ΔEC $34,70 \pm 22,34$). Ово повећање влажности коже након примене МЕ емулзија (у периоду од 180 мин), вероватно је последица постепеног ослобађања воде из система ламеларних течних кристала. За разлику од њих, ЕЕ емулзије су доводиле само до доброг иницијалног влажења коже (након 30 мин. од једнократне примене), што може бити последица накнадне измене у структури течних кристала код ових емулзија (услед накнадне структурације емулзионог система може доћи до конкуренције између примењеног конвенционалног емулгатора и коже за везивањем воде, што свакако може утицати на смањење потенцијала за влажењем коже). МЕ емулзије су биле богатије и влажећим биоактивним супстанцама (воћним киселинама и ПФ једињењима) што се одразило и на бољи ефекат на хидратацију коже. Апликација емулзија са ЕПДЈ није значајно утицала на баријерна својства коже (повољнији утицај МЕ емулзија) и рН вредност, није регистрован иритирајући ефекат, али је детектована промена боје

коже у смислу њеног посветљивања (смањење меланин индекса). МЕ емулзије су показале значајније смањење MI, посебно ME45ПГУ у односу на остале емулзије.

18. Дobar потенцијал влажења коже формулисаних емулзија са 6% ЕПДЈ показан је и у дуготрајној *in vivo* студији испитивања (апликација узорака на здраву кожу испитаника у периоду од 28 дана). Већа хидратисаност коже након примене испитиваних емулзија са ЕПДЈ у односу на нетретирана места и плацебо узорке указује на повољан влажећи ефекат активних супстанци из ЕПДЈ (ВК и ПФ једињења) као и на евентуални синергизам ових активних супстанци и емулзионих носача. Најбољи ефекат хидратације коже након 28 дана примене је регистрован на кожи на коју су апликоване емулзије МЕВУ ($\Delta EC\ 21,06 \pm 6,96$) и ЕЕВУ ($\Delta EC\ 16,70 \pm 8,79$). Након 14 дана ЕЕ емулзије су боље хидратисале кожу у односу на МЕ емулзије, док су МЕ емулзије након 28 дана апликације боље хидратисале кожу, вероватно, захваљујући специфичној структури течних кристала формираних у овим емулзионим системима, која омогућава постепено односно продужено влажење коже.
19. Формулисане емулзије са 6% ЕПДЈ нису знатно утицале на баријерну функцију коже као ни на рН вредност коже након апликације у периоду од 28 дана. Током апликације испитиваних емулзија регистрован је пад EI, што би могло да се доведе у везу са антииритантним ефектом самих ЕПДЈ који је последица присуства пре свега ПФ једињења. Регистрован је незнатно бољи антииритантни ефекат МЕ емулзија у односу на ЕЕ емулзије, што указује да врста емулгатора коришћеног за стабилизацију система није имао већи утицај на ову врсту ефикасности емулзија. Тип примењеног ЕПДЈ је имао утицај на *in vivo* ефекте испитиваних емулзија на кожи. Након примене ME70EtУ регистровано је смањење EI параметра након 28 дана апликације у односу на базалну вредност ($\Delta EI\ -22,22 \pm 22,98$), док је након примене МЕВУ регистровано значајно смањење EI параметра и након 14 дана ($\Delta EI\ -12,11 \pm 10,54$) и након 28 дана ($\Delta EI\ -21,00 \pm 24,69$). Може се предпоставити да се испитиване емулзије са ЕПДЈ (емулзије стабилизоване биодеградабилним емулгаторима и са 70EtУ и ВУ-ЕПДЈ) потенцијално могу користити као (дермо)козметички производи у превенцији и/или третману суве и иритиране коже.

20. Формулисане емулзије са 6% ЕПДЈ поседују добар потенцијал за посветљивањем вештачки изазваних хиперпигментација коже (у тесту *in vivo*), што је вероватно последица делом природне ексфолијације/десквamacије коже и значајним делом ексфолијације/десквamacије коже услед деловања ВК присутних у ЕПДЈ. Разлика у хипопигментационом ефекту који су остваривале емулзије са 6% ЕПДЈ је регистрована у односу на нетретирана места и плацебо узорке, што свакако може указати да су идентификоване воћне киселине и ПФ једињења из ЕПДЈ значајно утицале на остваривање ефеката посветљивања вештачки изазваних хиперпигментација коже. Процес смањења пигментација праћен је смањењем иритације коже (може се претпоставити због присуства ПФ једињења и ВК у инкорпорираним ЕПДЈ). Разлика у МI вредностима коже након 7 дана апликације емулзија и базалних вредности је указала да МЕ емулзије у односу на ЕЕ емулзије показују бољи ефекат посветљивања хиперпигментација коже уз интензивнији антииритантни ефекат. Емулзије са 70ЕтУ су биле најефикасније као хипопигментациони агенс. Сходно резултатима ове студије ЕПДЈ (70ЕтУ и 45ППП) би потенцијално могли да се користе као КАС у (дермо)козметичким производима (стабилизоване биодеградабилним емулгаторима) намењеним за уједначавање боје коже и у третману посветљивања хиперпигментација коже.

Добијени резултати показују да су формулисане емулзије са 6% стандардизованог екстракта плода дивље јабуке, као извором антиоксидативних, влажећих и ексфолијантних биоактивних супстанци (полифенолна једињења и воћне киселине), стабилизоване конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима (посебно емулзије стабилизоване биодеградабилним емулгаторима и са воденим, односно, 70% етанолним, односно 45% пропиленгликолним екстрактом као КАС) стабилне у периоду од 12 месеци, са добрим безбедносним профилем и са задовољавајућим антиоксидативним, хидратантним и посветљујућим ефектима на кожи, па сходно томе, могу бити погодне за потенцијалну примену као (дермо)козметички производи за примену у превенцији и/или третману промена на кожи насталих услед деловања оксидативног стреса, за хидратацију коже, као и за посветљивање хиперпигментисане коже.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aburjai T. and Natsheh F.M. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.* 2003; 17: 987-1000.
2. Al-Bawab A. and Friberg S.E. Amphiphilic association structures in a model skin lotion with hydroxy acids. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2004; 26: 139-147.
3. Almeida I.F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R.M., Pereira T.M., Amaral M.H., Costa P.C. and Bahia M.F. In vivo skin irritation potential of a *Castanea sativa* (Chestnut) leaf extract, a putative natural antioxidant for topical application. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008; 103(5): 461–467.
4. Altisent R., Plaza L., Alegre I., Vinas I. and Abadias M. Comparative study of improved vs. traditional apple cultivars and their aptitude to be minimally processed as “ready to eat” apple wedges. *Food Sci. Techn.* 2014; 58: 541-549.
5. Amzad Hossain M., Salehuddin S.M., Kabir M.J., Rahman S.M.M. and Vasantha Rupasinghe H.P. Sinensetin, rutin, 3-hydroxy-5, 6, 7, 4' -tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. *Food Chem.* 2009; 113: 187–190.
6. Arct J. and Pytkowska K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin. Dermatol.* 2008; 26: 347-357.
7. Arsić I., Tadić V., Đorđević S., Žugić A., Vujić Z. and Petrović S. Optimization of extraction of antioxidant components from Yarrow herb. *Hem. Ind.* 2014; 68(4): 511-517.
8. Arsić I., Žugić A., Tadić V., Tasić-Kostov M., Mišić D., Primorac M. and Runjajić Antić D. Estimation of Dermatological Application of Creams with St. John’s Wort Oil Extracts. *Molecules.* 2011; 17(1): 275-94.
9. Arsić I., Žugić A., Runjajić Antić D., Zdunić G., Dekanski D., Marković G., Tadić V. *Hypericum Perforatum* L. Hypericaceae/Gutiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress - Induced Gastric Lesions. *Molecules.* 2010; 15: 6688-6698.
10. Bárány E., Lindberg M. and Loden M. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *Int. J. Pharm.* 2000; 195: 189-195.
11. Barel A.O., Clarys P. and Gabard B. In vivo evaluation of the hydration state of the skin: Measurements and methods for claim support. In: Elsner P., Merk H.F. and Maibach H.I.

- (Eds.), *Cosmetics-controlled efficacy studies and regulation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1999; 57-81.
12. Baumann L. Skin aging and its treatment. *J. Pathol.* 2007; 211: 241-251.
 13. Begić-Akagić A., Spaho N., Oručević S., Drkenda P., Kurtović M., Gaši F., Kopjar M. and Piližota V. Influence of cultivar storage time and processing on the phenol content of cloudy apple juice. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2011; 3: 1–8.
 14. Benzie I.F.F. Evolution of dietary antioxidants. *Comp. Biochem. Phys. A.* 2003; 136(1): 113-126.
 15. Benzie I.F.F. and Strain J.J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996; 239: 70–76.
 16. Berardesca E., Distanto F., Vignoli G.P., Oresajo C. and Green B. Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function. *Br. J. Dermatol.* 1997; 137: 934-938.
 17. Berardesca E. and Maibach H. Stratum corneum water content and TEWL, In: Bronaugh R., Maibach H. (Eds), *Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1999; 529-535.
 18. Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res. Technol* 1997; 3: 126-132.
 19. Briden M.E. Alpha-hydroxy acid chemical peeling agents: case studies and rationale for safe and effective use. *Cutis.* 2004; 73(2): 18-24.
 20. Carbone K., Giannini B., Picchi V., Lo Scalzo R. and Cecchini F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chem.* 2011; 127(2): 493–500.
 21. Carocho M. and Ferreira C.F.R.I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chem. Toxic.* 2013; 51: 15-25.
 22. Caussin J., Wouter Groenink H.W., de Graaff A.M., Gooris G.S., Wiechers J.W., van Aelst A.C. and Bouwstra J.A. Lipophilic and hydrophilic moisturizers show different actions on human skin as revealed by cryo scanning electron microscopy. *Exp. Dermatol.* 2007; 16: 891-898.
 23. Cekić C. and Ozgen M. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *J. Food Comp. Anal.* 2010; 23: 540–544.
 24. Chisvert A., Balaguer A. and Salvador A. Tanning and whitening agents in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. *Analysis Cosmet. Prod.* 2007; 128-140.

25. Choueiri L., Sanda Chedea V., Calokerinos A. and Kefalas P. Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC–MS. *Food Chem.* 2012; 133: 1039-1044.
26. Clarys P., Alewaeters K., Lambrecht R. and Barel A.O. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin Res. Technol.* 2000; 6: 230-238.
27. Clarys P., Clijsen R., Taeymans J. and Barel A.O. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825®) and the impedance method (Skicon-200EX®). *Skin Res. Technol.* 2011; 4: 445-450.
28. Colipa report on the 8 World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, 2011.
29. Colipa Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products, Third edition, May, 2008.
30. Dahl A., Yatskayer M., Raab S. and Oresajo C. Tolerance and efficacy of a product containing ellagic and salicylic acids in reducing hyperpigmentation and dark spots in comparison with 4% hydroquinone. *J. Drugs Dermatol.* 2013; 12(1): 52-58.
31. Di Mambro V., Azzolini A., Valim Y. and Fonseca M. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int. J. Pharm.* 2003; 262: 93-99.
32. Di Mambro V. and Fonseca M. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 37: 287–295.
33. Draelos Z.D. The cosmeceutical realm. *Clin. Dermatol.* 2008; 26: 627-632.
34. Draelos Z.D. Active agents in common skin care products. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010; 125(2): 719-724.
35. Draelos Z.D., Yatskayer M., Bhushan P. et. al. Evaluation of a kojic acid, emblica extract and glycolic acid formulation compared with hydroquinone 4% for skin lightening. *Cutis.* 2010; 86: 153-158.
36. Eccleston G.M. The microstructure and properties of fluid and semisolid lotions and creams. *IFSCC Magazine* 2010; 3(4): 167-174.
37. Eccleston G.M. The importance of mesomorphic (lamellar) phases in emulsion stability. *J. Cosmet. Sci.* 2001; 52: 142-143.

38. Eccleston G.M. Formulating cosmetic emulsions. *Cosmet. Toiletries*. 1997 a); 112: 65-71.
39. Eccleston G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloid. Surface. A*. 1997 б); 123-124: 169-182.
40. Ehlers C., Ivens U.I., Müller M.L., Senderowitz T. and Serup J. Females have lower skin surface pH than men. *Skin Res. Technol*. 2001; 7: 90-94.
41. Elden H. Protocols and strategies for biophysical testing, In: Waggoner W. (Ed). Clinical safety and efficacy testing of cosmetics, Marcel Dekker, New York, Basel. 1990; 93-115.
42. ElGammal C., Pagnoni A., Kligman A.M. and ElGammal S. A model to assess the efficacy of moisturizers: the quantification of soap-induced xerosis by image analysis of adhesive-coated discs (D-Squames(R)). *Clin. Exp. Dermatol*. 1996; 21: 338–343.
43. Epstein H. Cosmeceutical vehicles. *Clin. Dermatol*. 2009; 27: 453-460.
44. Fang J.Y., Leu Y., Fang C.L. and Chiu H.C. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *Int. J. Pharm*. 2003; 255: 153–166.
45. Fendler E.J. Physico-chemical consideration. In: Loden M. and Maibach H.I. (Eds.), *Dry Skin and Moisturizers*, 1st ed., Boca Raton: CRC Press. 2000. p. 175-182.
46. Fine A.M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev*. 2000; 5(2): 144.
47. Fischer T.W., Wigger-Alberti W. and Elsner P. Assessment of dry skin: current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol. Physiol*. 2001; 14: 183-195.
48. Fluhr J.W., Cavallotti C. and Berardesca E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. *Clin. Dermatol*. 2008; 26: 380-386.
49. Food and Drug Administration, European Pharmacopoeia, 6th ed. Council of Europe, Strasbourg. 2008.
50. Franco D., Sineiro J., Rubilar M., Sánchez M., Jerez J., Pinelo M., Costoya N. and José Núñez M. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidative power. *J. Environ. Agric. Food Chem*. 2008; 7: 3210–3216.
51. Franquin-Trinquir S., Maury C., Baron A., Le Meurlay D. and Mehinagic E. Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: comparison of pressurized liquid–solid extraction and manual-liquid extraction. *J. Agric. Food Chem*. 2014; 34: 56–67.
52. Gao X., Zhang L., Wei H. and Chen H. Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clin. Dermatol*. 2008; 26: 367-374.

53. Georǵe S., Brat P., Alter P. and Amiot M.J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1370–1373.
54. Giacomoni P.U., Mammone T. and Teri M. Gender-linked differences in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 2009; 55(3): 144-149.
55. Geetha D. and Tyagi R. Alkyl Poly Glucosides (APGs) surfactants and their properties: A review. *Tensides Surf. Deterg.* 2012; 49(5): 417-427.
56. Goland C. and Bauer S. When the apple falls close to the tree. Local food systems and the preservation of diversity. *Renew. Agric. Food Syst.* 2004; 19: 228–236.
57. Gordon H.M. and Maisuthisakul P. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chem.* 2009; 117: 332–341.
58. Green B., Yu R.J. and Van Scott EJ. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.* 2009; 27: 495-501.
59. Gupta A.K., Gover M.D., Nouri K. and Taylor S. The treatment of melasma: A review of clinical trials. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 2006; 55: 1048-1065.
60. Hachem J., Crumrine D., Fluhr J., Brown B.E., Feingold K.R. and Elias P. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 121(2): 345-353.
61. Hagen S.F., Borge G.I.A., Bengtsson G.B., Bilger W., Berge A., Haffner K. and Solhaug K.A. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biol. Technol.* 2007; 45: 1–10.
62. Halder R.M. and Richards G.M. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Ther. Lett.* 2004; 9: 1-3.
63. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 2008; 476: 107–112.
64. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35: 1147–1150.
65. Harding C.R. The stratum corneum. Structure and function in health and disease. *Dermatol. Ther.* 2004; 17(1): 6–15.
66. Harold J.B. Relevance of Cosmeceuticals to the Dermatologic Surgeon. *Dermatol. Surg.* 2005; 31: 796–798.
67. Holmberg K. Natural surfactants. *Curr. Opin. Colloid. In* 6, 2001; 148-59.
68. Imeh U. and Khokhar S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6301–6306.

69. Iqbal S., Younas U., Sirajuddin Chan K.W., Sarfraz R.A. and Uddin M.K. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 6651–6664.
70. Jacobi U., Gautier J., Sterry W. and Ladermann J. Gender-related differences in the physiology of the Stratum Corneum. *Dermatology.* 2005; 211: 312-317.
71. Jakobek L., Garcia-Villalba R. and Tomas-Barberan F.A. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *J. Food Compos. Anal.* 2013; 31: 199–211.
72. Jaksić I., Lukić M., Malenović A., Reichl S., Hoffmann C., Müller-Goymann C., Daniels, R. and Savić S. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: physicochemical and in vitro/in vivo characterization-a ketoprofen case study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 80(1): 164-175.
73. Jirova D., Kejlova K., Brabec M., Bendova H. and Kolarova H. The benefits of the 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: Long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic. *Toxicol In Vitro.* 2003; 17: 791-796.
74. Junginger H.E. Multiphase emulsions. In: Riegr M.M. and Rhein L.D. (Eds.), *Surfactants in cosmetics*, Marcel Dekker, New York. 1997; 155-182.
75. Југословенска Фармакопеја, издање 4. (Ph Jug IV), 1984.
76. Kalinowska M., Bielawska A., Lewandowska-Siwkiewicz H., Priebe W. and Lewandowski W. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol. Biochem.* 2014; 84: 169–188.
77. Khalid N., Kobayashi I., Neves M., Uemura K., Nakajima M. and Nabetani H. Monodisperse W/O/W emulsions encapsulating l-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2014; 458: 69-77.
78. Khan M.A., Rahman A.A., Islam S., Khandokhar P., Parvin S., Islam M.B., Hossain M., Rashid M., Sadik G., Nasrin S., Mollah M.N. and Alam A.H. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res. Notes.* 2013; 19: 6–24.
79. Klein K. Cosmeceutical formulation consideration. In: Draelos Z.D. (Ed.), *Cosmeceuticals*, New York, Elsevier Saunders. 2005; 19-22.
80. Kligman L.H. Photoaging. Manifestations, prevention and treatment. *Clin. Geriatr. Med.* 1989; 5: 235-251.

81. Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress-new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 1999; 53: 181-192.
82. Korhonen M., Lehtonen J., Hellen L., Hirvonen J. and Yliruusi J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *Int. J. Pharm.* 2002; 247: 103-114.
83. Kubola J., Siriamornpun S. and Meeso N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chem.* 2011; 126: 972–981.
84. Kunradi Vieira F.G., Campelo Borges G.D.S., Copetti C., Amboni R.D.M.C., Denardi F. and Fett R. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. *Sci. Hortic.* 2009; 122: 421–425.
85. Kunradi Vieira F.G., Campelo Borges G.D.S., Copetti C., Di Pietro P.F., Nunes E.D.C. and Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. *Sci. Hortic.* 2011; 128: 261–266.
86. Ladizinski B., Mistry N. and Kundu R. Widespread use of toxic skin lightening compounds: Medical and psychosocial aspects. *Dermatol. Clin.* 2011; 29: 111-123.
87. Lesjak M.M., Beara I.N., Orčić D.Z., Anačkov G.T., Balog K.J., Francišковић M.M. and Mimica-Dukić N.M. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem.* 2011; 124: 850–856.
88. Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003; 4(11): 771–778.
89. Лукић М. Формулациона истраживања дермокозметичких емулзија за влажење коже: концепт упоредне реолошке, текстурне и сензорне процене. *Докторска дисертација*. Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Србија. 2014.
90. Ma B., Chen J., Zheng H., Fang T., Ogutu C., Li S., Han Y. and Wu B. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. *Food Chem.* 2015; 172: 86-91.
91. Mahrhauser D., Nagelreiter C., Baierl A., Skipiol J. and Valenta C. Influence of a multiple emulsion, liposomes and a microemulsion gel on sebum, skin hydration and TEWL. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015; 37(2): 181-186.
92. Makai M., Csanyi E., Nemeth Zs., Palinkas J. and Eros I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int. J. Pharm.* 2003; 256: 95-107.
93. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(5): 727-747.

94. Maria John K.M., Enkhtaivan G., Kim J.J. and Kim D.H. Metabolic variation and antioxidant potential of *Malus prunifolia* (wild apple) compared with highflavon-3-ol containing fruits (apple, grapes) and beverage (black tea). *Food Chem.* 2014; 163: 46–50.
95. Marquele F., Di Mambro V., Georgetti S., Casagrande R., Valim Y. and Fonseca M. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 39: 455–462.
96. Marty J.P. NMF and cosmetology of cutaneous moisturisation. *Ann Dermatol Venereol.* 2002; 129: 131-136.
97. McCord J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* 2000; 108: 652- 659.
98. McGhie T.K., Hunt M. and Barnet L.E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 3065–3070.
99. McIntosh T.J. Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys. J.* 2003; 85: 1675–1681.
100. Mendoza-Wilson A.M., Castro-Arredondo S.I., Espinosa-Plascencia A., Robles-Burgueño Mdel R., Balandrán-Quintana R.R. and Bermúdez-Almada Mdel C. Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. *Heliyon.* 2016; 2(2): 19.
101. Milošević Z. i Bogdanović D. Statistika i informatika u oblasti medicinskih nauka. Galaksija. Niš. Srbija. 2012.
102. Milutinović M.D., Šiler-Marinković S.S., Antonović D.G., Mihajlovska K.R., Pavlović M.D. and Dimitrijević-Branković S.I. The antioxidant properties of dried extracts from the spent espresso coffee. *Hem. Ind.* 2013; 67(2): 261–267.
103. Miyachi Y. Photoaging from an oxidative standpoint. *J. Dermatol. Sci.* 1995; 9: 79-86.
104. Naik A., Kalia Y.N., Pirot F. and Guy R.H. Characterization of molecular transport across human stratum corneum in vivo. In: Bronaugh R.L., Mailbach H.I. Eds. *Percutaneous Absorption 3rd edn*, New York, Marcel Dekker Inc. 1999; pp.149-175.
105. Николић Г. и Митић Ж. Практикум из физичке хемије. Медицински факултет, Ниш. 2007.
106. Norlén L. Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003; 16: 203-211.

107. Ordon-ez A.A.L., Gomez J.D., Vattuone M.A. and Isla M.I. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) swart extracts. *Food Chem.* 2006; 97: 452–458.
108. Pallant J. SPSS Priručnik za preživljavanje. Preveli Šućur M. i Milanko O. Postupni vodič kroz analizu podataka pomoću SPSS-a. Prevod 4. izdanja. Mikro knjiga. 2011.
109. Pantelić I. and Lukić M. Alkyl Polyglucoside-based delivery systems: In vitro/in vivo skin absorption assessment. In: Pantelić I. Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Woodhead Publishing. Elsevier. UK. 2014; 107-134.
110. Pantelić I. and Cucković B. Alkyl Polyglucosides: An emerging class of sugar surfactants. In: Pantelić I. Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Woodhead Publishing. Elsevier. UK. 2014; 1-20.
111. Pavlović D., Vukelić M., Najman S., Kostić M., Zlatković B., Mihajilov-Krstev T. and Kitić D. Assessment of polyphenol content, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and toxic potentials of wild growing and cultured rue. *J. Applied Botany and Food Quality.* 2014; 87: 175-181.
112. Peres P.S., Terra V.A., Guarnier F.A. et al. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2011; 103: 93-97.
113. Pereira V., Camara J., Cacho J. and Marques J. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *J. Sep. Sci.* 2010; 33: 1204–1215.
114. Perricone N.V. Treatment of skin disorders with olive oil polyphenols. *PCT Int Appl* 2001; 16: WO0176579.
115. Петровић М. Сунчева трпеза: водич ка биодиверзитету Срије и слободној исхрани самониклим биљем. Београд: Центар за научна истраживања САНУ; Крагујевац: Универзитет, 2010 (Београд: МСТ Гајић).
116. Pietta P.G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1035-1042.
117. Pons-Guiraud A. Dry skin in dermatology: a complex physiopathology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2007; 21(2): 1-4.
118. Правилник о условима у погледу здравствене исправности предмета опште употребе који се могу стављати у промет, Службени лист СФРЈ бр. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 и 18/91.

119. Price M.L., Van Scoyoc S. and Butler L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. and Food Chem.* 1978; 26(5): 1214-1218.
120. Procházková D., Boušová I. and Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 513-523.
121. Prottey C. Essential fatty acids and the skin. *Brit. J. Dermatol.* 1976; 94: 579-587.
122. Rabe J.H., Mamelak A.J, McElgunn P.J. et al. Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 55: 1-19.
123. Ramos-E-Silva M. Hydroxy Acids and Retinoids in Cosmetics. *Clin. Dermatol.* 2001; 19: 460-466.
124. Rattan S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1230-1238.
125. Rawlings A.V., Canestrari D.A., Dobrowski B. Moisturizer technology versus clinical performance. *Dermatol Ther.* 2006; 17: 49-56.
126. Rawlings A.V. and Harding C.R. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 2004; 17(1): 43-48.
127. 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.
128. Rogiers V. Intensive course in dermatocosmetic sciences, Proceedings book 1 of 2, Session 1: Introduction and key issues in safety assessment of cosmetics. Vrije Universiteit Brussel. 2004; 13-17.
129. Rougier A., Lotte C., Bronaugh R.L. and Maibach H.I. *In vivo* relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss. Ed. Top abs derm prod, New York: Marcel Dekker. 2002; 114-127.
130. Royer M., Prado M., Garcia-Perez M.E., Diouf P.N. and Stevanović T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *Pharma Nutrition.* 2013; 158-167.
131. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P. et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* 1997; 378: 1247-1257.
132. Savić V., Nikolić V., Arsić I., Stanojević Lj., Najman S., Stojanović S. and Mladenović-Ranisavljević I. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytother. Res.* 2015; 29: 1117-1122.

133. Савић В. Хемијски састав и фармаколошке активности воденог екстракта корена гавеза (*Symphytum officinale L.*). Докторска дисертација. Технолошки факултет, Универзитет у Нишу, Србија, 2015.
134. Savić S., Pantelić I., Lukić M., Marković B. and Milić J. Behind the Alkyl Polyglucoside-based structures: Lamellar liquid crystalline and lamellar gel phases in different emulsion systems. In: Pantelić I. Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Woodhead Publishing. Elsevier. UK. 2014; 21-52.
135. Savić M.I., Nikolić D.V., Savić M.I., Nikolić B.Lj., Stanković Z.M. and Moder K. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Camellia sinensis* using the artificial neural network and response surface methodology. *Hem. Ind.* 2013; 67(2): 249–259.
136. Savić S., Lukić M., Jakšić I., Reichl S., Tamburić S. and Müller-Goymann C. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. *J. Colloid. Interface Sci.* 2011; 358(1): 182-191.
137. Savić S., Tamburić S. and Savić M. From conventional towards new - natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7. 2010; 353-369.
138. Savić S., Weber C., Savić M. and 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. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 220-230.
139. Савић С. Физичкохемијски аспекти и *in vitro/in vivo* карактеризација емулзионих система на нејонским емулгатором типа шећерног етра. Докторска дисертација. Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Србија, 2004.
140. Сарић М. Медицинско биље републике Србије, Издање 1, SASA, Београд, Србија. 1989.
141. Schiber A., Keller P. and Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 2001; 265-273
142. Schmid-Wendtner M.H. and Korting H.C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006; 19: 296-302.
143. Shin J.W. and Park K.C. Current clinical use of depigmenting agents. *Dermatol. Sinica.* 2014; 32: 205-210.

144. Shindo Y., Witt E. and Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 100: 260-265.
145. Singleton V.L. and Rossi J.A. Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 16: 144–158.
146. Sivaci A. Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. *Scientia Horticulturae.* 2006; 109: 234–237.
147. Smith E.W., Surber C., Tassopoulos T. and Maibach H. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. In: Bronaugh R.L. and Maibach H.I. (Eds.), *Topical absorption of dermatological products.* New York, Marcel Dekker. 2002; 457-463.
148. Smith W.P. Comparative effectiveness of α -hydroxy acids on skin properties. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1996; 18: 75-83.
149. Smith W.P. Hydroxy-acids and skin aging. *Cosmet. Toiletries.* 1994; 109: 41-47.
150. Solano F., Briganti S., Picardo M. and Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *J. Compilation.* 2006; 19: 550-571.
151. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1250-1258.
152. Stojiljković D., Tadić V., Stanković M., Roganović S. and Arsić I. Standardized extract of wild apple fruit in alkyl-polyglucoside-based cosmetic cream - estimation of stability, safety, antioxidant activity and efficiency. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2018; DOI:10.1111/ics.12462 (*In Press*).
153. Stojiljković D., Arsić I. and Tadić V. Extracts of Wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind. Crop Prod.* 2016 a); 80: 165-176.
154. Stojiljković D., Arsić I. and Tasić-Kostov M. The influence of polar and non-polar emollients on the structure and skin moisturizing potential of the emulsions stabilized by mixed emulsifier. *Acta med. Median.* 2016 б); 55(2): 25-30.
155. Stojiljković D., Arsić I. and Tadić V. Oil extracts of wild apple fruit as active substances in UV protection preparations. *Radiat. Applic. J.* 2016 в); 1(3): 187-192.
156. Stojiljković D., Arsić I., Tasić-Kostov M., Jovanović Z., Tadić V. and Đorđević S. Investigation of effects of different emollients on the structure and skin moisturizing Potential of the cosmetic creams. *Acta Fac. med. Naiss.* 2013; 3(4): 193-200.
157. Stojiljković D., Pavlović D. and Arsić I. Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy. *Acta Fac. med. Naiss.* 2014; 31(4): 207–217.

158. Stubenrauch C. Sugar surfactants – aggregation, interfacial and adsorption phenomena. *Cur. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2001; 6: 160-170.
159. Šavikin K., Živković J., Ždunić G., Godevac Đorđević B., Dojčinović B. and Djordjević N. Phenolic and mineral profiles of four Balkan indigenous apple cultivars monitored at two different maturity stages. *J. Food Comp. Anal.* 2014; 35: 101–111.
160. Tadros T.F. Applied Surfactants - Principles and Applications. Wiley VHC. Weinheim. 2005.
161. Tatljak-Nikolić S., Savić S. Vuleta G. and Milić J. Effects of dermocosmetic/cosmetic products for skin lightening: What is real to expect? *Arch. pharm.* 2013; 63(1): 20-39.
162. Tasić-Kostov M., Vesić S. and Savić S. Objective skin performance evaluation: How mild are APGs to the skin? In: Pantelić I. Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Woodhead Publishing. Elsevier. UK. 2014; 135-162.
163. Tasić-Kostov M., Pavlović D., Lukić M., Jakšić I., Arsić I. and Savić S. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2012; 34(5): 424-434.
164. Tasić-Kostov M., Savić S., Lukić M., Tamburić S., Pavlović M. and Vuleta G. Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *J. Cosmet. Dermatol.* 2010; 9: 3-10.
165. Тасић-Костов М. Дермокозметичке емулзије са ламеларном течно-кристалном фазом као носач за лактобионску киселину – испитивање колоидне структуре, ефикасности и безбедности. *Докторска дисертација*. Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Србија. 2013.
166. Tsao R., Yang R., Young J.C. and Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 6347–6353.
167. Tubtimdee C. and Shotipruk A. Extraction of phenolics from *Terminalia chebula* Retz with water–ethanol and water–propylene glycol and sugaring-out concentration of extracts. *Sep. Purif. Technol.* 2011; 77: 339–346.
168. Туцаков Ј. Лечење биљем, 7. Издање, Рад, Београд, Србија; 1997.
169. Usuki A., Ohashi A., Sato H., Ochiai Y., Ichihashi M. and Funasaka Y. The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 2003; 12: 43-50.

170. Van Scott E.J., Ditre C.M. and Yu R.J. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. *Clin. Dermatol.* 1996; 14: 217–226.
171. Van Scott E.J. and Yu R.J. Hydroxyacids and their topical use in the elderly. In: Nall L., Cauwenbergh G. and Jacobs P. (Eds.), *Skin Diseases in the Elderly*, New York: Marcel Dekker. 2004; 76-83.
172. Васиљевић Д., Савић С., Ђорђевић Љ., Крајишник Љ. и Крајишник Д. Приручник из козметологије, Друго издање, Наука, Београд, Србија. 2009.
173. Васиљевић Д., Савић С., Ђорђевић Љ., Крајишник Љ. и Крајишник Д. Приручник из козметологије, Наука, Београд, Србија. 2007; 19-62.
174. Vinardell M.P and Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 46-59.
175. Von Rybinski W. Alkyl glycosides and polyglycosides. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 1996; 1: 587-597.
176. Wiechers et al. Global trends in skin toning. *Cosmet. Toil.* 2004; 119: 41-50.
177. Wilhelm K. and Maibach H. The effect of aging on the barrier function of human skin evaluated by in vivo transepidermal water loss measurements, In: Frosch P. and Kligman A. (Eds), *Noninvasive methods for the quantification of skin functions: an update on methodology and clinical applications*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. 1993; 180-187.
178. Wojdylo A., Oszmianski J. and Laskowski P. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 6520–6530.
179. Xiaoqian W., Ciuying L., Dong L., Yangjun Z., Pengmin L. and Fengwang M. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *J. Funct. Foods.* 2014; 1–9.
180. Ye M., Yue T. and Yuan Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94, 2951-2957.
181. Young I.S. and Woodside J.V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54: 176-186.
182. Yu R.J. and Van Scott E.J. α -Hydroxyacids, polyhydroxyacids, aldobionic acids and their topical action. In: Baran R. and Maibach HI. (Eds.), *Textbook of cosmetic dermatology*, Taylor and Francis, UK, 2005. pp. 77-94.
183. Yu R.J. and Van Scott E.J. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J. Cosmet. Dermatol.* 2004; 3: 76-87.

184. Zhang Y., Li P. and Cheng L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chem.* 2010; 123(4): 1013–1018.
185. Zhu W. and Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2008; 13(1): 20-24.
186. Zucoloto M., Ku K.M., Kushad M.M. and Sawwan J. Bioactive compounds and quality characteristics of five apples cultivars. *Ciencia Rural, Santa Maria.* 2015; 45(11), 1972-1979.
187. Živković S. Analiza podataka u SPSS-u. Priručnik iz statistike. De Facto Consultancy. Podgorica. Montenegro. 2015.
188. Žugić A., Lukić M., Tasić-Kostov M., Tadić V., Arsić I., Mišić D., Petrović S. and Savić S. Alkyl polyglucoside-stabilized emulsion as a prospective vehicle for *Usnea barbata* CO₂ supercritical extract: assessing stability, safety and efficiency of a topical formulation. *Hem. Ind.* 2015; 69(6): 703-712.
189. Žugić A., Đorđević S., Arsić I., Marković G., Živković J., Jovanović S. and Tadić V. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Ind. Crops Prod.* 52, 519-527 (2014).

Биографија аутора

Драгана Стојиљковић рођена је 23. 02. 1983. год. у Нишу, од мајке Славице и оца Славише. Мајка је предивног сина Ђорђа и супруга човека великог срца, Игора. Има и предивне братанице Николину и Хелену, брата, снају и баку Јулијану.

Основну школу (као ђак генерације) и средњу медицинску школу у Нишу завршила је са одличним успехом као носилац Вукове дипломе. Интегрисане академске студије Фармације на Медицинском факултету Универзитета у Нишу уписала је школске 2002/03. год. као прво-рангирана на пријемном испиту и као први уписани студент фармације прве генерације фармације у Нишу, са бројем индекса 1Ф. У току студија била је добитница *EFG* школарине за 100 најбољих студента завршних година државних факултета, као и студентских стипендија Министарства просвете и спорта и градских стипендија за талентоване студенте. Добитница је Захвалнице за постигнут изузетан успех на студијама од стране Медицинског факултета у Нишу. Током студија била је ангажована као демонстратор-волонтер на предметима Броматологија и Аналитика лекова. Дипломирала је у року, марта 2008. год. са просечном оценом током студирања 9.55 (девет/педесетпет) и оценом 10 (десет) на дипломском испиту. Академске докторске студије на Медицинском факултету у Нишу уписала је школске 2009/10. год. Током докторских студија била је ангажована као сарадник-волонтер на предметима Фармацеутска технологија и биофармација, Фармацеутска технологија I и II. Учествовала је у интерном научном пројекту на Медицинском факултету у Нишу бр. II 11-14629-4/2. Аутор је више научних радова у домаћим и страним часописима.

По дипломирању, након завршеног приправничког стажа за дипломиране фармацеуте у Здравственој Установи Апотека „Фармакоп“ у Нишу, положила је стручни испит 2009. год. Професионалну каријеру започела је у истој установи, где и сада ради као управник апотеке. Члан је управног одбора и разних комисија у установи, и ментор магистрима фармације током стручног оспособљавања у оквиру обављања приправничког стажа. Члан је Фармацеутске коморе Србије. Током професионалног рада стручно се усавршава и похађа едукације из области фармације и медицине. Аутор је више стручних радова у часописима посвећеним фармацији.

Говори српски (матерњи) и енглески језик и поседује основно разумевање шпанског језика, активно користи рачунар и интернет и активно се бавила рукометом. Драгана је радна, одговорна, друштвена, енергична, оптимистична и свестрана особа.

Резултати научно-истраживачког рада

1. **Стојиљковић Д.,** Тадић В., Станковић М., Наумовић С. и Арсић И. Standardized extract of wild apple fruit in alkyl-polyglucoside-based cosmetic cream - estimation of stability, safety, antioxidant activity and efficiency. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2018. DOI 10.1111/ics.12462 (*In Press*). (M23)
2. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тадић В. Extracts of Wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind. Crop Prod.* 2016; 80: 165-176. (M21).
3. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тадић В. Oil extracts of wild apple fruit as active substances in UV protection preparations. *Radiat. Applic. J.* 2016; 1(3): 187-192. (M33).
4. **Стојиљковић Д.,** Арсић И. и Тасић-Костов М. The influence of polar and non-polar emollients on the structure and skin moisturizing potential of the emulsions stabilized by mixed emulsifier. *Acta med. Median.* 2016; 55(2): 25-30. (M51).
5. **Стојиљковић Д.,** Павловић Д. и Арсић И. Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy. *Acta Fac. med. Naiss.* 2014; 31(4): 207–217. (M52).
6. **Стојиљковић Д.,** Арсић И., Тасић Костов М., Јовановић З., Тадић В. и Ђорђевић С. Investigation of effects of different emollients on the structure and skin moisturizing Potential of the cosmetic creams. *Acta Fac. med. Naiss.* 2013; 3(4): 193-200. (M52).
7. Тасић Костов М., **Стојиљковић Д.,** Савић В. и Арсић И. Утицај различитих емолијенаса на структуру и влажећи потенцијал крема стабилизованих GMS_{se} . VIII Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“ Лесковац, Србија. *Зборник радова.* 2009; CD-ROM 59-66. (M33).
8. **Стојиљковић Д.,** Рогановић С., Станковић М., Живковић Ј., Сунарић С., Тадић В. и Арсић И. Stability study of wild apple fruit extract: phenolic and flavonoid content. 51th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book.* 2017; (*In Press*). (M34).
9. Рогановић С., Живковић Ј., Станковић М., **Стојиљковић Д.** и Арсић И. Estimation of antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) supercritical extracts. 51th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book.* 2017; (*In Press*). (M34).
10. Станковић М., Живковић Ј., Рогановић С., **Стојиљковић Д.,** Тадић В. и Арсић И. Wild *Rosa canina* fruit extracts as a rich source of phytochemicals with antioxidant

properties. 51th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book*. 2017; (*In Press*). (M34).

11. **Стојиљковић Д.**, Арсић И., Рогановић С. и Тадић В. Investigation of antioxidant stability of wild apple fruit extracts. The International Bioscience Conference and the 6th international PSU-UNS Bioscience Conference – IBCS, Novi Sad, Serbia. *Book of abstracts*. 2016: 327-328. (M34).
12. Рогановић С., Живковић Ј., Станковић М., **Стојиљковић Д.**, Максимовић С., Тадић В. и Арсић И. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) supercritical extract, The International Bioscience Conference and the 6th international PSU-UNS Bioscience Conference – IBCS, Novi Sad, Serbia. *Book of abstracts*. 2016: 237-238. (M34).
13. **Стојиљковић Д.**, Рогановић С., Станковић М., Тадић В. и Арсић И. Antioxidant activity and polyphenolic content of water extracts of wild apple fruit. 50th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book*. 2016; 77. (M34).
14. Рогановић С., Живковић Ј., Станковић М., **Стојиљковић Д.**, Миловановић С., Тадић В. и Арсић И. Antioxidant capacity of hops (*Humulus lupulus* L.) supercritical extracts. 50th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book*. 2016; 94. (M34).
15. Станковић М., Живковић Ј., Рогановић С., **Стојиљковић Д.**, Арсић И. и Тадић В. Bioactive constituents of wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extracts and fresh berries. 50th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book*. 2016; 76. (M34).
16. **Стојиљковић Д.**, Тасић Костов М., Станковић М., Арсић И. и Тадић В. Water extracts of wild apple fruit as a source of antioxidant substances for use in food industry. 49th Days of Preventive Medicine, International Congress, Public Health Institute Niš, Niš, Serbia. *Abstract Book*. 2015; 53 (M34).
17. **Стојиљковић Д.**, Арсић И. и Тадић В. The antioxidant potential of propylene-glycol extracts of wild apple fruit. Book of abstracts 11th Symposium „Novel technologies and economic development with international participations“, Лесковац, Србија, *Зборник извода радова*. 2015; БФТ-2: 40. (M34).
18. **Стојиљковић Д.**, Наумовић С., Живковић Ј., Станковић М., Тадић В. и Арсић И. Wild apple fruit: Characterization of extracts for use in cosmetic products. VI Serbian

Congress of pharmacy with international participations, Belgrade, Serbia. *Abstract Book*. 2014; 373-374. (M34).

19. **Стојиљковић Д.**, Наумовић С., Станковић М., Савић В., Тадић В. и Арсић И. Extracts of wild apple fruit as a source of antioxidant substances. IV Congress of food supplements with international participation, Belgrade, Serbia. *Abstract Book* (додатак без нумерисане стране). 2013. (M34).
20. Тасић Костов М., **Стојиљковић Д.**, Савић В. и Арсић И. Утицај различитих емолијенаса на структуру и влажећи потенцијал кремова стабилованих GMS_{se}. VIII Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“ Лесковац, Србија. *Зборник извода радова*. 2009; ОХТ-12: 102. (M34).
21. **Стојиљковић Д.**, Тасић Костов М., Савић В., Арсић И. и Савић С. Утицај различитих емолијенаса на структуру и влажећи потенцијал кремова стабилованих фазом течних кристала. XVIII Конгрес Асоцијације дерматовенеролога Србије са интернационалним учешћем, Београд, Србија. *Зборник резимеа*. 2009; Р-39. (M34).
22. **Стојиљковић Д.** Испитивање утицаја различитих емолијенаса на влажност коже. 49. Конгрес студената биомедицинских наука Србије са интернационалним учешћем, Лепенски Вир, Србија. *Зборник резимеа*. 2008; CD-ROM, Фармација и Фармакологија 18-9. (M34).
23. **Стојиљковић Д.**, Јовић В. и Стевановић Ј. Дијететско испитивање друштвене исхране предшколске деце. 48. Конгрес студената медицинских наука Србије са интернационалним учешћем, Копаоник, Србија. *Зборник сажетака*. 2007; 275. (M34).
24. Стевановић Ј. и **Стојиљковић Д.** Изоловање и одређивање антимицробне активности абиетинске киселине из колофонијума. 48. Конгрес студената медицинских наука Србије са интернационалним учешћем, Копаоник, Србија. *Зборник сажетака*. 2007; 275. (M34).

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**„*In vitro* и *in vivo* карактеризација емулзија са екстрактима плода дивље јабуке
(*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) стабилованих конвенционалним и
биодиградабилним мешаним емулгаторима“**

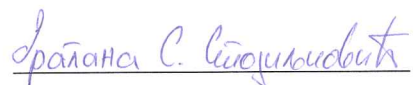
која је одбрањена на Медицинском факултету, Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 2018. год.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Стојиљковић

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

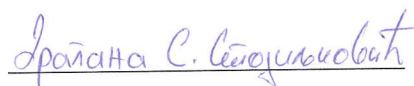
Наслов дисертације:

„*In vitro* и *in vivo* карактеризација емулзија са екстрактима плода дивље јабуке
(*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) стабилованих конвенционалним и
биодеградабилним мешаним емулгаторима“

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 2018. год.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Стојиљковић

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

„*In vitro* и *in vivo* карактеризација емулзија са екстрактима плода дивље јабуке (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) стабилованих конвенционалним и биодеградабилним мешаним емулгаторима“

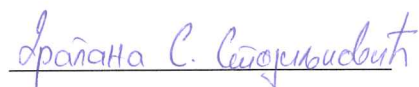
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 2018. год.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Стојиљковић

(Име, средње слово и презиме)