



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Vesna Lj. Savić

**HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKE
AKTIVNOSTI VODENOG EKSTRAKTA KORENA
GAVEZA (*SYMPHYTUM OFFICINALE* L.)**

doktorska disertacija

Leskovac, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY



Vesna Lj. Savić

**CHEMICAL COMPOSITION AND
PHARMACOLOGICAL
ACTIVITIES OF THE AQUEOUS EXTRACT OF THE
ROOT OF COMFREY
(*SYMPHYTUM OFFICINALE* L.)**

doctoral dissertation

Leskovac, 2015.

Mentor:

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

Članovi komisije:

Dr Valentina Marinković, docent,
Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet , Beograd, predsednik

Prof. dr Stevo Najman,
Univerzitet u Nišu,
Medicinski fakultet, Niš

Dr Ljiljana Stanojević, docent,
Univerzitet u Nišu,
Tehnološki fakultet , Leskovac

Dr Dragan Cvetković, docent,
Univerzitet u Nišu,
Tehnološki fakultet , Leskovac

Datum odbrane.....

Naslov doktorske disertacije	HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI VODENOG EKSTRAKTA KORENA GAVEZA (<i>SYMPHYTUM OFFICINALE</i> L.)
Rezime	Ekstrakt korena gaveza (<i>Symphytum officinale</i> L.) dobijen je metodom po Soxlet-u upotrebom vode kao ekstragensa. Ekstrakcija vodom izvršena je pri prethodno određenim optimalnim uslovima ekstrakcije (vreme ekstrakcije 240 min i hidromodul 1:10 m/v). Za modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija iz korena gaveza primenjen je kinetički model Ponomarjeva, pri čemu su određeni stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijenata b i k u jednačinama kinetike ekstrakcije. Ispitan je hemijski sastav vodenog ekstrakta korena gaveza dobijenog pod optimalnim uslovima. Određen je sadržaj ukupnih fenola (473,16mg GKE/g s.e.) i flavonoida (18,90 mg RE/g s.e.). Validirane su HPLC, UHPLC–DAD–HESI–MS, ICP-OES metode za identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih sastojaka i mikro i makro elemenata prisutnih u vodenom ekstraktu korena gaveza. Najzastupljenije bioaktivne komponente u ispitivanom vodenom ekstraktu korena gaveza su bile ruzmarinska kiselina, alantoin i elaginska kiselina (7,4g/100 g s.e, 8,91 g/100g s.e i 12,891g/100 g s.e), respektivno. Mineralni sastav vodenog ekstrakta korena gaveza pokazuje da je prisutan relativno visok sadržaj K (560,4mg/dm³) i Ca (129,3mg/dm³). Ostali mikroelementi sadržani u vodenom ekstraktu korena gaveza po opadajućim vrednostima su Na, Pb, Mg, Fe, Al, Zn, B, Ba, Cu. Biološke aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza obuhvatile su ispitivanje antioksidativne aktivnosti praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih DPPH radikala i antimikrobne aktivnosti <i>in vitro</i> uporedo sa standardima bioaktivnih komponenata koje su najzastupljenije u ekstraktu. Dobijene EC₅₀ vrednosti za ispitivane uzorke pokazuju da najveću antioksidativnu aktivnost ispoljava elaginska, zatim ruzmarinska kiselina i na kraju vodeni ekstrakt korena gaveza, dok alantoin ne poseduje antioksidativnu aktivnost. Vodeni ekstrakt korena gaveza pokazuje antimikrobnu aktivnost na gram-negativne bakterije <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella typhimurium</i>, dok na ispitivane gram-pozitivne bakterije i gljivice nije zapažena aktivnost. Ispitan je uticaj vodenog ekstrakta korena gaveza i alantoina na vijabilnost i

proliferaciju ćelija epitelne (MDCK) i fibroblastne (L929) ćelijske linije *in vitro*. Alantoin nije delovao na vijabilnost ćelija kod ispitivanih ćelijskih linija. Ekstrakt gaveza je u svim ispitivanim koncentracijama pokazao blago stimulatorni efekat na vijabilnost L929, ćelija dok nije bilo promena u vijabilnosti MDCK ćelija. Alantoin je pokazao blag inhibitorni efekat na proliferaciju ćelija obe ćelijske linije u koncentracijama 0,04 mg/cm³ i 0,1 mg/cm³ sa izraženijim efektom na MDCK ćelije. Ekstrakt gaveza je u koncentracijama većim od 0,04 mg/cm³ delovao stimulatorno na proliferaciju L929 ćelija i inhibitorno na proliferaciju MDCK ćelija.

U završnoj fazi rada je ispitan *in vivo* antiirritacioni potencijal suvog vodenog ekstrakta korena gaveza i alantoina inkorporiranih u izrađene polučvrste hidrofilne podloge tipa hidrogela i kremova. Najefikasnija hidratacija je postignuta upotrebom kreme i gela koji sadrže vodeni ekstrakt korena gaveza, a nešto manja kada su oni sadržavali alantoin. Takođe je pokazano da je efikasniji uticaj kremova na vlažnost kože u odnosu na gel sisteme. Svi testirani uzorci su uticali na smanjenje eritema indeksa pri čemu su kremovi bili efikasniji od gelova. Krem sa ekstraktom gaveza ostvaruje efikasnije antieritematozno delovanje u odnosu na krem sa alantoinom. Promene barijerne funkcije kože praćene su merenjem transepidermalnog gubitka vlage (TEWL) nakon iritacije. Efikasnije smanjenje TEWL registrovano je nakon primene gela sa ekstraktom korena gaveza u odnosu na gel sa alantoinom i u odnosu na odgovarajuće kremove. Za sve ispitivane kremove koji predstavljaju emulziju tipa U/V, polarizacionom mikrofotografijom, ispitana je stabilnost na osnovu prisustva dispergovanih kapi uljane faze kao i tirkizno i ružičasto obojenih pruga različitog intenziteta, koje se pojavljuju usled formiranja lamelarne tečno-kristalne faze odnosno α -kristalne gel faze koje obrazuju mešani emulgatori i stabilizuju izrađene kremove. Krem sa disperzijom suvog ekstrakta korena gaveza pokazuje najintenzivnije prisustvo struktura koje ukazuju na stabilizaciju sistema formiranjem tečno kristalne i α -kristalne gel faze i predstavlja sistem koji ima dobru stabilnost, a takođe i dobar potencijal za vlaženje kože pa se može koristiti kao farmakološki aktivan dodatak u preparatima za eksternu primenu.

<i>Ključne reči</i>	Gavez, ekstrakcija, optimizacija, alantoin, ruzmarinska kiselina, elaginska kiselina, proliferacija, iritacija, kremovi, gelovi
<i>Naučna oblast</i>	Tehnološko inženjerstvo
<i>Uža naučna oblast</i>	Hemija i hemijske tehnologije
<i>UDK broj i klasifikaciona oznaka za datu naučnu oblast</i>	615.322:582.929.2:543.2

Titl	CHEMICAL COMPOSITION AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF THE AQUEOUS EXTRACT OF THE ROOT OF COMFREY (<i>SYMPHYTUM OFFICINALE L.</i>)
Abstrakt	An aqueous extract of the root of comfrey (<i>Symphytum officinale L.</i>) was obtained by the Soxlet method using water as an extractant. Extraction with water was carried out at predetermined optimal conditions of extraction (extraction time 240min and hydromodule 1:10w/v). For modeling the kinetics of extraction of total extractable compounds from comfrey root with water, Ponomarev's kinetic model was applied wherein extraction degree (SE) in the period of rapid extraction and coefficients <i>b</i> and <i>k</i> in the equations of extraction kinetics were determined. Chemical composition of an aqueous extract of comfrey root obtained under optimal conditions was examined. The content of total phenols (473.16mg GKE/g d.e.) and flavonoids (18.90 mg RE/g d.e.) was determined. HPLC, UHPLC-DAD-HESI-MS and ICP-OES methods for identification and quantification of bioactive compounds and micro and macro elements present in the aqueous extract of comfrey root were validated. The most abundant bioactive compounds in the examined aqueous extract of comfrey root were rosmarinic acid, allantoin and ellagic acid (7.4g/100g d.e, 8.91g/100g d.e and 12.891g/100 g s.e), respectively. The mineral composition of an aqueous extract of comfrey root showed that there was a relatively high content of K (560,4mg/dm³) and Ca (129,3mg/dm³). Other trace elements contained in an aqueous extract of comfrey root in descending values were Na, Pb, Mg, Fe, Al, Zn, B, Ba, Cu. Examination of the effects of aqueous comfrey root extract included the examination of antioxidant activity by monitoring the ability of neutralization of free radicals and antimicrobial activity <i>in vitro</i> in parallel with the standards of bioactive compounds that are the most present in the extract. Obtained EC₅₀ values for tested samples showed that the highest antioxidant activity have ellagic, then rosmarinic acid, and finally aqueous extract of comfrey root, while allantoin did not show antioxidant activity. The aqueous extract of comfrey root showed antimicrobial activity against gram-negative bacteria <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>, while its activity was

not observed on the examined gram-positive bacteria and fungi. The effect of an aqueous extract of the comfrey root and allantoin on viability and proliferation of epithelial (MDCK) and fibroblastic (L929) cell line was examined *in vitro*. Allantoin did not act on the viability of examined cell lines. The comfrey root extract, in all tested concentrations, showed a mild stimulatory effect on the viability of L929 cells, while there was no change in the viability of MDCK cells. Allantoin showed mild inhibitory effect on proliferation of both cell lines at concentrations $0.04\text{mg}/\text{cm}^3$ and $0.1\text{mg}/\text{cm}^3$, but more pronounced on MDCK cells. Effect of comfrey root extract on cell proliferation in concentrations higher than $0.04\text{mg}/\text{cm}^3$ was significant stimulatory for L929, but inhibitory for MDCK cells.

In the final phase of the study it was examined *in vivo* anti-irritant potential of dry aqueous extract of comfrey root and allantoin incorporated into prepared semisolid hydrophilic carriers of hydrogel-type and cream-type. The most effective hydration was achieved when creams and gels containing aqueous extract of comfrey root was used and a slightly less when they contained allantoin. More effective influence of creams compared to the gels on skin hydration was also maintained. All tested samples had an impact on the reduction of the erythema index wherein the creams were more effective than the gels. Cream with the comfrey root extract achieved more efficient antieritematous effect in relation to the cream with allantoin. Changes in skin barrier function were monitored by measuring transepidermal water loss (TEWL) after irritation. More efficient reduction of TEWL was recorded after application of the gel with comfrey root extract compared to the gel with allantoin and compared to the appropriate creams. For all tested creams that presented U/V type emulsions, the stability was examined by polarization microscopy, based on the presence of dispersed droplets of oil phase as well as turquoise and pink stripes of colored varying intensity, which occur due to the formation of lamellar liquid-crystalline phase or α -crystalline gel phases which form a mixed emulsifiers and stabilized prepared creams. Cream containing a dispersion of dry extract of comfrey root showed the most intense presence of structures that point to a stabilization of the system by forming a liquid crystal and α -crystalline gel phase and presented a system

	that has good stability and also good hydration potential. On the basis of conducted study it can be concluded that an aqueous extract of the comfrey root can be used as a pharmaco-logically active supplement in pharmaceutical preparations for external application.
<i>Keywords</i>	Comfrey, extraction, allantoin, rosmarinic acid, ellagic acid, cell proliferation and viability, irritation, creams, gels
<i>Scientific field</i>	Technological Engineering
<i>Specific scientific field</i>	Chemistry and Chemical Technology
<i>UDC number</i>	615.322:582.929.2:543.2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2. 1. Gavez (<i>Symphytum officinale</i> L.)	4
2.1.1. Botaničke karakteristike	4
2.1.2. Hemijski sastav.	5
2.1.3. Farmakološka aktivnost	7
2.2. Alantoin	8
2.3. Ruzmarinska kiselina	10
2.4. Elaginska kiselina	13
2.5. Flavonoidi	15
2.6. Makro- i mikroelementi	18
2.7. Iritacija kože	19
2.7.1. Antiiritantne supstance.	22
2.7.2. Uticaj nosača na aktivnost bioaktivnih supstanci	24
2.7.2.1. Emulzije	26
2.7.2.2. Geli	27
2.8. Antioksidativna aktivnost	31
2.9. Antimikrobna aktivnost	37
2.10. Određivanje vijabilnosti i proliferacije ćelija	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1. Materijal	43
3.1.1. Biljni material	43
3.1.1.1. Osnovna hemijska ispitivanja biljnog materijala	43
3.1.2. Hemikalije	44

3.1.3. Kulture mikroorganizama.	44
3.1.4. Čelijske linije	45
3.2. Metode	45
3.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u	45
3.2.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija u polaznom biljnom materijalu	46
3.2.1.2. Uticaj operativnih uslova na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina	47
3.2.1.2.1. Uticaj vremena ekstrakcije na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina	47
3.2.1.2.2. Uticaj hidromodula na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina	47
3.2.1.3. Kinetika ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija	47
3. 2. 2. Ispitivanje hemijskog sastava vodenog ekstrakta korena gaveza	48
3.2.2.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)	48
3.2.2.2. UHPLC–DAD–HESI–MS analiza vodenog ekstrakta korena gaveza	49
3.2.2.3. Sadržaj ukupnih fenola u vodenom ekstraktu korena gaveza (Folin Ciocalteu metoda)	50
3.2.2.4. Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza	51
3.2.2.5. Određivanje sadržaja mikro- i makroelemenata ICP-OES metodom	52
3.2.3. Izrada gelova i kremova	56
3.2.4. Karakterizacija polučvrstih podloga tipa kremova polarizacionom mikroskopijom	58
3.2.5. Ispitivanja farmakoloških aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza	58
3.2.5.1. Antioksidativna aktivnost.	58
3.2.5.2. Antimikrobna aktivnost	60
3.2.5.3. Vijabilnost i proliferacija čelijskih linija MDCK i L929	61
3.2.5.4. Antiiritantna aktivnost	62

4. REZULTATI I DISKUSIJA	64
4.1. Ispitivanje kvaliteta polaznog biljnog materijala	64
4.2. Optimizacija procesa ekstrakcije	64
4.2.1. Uticaj vremena ekstrakcije i hidromodula na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina u ekstraktima	65
4.2.2. Kinetika ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija	67
4.3. Karakterizacija vodenog ekstrakta korena gaveza	70
4.3.1. Hemijski sastav vodenog ekstrakta korena gaveza	70
4.3.1.1. Određivanje sadržaja alantoina u vodenom ekstraktu korena gaveza HPLC metodom	70
4.3.1.2. UHPLC–DAD–HESI–MS analiza vodenog ekstrakta korena gaveza	74
4.3.1.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza ...	84
4.3.1.4. Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodenom ekstraktu korena gaveza	84
4.4. Karakterizacija polučvrstih formulacija- kremova	88
4.5. Farmakološke aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza i formulacija za topikalnu primenu	92
4.5.1. Antioksidativna aktivnost.....	92
4.5.2. Antimikrobna aktivnost.....	96
4.5.3. Vijabilnost i proliferacija ćelijskih linija MDCK i L929 u <i>in vitro</i> uslovima	99
4.5.4. <i>In vivo</i> ispitivanja antiirritacionog potencijala	103
ZAKLJUČAK	112
LITERATURA	115
PRILOG	132
Biografija	137

Skraćenice

BHT	butil hidroksi toluol
DAD	diode array detector
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EC	električna kapacitivnost
EI	eritema indeks
GKE	ekvivalent galne kiseline
HLPC	High Pressure Liquid Chromatography – tečna hromatografija pod visokim pritiskom
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry - Optička emisijska spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom
LC/MS	tečna hromatografija-masena spektrometrija
LP	lipidne peroksidacije
LTK	lamelarna tečno-kristalna faza
MBC/MFC	minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
NaLS	natrijum lauril sulfat
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PA	pirolizidinski alkaloidi
PAA	poliakrilna kiselina
PABA	<i>p</i> -aminobenzojeva kiselina
PAM	površinski aktivna materija
PGE2	prostaglandin
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid (polinezasićena masna kiselina)
R	slobodni radikal
RE	ekvivalent rutina
RKV	reaktivne kiseonične vrste
SOD	superoksid dismutaza
TK	tečno-kristalna faza
TEWL	transepidermalni gubitak vlage
UHPLC	tečna hromatografija ultravisokog pritiska
UV	ultravioletno zračenje

1. UVOD

Upotreba bilja u obliku parafarmaceutskih i dijetetskih proizvoda povećala se poslednjih godina u mnogim zemljama širom sveta. Danas je na tržištu prisutan veliki broj fitofarmaceutskih proizvoda koji ostvaruju oko 50% od ukupnog prometa na tržištu farmaceutskih proizvoda [Raskin i sar., 2002]. Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization) procenjuje da se skoro 80% svetske populacije oslanja na tradicionalnu medicinu u kojoj dominantnu ulogu ima lekovito bilje. Različiti biljni ekstrakti su veoma cenjeni u lečenju rana, tretmanu oštećene, iritirane i ostarele kože i u topikalnom tretmanu različitih kožnih oboljenja. Pošto je inflamacija zajednički činilac većine dermatosa, posebna pažnja se obraća na ekstrakte sa antiinflamatornom aktivnošću pa se oni i najčešće inkorporiraju u topikalne preparate [Draeos, 2001].

Gavez (*Symphytum officinale* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice oštrolista (*Boraginaceae*) [Wilkinson i sar., 2003]. Zbog dobrog analgetskog, antiinflamatornog i epitelizantnog delovanja od davnina se u narodnoj medicini upotrebljava za lečenje preloma kostiju, povreda i regeneraciju tkiva [Andres i sar., 1989, Thornfeldt, 2005]. Glavni i najvažniji sastojak korena gaveza je purinski derivat molekulske formule $C_4H_6N_4O_3$, alantoin [Fonsêca Castro i sar., 2001]. Osim alantoina koga ima 0,6-4,7%, gavez sadrži obilje sluznih polisaharida (oko 29%) sastavljenih od fruktoznih i glukoznih jedinica, fenolne kiseline kao što su ruzmarinska, (do 0,2%), hlorogenska kiselina (0,012%), kafeinska kiselina (0,004%) i α -hidroksi kafeinske kiseline, triterpenske saponine, glikopeptide i aminokiseline [Staiger, 2012]. Prirodni antioksidansi iz klasa polifenola, triterpena i tanina su takođe prisutni u gavezu [Puertas-Mejía i sar., 2008]. Ključni konstituenti ekstrakta gaveza odgovorni za njegovu aktivnost, kao i molekularni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Iritacija kože je kompleksni biološki proces kao reakcija na dejstvo hemijskih i fizičkih izazivača. Antiiritantno delovanje imaju oni agensi koji mogu da smanje iritaciju kože. Inkorporirani u topikalni preparat mogu da budu glavnodelujući da smire i leče kožu, a mogu i da smanje iritacioni potencijal drugih komponenti [Andersen Flemming i sar., 2006].

Nosač može da utiče na oslobađanje lekovite supstance, propustljivost kože, povećanje ili smanjenje perkutane penetracije. Izbor nosača je jedan od najvažnijih koraka za povećanje efikasnosti ciljano primenjenih bioaktivnih supstanci. Nosači mogu da budu emulzije U/V, V/U i hidrogelovi. Terapijska aktivnost ekstrakta gaveza može da zavisi od fizičko hemijskog sastava nosača [Araujo i sar., 2012]. Biljni ekstrakti i supstance biljnog porekla na različit način mogu da ostvare antiiritantno delovanje. Antioksidansi iz biljnog materijala inhibiraju enzime koji učestvuju u procesima oksidacije, antinflatorno povećavaju energetske nivo u ćelijama epiderma i na taj način ispoljavaju antiirritacioni potencijal [Almeida i sar., 2008, Puertas-Mejía i sar., 2008].

U proceni antiirritacionog potencijala dermatoloških lekova i dermatokozmetičkih proizvoda koriste se alternativne *in vitro* metode, kao što su testovi citotoksičnosti i vijabilnosti na kulturama epitelnih ćelija i fibroblasta. Izvođenje testova citotoksičnosti na određenim ćelijskim linijama dobra je alternativa skupim i etički neopravdanim testovima na životinjama [Savić, 2010]. *In vivo* antiirritacioni potencijal topikalnih proizvoda prati se primenom neinvazivnih biofizičkih merenja nakon sprovođenja „*patch*” testa [Savić, 2010]. Efekat tretmana antiiritantnim agensima se procenjuje merenjem biofizičkih parametara kože pre i posle aplikacije u određenim vremenskim intervalima na zdravim dobrovoljcima na eksperimentalno izazvanoj akutnoj iritaciji najčešće rastvorom natrijum lauril sulfata (NaLS). Za ovu vrstu istraživanja, potrebno je dobijanje saglasnosti Etičkog komiteta ustanove u kojoj se istraživanje sprovodi.

Iritantni kontaktni dermatitis nakon primene NaLS karakteriše eritem, povećanje transepidermalnog gubitka vode, suvoća kože i perutanje.

Pokazatelji antiiritantne aktivnosti su promene parametara kože: transepidermalnog gubitka vlage (TEWL), električne kapacitivnosti (EC) i eritema indeksa (EI) [Andersen Flemming i sar., 2006].

Osnovni ciljevi u ovom radu su:

- definisanje optimalnih uslova ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina iz korena gaveza metodom ekstrakcije po Soxlet-u;
- ispitivanje kinetike izolacije ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina i određivanje optimalnih kinetičkih parametara;
- određivanje hemijskog sastava vodenog ekstrakta korena gaveza dobijenog pod optimalnim uslovima ekstrakcije;

- optimizacija i validacija analitičkih metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu bioaktivnih komponenata i mineralnih materija u vodenom ekstraktu korena gaveza dobijenom pri optimalnim uslovima ekstrakcije;
- ispitivanje antioksidativne aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza i standardnih komponenti: alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline;
- ispitivanje antimikrobne aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza i standardnih komponenti: alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline;
- ispitivanje delovanja vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda alantoina na vijabilnost i proliferaciju odabranih ćelijskih linija;
- izrada polučvrstih hidrofilnih preparata za topikalnu primenu sa inkorporiranim vodenim ekstraktom korena gaveza i alantoinom;
- ispitivanje stabilnosti i kompatibilnosti hidrofilnih nosača hidrogela i emulzija tipa U/V sa emulgatorima novije generacije za izradu topikalnih preparata sa vodenim ekstraktom korena gaveza i standardom alantoinom i
- uporedno ispitivanje antiiritantnog delovanja preparata sa vodenim ekstraktom korena gaveza i standardom alantoinom u *in vivo* uslovima merenjem biofizičkih parametara kože ispitanika.

Za ispitivanja su primenjene različite metode i to: izolacije, razdvajanja i identifikacije bioaktivnih jedinjenja. Farmakološke aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza i odgovarajućih standarada ispitane su primenom mikrobiološke mikrodilucione metode, DPPH i MTT testa u *in vitro* uslovima, dok je u *in vivo* uslovima ispitana antiritantna aktivnost merenjem promena biofizičkih parametara kože.

2. OPŠTI DEO

2.1. Gavez (*Symphytum officinale* L.)

2.1.1. Botaničke karakteristike

Gavez (*Symphytum officinale* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice gaveza oštrolista (*Boraginaceae*) [Wilkinson, 2003]. To je korovska biljka koja raste širom Evrope i u Severnoj Americi [Gruenwald i sar., 2004]. U Srbiji je široko rasprostranjen. Nalazi se u nizijama, po obodu šuma, pored puteva i na obalama potoka. Gavez je zeljasta biljka, višegodišnji polužbun, visok do 60cm. Koren je razvijen, vretenast i razgranat, spolja crn, iznutra beličast. Iz korena izbija uspravna, sočna, šuplja, dlakava, razgranata stabljika. Listovi su pod prstima grubi od mnoštva krupnih dlaka, donji su eliptični i na kratkoj dršci, srednji i gornji su sedeći i duguljasti, lancetasti i naborani. Cveti u proleće. Cvetovi su ljubičasti ili ružičasti, zvonasti, skupljeni u povijenim cvastima u pazuhu gornjih listova. Plodovi su orašice. Rizom je kratak, krtolasto zadebljao. U tradicionalnoj medicini koristi se i nadzemni i podzemni deo biljke. Drogu najčešće predstavlja sirovi ili osušeni koren (*Symphyti radix*). Rizom sa korenom se vadi u jesen ili proleće čim biljka počne da lista. Spolja je tamnocrvene boje, bele unutrašnjosti, mesnat, neprijatnog ukusa, blagog mirisa, krtolasto zadebljao. Sirov koren je sočan, a osušen rožnat. Narodna imena pod kojima se sreće su crni gavez, veliki gavez, konjski rep, kilnjak, opašica [Tucakov, 1984; Kovačević, 2004].

Klasifikacija gaveza:

Carstvo: ***Plantae***- Biljke

Razdeo: ***Magnoliophyta***- Skrivenosemenice

Klasa: ***Magnoliopsida***- Dikotiledone

Red: ***Lamiales***

Rod: ***Boraginaceae***

Familija: ***Symphytum***

Na slikama 1-3 prikazani su izgled cele biljke, cveta, svežeg i osušenog korena.



Slika 1. Nadzemni deo gaveza



Slika 2. Cvet gaveza



a)

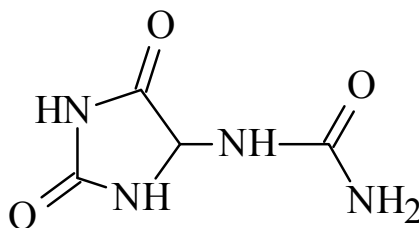


b)

Slika 3. Koren gaveza a) svež i b) osušen

2.1.2. Hemijski sastav

Ispitivanja su pokazala da gavez (*Symphytum officinale* L.) poseduje brojne korisne osobine zbog prisustva različitih bioaktivnih jedinjenja [Hiermann i sar., 1998, Grabias i sar., 1998]. Glavni i najvažniji sastojak korena gaveza je alantoin (0,6-4,7%) [Staiger, 2012]. Alantoin je purinski derivat molekulske formule $C_4H_6N_4O_3$, poznat pod nazivima 5-ureidohidantoin ili glioksildiureid, koji stimulise stvaranje novih ćelija. Strukturna formula alantoina data je na Slici 4.



Slika 4. Strukturna formula alantoina, najvažnijeg sastojka korena gaveza

Pored alantoina, gavez sadrži 18 aminokiselina, vitamine A, C, kompleks vitamina B, auksin, triterpenoide, tanine, ružmarinsku kiselinu, steroidne saponine, inuline i pirolizidinske alkaloidne. Takođe, sadrži mikro- i makroelemente: kalijum, kalcijum, natrijum, fosfor, magnezijum, gvožđe, aluminijum, selen, mangan i cink. Hidrokoloidni polisaharidi za koje se smatra da su imunostimulativne supstance, takođe su prisutni u gavezu [Hiermann i sar., 1998; Aftab i sar., 1996; Wagner, 1970; Axterer i sar., 2006].

Brojna jedinjenja izolovana iz gaveza sa dokazanim biološkim svojstvima su alantoin, sluzi, tanini, alkaloidi, šećeri [Araujo i sar., 2012]. U sastav korena gaveza pored alantoina prisutni su sluzni polisaharidi (29%) sastavljeni od fruktoznih i glukoznih jedinica; fenolne kiseline kao što je ružmarinska kiselina (do 0,2%), hlorogenska kiselina (0,012%), kafeinska kiselina (0,004%) i α -hidroksi kafeinske kiseline, glikopeptidi i aminokiseline [Staiger, 2012].

Tabela 1. Hemijski sastav gaveza [Stickell i Seitz, 2000]

Aktivne komponente	Sadržaj u procentima m/m (%)
Alantoin	0,6 - 0,8
Pirolizidinski alkaloidi	0,04- 0,6
Tanini	4,00- 6,00
Mukopolisaharidi	15,0-30,0
Skrob	25
Asparagin	1,0-3,0

Tabela 2. Analiza fitohemikalija prisutnih u izolatima *Symphytum officinale* [Puertas-Mejía i sar, 2012]

Detektovana jedinjenja	Lišće	Heksanski ekstrakt	Etanolni ekstrakt	Etarsko ulje
Flavonoidi	-	-	-	-
Taninini	+	-	+	-
Saponini	+	-	D	-
Alkaloidi	-	-	-	-
Kvinonani	-	-	-	-
Triterpenoidi	+	+	+	+

prisutni (+), nisu detektovani (-), minimalni nivo detekcije (D)

Najčešće metode izolacije aktivnih jedinjenja iz gaveza su maceracija i perkolacija hidrosolubilnim rastvaračima. Pre ekstrakcije neophodno je drogu usitniti. Droga (*Symphyti radix*) se usitnjava uz pomoć mlina čekićara po sistemu udara i sečenja [Choi i sar., 2002]. Procentualni sastav komponenti prisutnih u gavezu dat je u Tabeli 1 [Stickell i Seitz, 2000], dok je u Tabeli 2 prikazano prisustvo jedinjenja u izolatima dobijenim iz različitih delova gaveza.

Glavna jedinjenja prisutna u vodenom ekstraktu korena gaveza odgovorna za biološku aktivnost i molekularni mehanizmi kojima deluju još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da allantoin, elaginska i ruzmarinska kiselina imaju centralnu važnost za njegove farmakodinamske efekte pri farmakološkoj aktivnosti [Staiger, 2012., Andres i sar., 1989].

2.1.3. Farmakološka aktivnost

Glavna farmakološka aktivnost ekstrakta korena gaveza je da stimuliše regeneraciju tkiva pri čemu ispoljava antiupalno, analgetsko, antiedematozno i adstringentno dejstvo. Koristi se za lečenje oštećenih ligamenata, zapaljenja zglobova, reumatskih bolova i rana koje teško zarastaju [Staiger, 2012]. Gavez je poznati antiinflamator, adstringens, emolijens, ekspektorans, hemostatik, antimikotik i dekongestiv [Hiermann i sar., 1998]. Zbog dobrog analgetskog, antiinflamatornog i epitelizacionog dejstva [Hiermann i sar., 1998; Koehler i sar., 1987; Savić i sar., 2012] od davnina se upotrebljava u narodnoj medicini za lečenje preloma kostiju, povreda i regeneracije tkiva [Andres i sar., 1989; Koehler i sar., 1987].

U narodnoj medicini koren gaveza se koristi spolja u obliku masti kod preloma, tromboflebitisa, hematoma i interno u obliku čaja, tinkture u lečenju gastro-intestinalnih i respiratornih poremećaja [Mroczek, 2006]. Lišće i stabljike se koriste za iste poremećaje ali i za lečenje reumatizma i gihta [Staiger, 2012]. Ima dugu tradiciju za topikalnu primenu u lečenju bolesti zglobova, gihta, distorzije, preloma kostiju i tromboflebitisa [Stickell i sar., 2000].

Gavez se primenjuje samo lokalno zbog prisustva toksičnih alkaloida. Poznato je da pirolizidinski alkaloidi (PA) sa 1,2-*nezasićenom* necinskom strukturom i njihovi N-oksidi imaju hepatotoksični i hepatokancerogeni potencijal. Komitet za biljne lekovite proizvode Evropske agencije za lekove (EMA/HMPC) odobrio je upotrebu lista, herbe i korena gaveza, *Symphytum officinale*, isključivo za eksternu (spoljnu) primenu (ne duže od 6 nedelja/godina; 100 µg PA/dan) [EMA/HMPC/246736/2005].

Iako gavez sadrži različita jedinjenja, istraživanja ukazuju da su allantoin, elaginska i ruzmarinska kiselina verovatno najvažniji za njegovu farmakološku aktivnost [Andres i sar., 1989]. Gavez je izvor jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću što delimično objašnjava njegovo delovanje u regeneraciji tkiva [Puertas-Mejía i sar., 2012].

Navedene bioaktivne supstance imaju različite dokazane farmakološke efekte. Alantoin je odgovoran za proliferaciju tkiva, ruzmarinska kiselina za adstringentno i analgetsko delovanje, a saponini za antibakterijsko dejstvo [Stickell i sar., 2000]. Sluzni polisaharidi takođe ispoljavaju antiiritantno, hidrirajuće i antiinflamatorno delovanje [Araujo i sar., 2012].

Alantoin stimuliše metaboličke procese u potkožnom tkivu i stimuliše rast ćelija (proliferaciju) što rezultira epitelizaciju i protektivni efekat na koži. On takođe snažno podstiče rast koštanih ćelija i vezivnog tkiva. Alantoin ima hidratišući i keratolitički efekat, povećava sadržaj vode u ekstracelularnom matriksu i poboljšava deskvamaciju gornjih mrtvih slojeva kože, povećava glatkoću kože, podstiče deobu ćelija i zarastanje rana. Zaštitni i antiiritantni efekat na koži alantoin ispoljava formirajući komplekse sa iritantima i senzibilizirajućim agensima [Thornfeldt, 2005].

Ruzmarinska kiselina poseduje antioksidativnu aktivnost [Tepe, 2008; Lamien-Meda i sar., 2010], antivirusno i antiinflamatorno dejstvo, nisku toksičnost [Swarup i sar., 2007] i antitumorski potencijal. Široko se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Etarsko ulje ruzmarina je odavno poznato po svom antimikrobnom i antivirusnom delovanju [Ojeda-Sana i sar., 2007].

Elaginska kiselina takođe poseduje veći broj bioloških dejstava. Ima je u voću i povrću i istražuju se njena farmakološka dejstva kao što su antivirusna, antioksidativna, antimutagena i antitumorna aktivnost [Amakura i sar., 2007; Bala i sar., 2006]. Elaginska kiselina utiče blagotvorno na pacijente sa bolestima srca, jetre, neželjenim efektima hemoterapije kod pacijenata sa naprednim kancerom prostate, a pokazala se kao efikasni inhibitor *in vitro* lipidne peroksidacije [Häkkinen i sar., 2000; Nowak, 2006].

2.2. Alantoin

Alantoin je prisutan u vodenim ekstraktima gaveza. Ova supstanca je hemijski diureid glioksilatne kiseline, sinonimi su mu 2,5-diokso-4-imidazolidinil urea i 5-ureidohidantoin. Heterociklično je jedinjenje izvedeno iz purina. Imenovan je po alantoisu, amniotskom embrioniskom ekskretornom organu u kome se javlja u visokim koncentracijama tokom razvoja kod većine sisara izuzev ljudi i viših primata. Alantoin je proizvod oksidacije mokraćne kiseline i glavni je metabolički intermedijer u mnogim drugim organizmima uključujući biljke i bakterije.

Predstavlja beli prašak, tačke topljenja 230°C, bez mirisa, rastvorljiv u vodi u koncentraciji 0,57% na 25°C, vrlo malo rastvorljiv u uljima i nepolarnim rastvaračima. Stabilan je širokom opsegu pH 3-8 na temperaturi od 80°C.

Rastvorljivost alantoina na 25°C u drugim rastvaračima u masenim procentima iznosi:

- etanolu 0,04%,
- smeši etanol/voda (1/1) 0,35%,
- smeši propilenglikol/voda (1/1) 0,4%,
- i smeši glicerol/voda (1/1) 0,6%.

Alantoin se može detektovati u ekstraktima biljaka i gotovim farmaceutskim oblicima spektrofotometrijskim metodama, visokoefikasnom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom i kapilarnom elektroforezom [Fonsêca Castro i sar., 2001; Wang i sar., 2007].

Amfoterne osobine alantoina omogućavaju njegovu kombinaciju sa raznim supstancama sa kojima može da formira soli i kompleksna jedinjenja. Takve kombinacije mogu da međusobno pojačaju terapeutska delovanja (sinergistično delovanje) smanjujući iritabilni ili toksični potencijal istih što sve zajedno omogućava dobra dermofarmaceutska svojstva. Ti derivati su: alantoin acetyl metionin, alantoin askorbat, alantoin biotin, alantoin kalcijum pantotenat, alantoin galakturonska kiselina, alantoin gliceretinska kiselina, alantoin PABA (para amino benzojeva kiselina), alantoin pantenol, alantoin poligalakturonska kiselina [Gottschalk i sar., 2010] .

Pretpostavka je da primena alantoina može da spreči aktivnost slobodnih radikala. Istraživanja su pokazala da vagitorije koje u svom sastavu imaju alantoin i 140 mg sulfonamida povoljnije deluju na simptome *Trichomonas vaginalis* od onih koje su bez alantoina. Potvrđeno je za alantoin takođe da je izraziti keratolitik i hidratišući agens. U koncentraciji od 0,1-2% deluje kao jak čistač nekrotičnog tkiva [Baumann, 2003]. Američka agencija za hranu i lekove ga u svojoj monografiji navodi kao sigurno i efikasno sredstvo za zaštitu kože u pomenutim koncentracijama. Takođe se koristi i u preparatima za lečenje hemoroida i drugih anorektalnih poremećaja. U Americi je izbačen iz preparata za psorijazu jer se pokazao neefikasnim [Sweetman SC (Ed), 2005].

Alantoin i preparati sa ekstraktom gaveza koriste se za lečenje rana, čireva, opekotina, dermatitisa, impetiga i akni. U formulaciji sa benzalkonijumhloridom je efikasan kao antiseptik za ruke i u terapiji gljivičnih oboljenja, gde pokazuje sinergistički efekat [Thornfeldt, 2005]. Proizvođači navode nekoliko blagotvornih efekata alantoina kao aktivnog kozmetičkog sastojka: vlažeći i keratolitički efekat, povišenje vodenog sadržaja ekstracelularnog matriksa i poboljšanje deskvamacije gornjih slojeva mrtvih ćelija kože, povećanje glatkoće kože; promovisanje ćelijske proliferacije i zarastanje rana; ublažujući, antiiritirajući i zaštitni efekti na koži putem formiranja kompleksa sa iritantima i

senzibilizirajućim agensima. Alantoin je često prisutan u pastama za zube, tečnostima za ispiranje usta, i drugim proizvodima za oralnu higijenu, u šamponima, šminkama, anti-akne proizvodima, sredstvima za zaštitu od sunca i drugim kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.

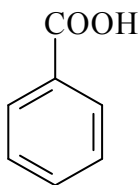
Preparati sa alantoinom su registrovani kao lekovi i kao kozmetička sredstva. Farmaceutsko-tehnološki oblici koji sadrže alantoin su masti, kremovi, geli, losioni, supozitorije, očni preparati, praškovi, preparati za negu kose, za zaštitu od sunca i negu posle sunčanja [Gottschalck i sar., Baumann, 2003].

Zbog širokog spektra farmakološkog dejstava alantoin se više od 70 godina koristi u kozmetičkim i farmaceutskim preparatima u različite terapijske svrhe, a naročito kao promoter u zarastanju rana. Uprkos ovom detaljnom opisu i terapeutskim aplikacijama, iznenađujuće je da nema podataka koji podržavaju farmakodinamska dejstva pa je mehanizam dejstva alantoina i dalje nepoznat [Araujo i sar., 2012] .

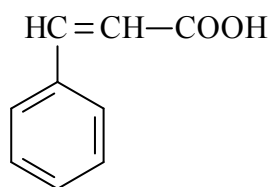
Poznato je da kao dodatak u proizvode za pranje kože koji sadrže surfaktante smanjuje njihov iritacioni potencijal. Pomaže prirodnu regeneraciju kože. Zato što smiruje, omekšava i štiti kožu ima širok spektar primene u proizvodima za negu i čišćenje kože. Najčešće se u preparatima koristi u koncentraciji 0,05-0,3%. Kod formulacija je potrebno imati u vidu da je rastvorljiv u vodi, nerastoran u uljima, a najbolje ga je dodavati na 50°C pri optimalnom pH 4-8 [www.aloesense.com/ Allantoin%20Brochure.pdf]. Upotrebljava se kao aluminijum dihidroksi alantoinat. Često je prisutan u sastavu preparata za tretman suve kože i drugih poremećaja na koži [Loden, 2005].

2.3. Ruzmarinska kiselina

Fenolne kiseline su grupa fenolnih jedinjenja koja se nalaze u biljkama [Mattila i sar., 2006]. Ovi sekundarni metaboliti nastaju iz acetata, biosintetskim putem preko šikiminske kiseline. Fenolne kiseline su hidroksilovani derivati benzojeve i cimetne kiseline čije su strukture date na slikama 5 i 6.



Slika 5. Struktura benzojeve kiseline

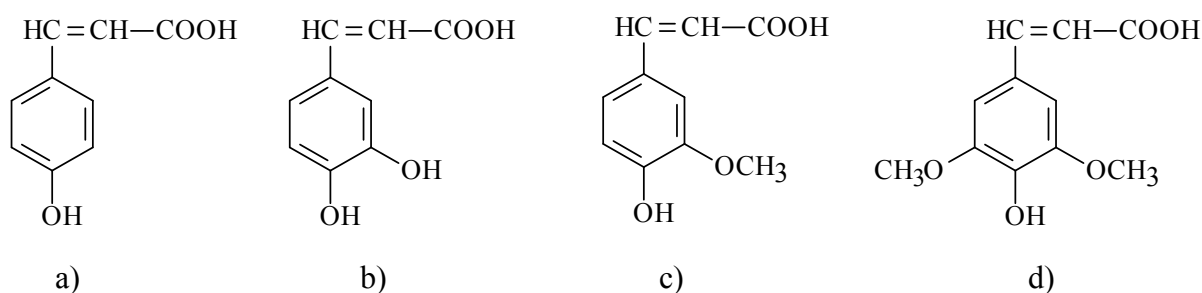


Slika 6. Struktura cimetne kiseline

Najzastupljeniji hidroksi derivati benzojeve kiseline su: *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentizinska i elaginska kiselina, koje su prisutne uglavnom u obliku glukozida u biljkama [Herrmann, 1989].

Najzastupljeniji hidroksi derivati cimetne kiseline su: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulna i sinapinska kiselina (Slika 7) koje su često prisutne u hrani kao estri sa hina (hininskom) kiselinom ili glukozom.

Najpoznatiji estar kafeinske i hina kiseline je hlorogenska kiselina.

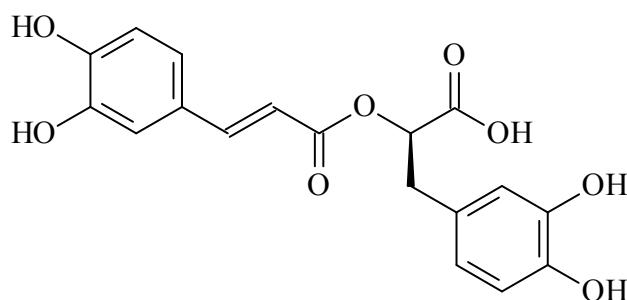


Slika 7. Strukture derivata cimetne kiseline: a) *p*-kumarinska kiselina b) kafeinska kiselina c) ferulna kiselina d) sinapinska kiselina

Fenolne kiseline su poznati antioksidanti ne samo zbog svoje sposobnosti da predaju vodonik ili elektron već i zato što njihovi stabilni interemedijeri radikala sprečavaju oksidaciju različitih komponenti biljaka. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina je povezana sa strukturom tj. supstutientima i njihovim položajem na aromatičnom prstenu i strukturom bočnog niza. Smatra se da je prisustvo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupe kod hidroksi derivata cimetne kiseline razlog za znatno višu antioksidativnu aktivnost nego $-\text{COOH}$ grupe kod hidroksi derivata benzojeve kiseline. Takođe, veći broj hidroksilnih i metoksilnih grupa i naročito prisustvo *o*-dihidroksi grupe na fenolnom prstenu povećava antioksidativnu aktivnost kao na primer kod kafeinske kiseline. Fenolne kiseline imaju različite funkcije u biljkama uključujući asimilaciju hranljivih materija, sintezu proteina, aktivnost enzima i fotosintezu.

Hidroksi derivati benzojeve i cimetine kiseline se nalaze u svim delovima biljaka u semenu, korenu, lišću, stabljici itd. [Robbins, 2003]. Samo manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina povezana estarskom, etarskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom), ili sa polifenolima (flavonoidi), manjim organskim molekulima (glukoza, hina, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni). Fenolne kiseline nisu podjednako rasprostranjene u biljnom tkivu. Pored toga, tokom različitih stadijuma rasta prisutne su različite fenolne kiseline [Robbins, 2003].

Ruzmarinska kiselina je estar kafeinske i 3,4-dihidroksifenil-mlečne kiseline i prisutna je kod biljaka iz porodica *Boraginaceae* i *Lamiaceae*. Pripada grupi fenolnih sekundarnih metabolita. Prirodni je polifenolni antioksidans. Čista supstanca je crveno-narandžasti prah koji se teško rastvara u vodi, a lako u organskim rastvaračima. Na Slici 8 prikazana je struktura ruzmarinske kiseline.



Slika 8. Struktura ruzmarinske kiseline

Sirovi ekstrakt borača *Borago officinalis* (*Boraginaceae*, L.) sadrži ruzmarinsku kiselinu u količini od 2,5% [Wettasinghe i sar., 2002]. Ruzmarinska kiselina je prvi put izolovana iz lista biljke *Rosmarinus officinalis* L., (Fam. *Lamiaceae*) gde se nalazi u količini od 8% [Kovačević, 2004].

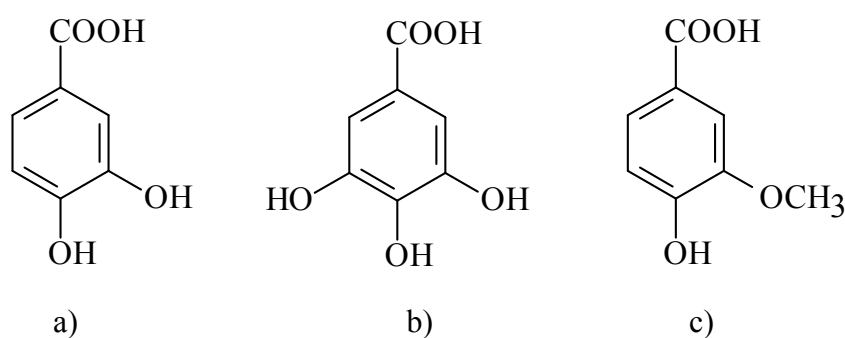
Ruzmarinska kiselina je prisutna u lišću matičnjaka (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*, L.) u koncentraciji od 3,91% [Toth i sar., 2003]. U ruzmarinu ruzmarinska kiselina je otkrivena u listovima, cveću, stabljikama i korenu, a najveći sadržaj od 2,5% je detektovan u prvoj fazi rasta lista [Del Bano i sar., 2003]. Dokazano poseduje antioksidativno, antimikrobno i antiinflamatorno delovanje. Ispituje se kao potencijalni protektiv kod kardiovaskularnih bolesti, Alchajmerove bolesti i kancera [Anusuya C. i sar., 2011].

Kafeinska kiselina igra centralnu ulogu u biohemiji biljaka iz familije *Lamiaceae*, dok je ruzmarinska kiselina glavni fenolni sastojak odgovoran za antioksidativno delovanje [Yinrong i sar., 2002].

Kod topikalnih preparata vršena su istraživanja procene da li se ružmarinska kiselina može koristiti kao adjuvantna terapija ili alternativa steroidnim hormonima gde je pokazano da ružmarinska kiselina može da se uvede kao novi terapijski agens u terapiji atopijskog dermatitisa dokazujući da je bezbedna. Međutim, nisu poznati precizni molekularni mehanizmi kojim ružmarinska kiselina poboljšava stanje kože pacijenata sa atopijskim dermatitisom [Jongsung i sar., 2008].

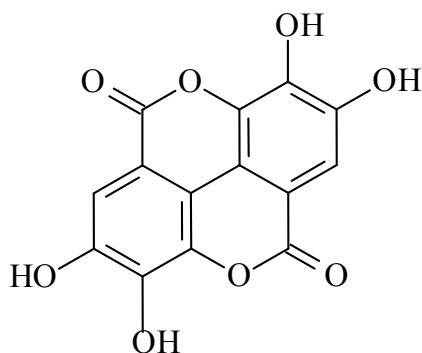
2.4. Elaginska kiselina

Protokatehinska kiselina je prisutna u biljkama različitih familija, a galna kiselina je komponenta mnogih taninskih materija (galotanini). Pored slobodnih hidroksilnih grupa za aromatično jezgro mogu biti vezane i metoksi grupe kao što je to slučaj kod vanilinske kiseline. Strukture ovih kiselina prikazane su na Slici 9a-c.



Slika 9. Strukture a) pirokatehinske b) galne i c) vanilinske kiseline

Galna kiselina je derivat benzojeve kiseline. Galna kiselina, njeni depsidi i heksahidroksidifenska kiselina grade estre sa alkoholnim grupama centralnog molekula šećera (glukozom). Monomerna pentagaloilglukoza ili njeni oligomeri su najrasprostranjeniji hidrolizirajući tanini u biljnom svetu. Moguća su i dodatna povezivanja monomernih molekula tanina u oligomere. U okviru molekula tanina nalazi se i heksahidroksi-difenska kiselina. Tek posle hidrolize i oslobađanja kiseline, dolazi do njene spontane laktonizacije i formiranja elaginske kiseline [Kovačević, 2004]. Molekuli galne kiseline mogu da grade novu C-C vezu, pri čemu nastaje heksahidroksidifenska kiselina, koja spontanom laktonizacijom daje elaginsku kiselinu čija je struktura prikazana na Slici 10.



Slika 10. Hemijska struktura elaginske kiseline

Elaginska kiselina je prisutna u voću, u jagodi (162 mg/100g suve materije) [Buendía i sar., 2010] i malini (415 mg/100g suve materije) [Toth i sar., 2003]. Dokazano je da je elaginska kiselina prirodni antioksidans i da štiti integritet ćelije [Hwang i sar., 2009; Turk i sar., 2010]. Istraživanja uticaja elaginske kiseline na ćelijsku apoptozu su vršena u korelaciji sa antitumornim dejstvom [Bell i Hawthorne 2008] .

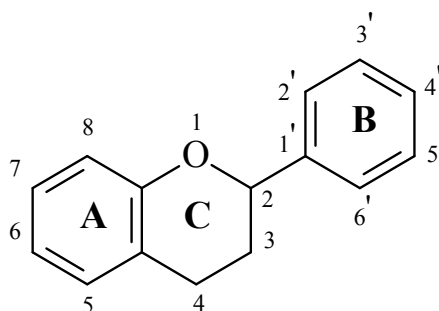
Pored toga što deluje antioksidativno, elaginska kiselina ubrzava zarastanje rana i potencijalno je antikancerogena fitohemikalija. Mehanizam za antikancerogeno delovanje nije u potpunosti poznat. Ona pripada grupi polifenolnih jedinjenja koja imaju dokazana fiziološka delovanja kao što su stimulacija fagocitnih ćelija i širok spektar antiinfektivnih delovanja.

Tanini na molekularnom nivou, daju komplekse sa proteinima gradeći kovalentne veze i nespecifično se povezuju vodoničnim vezama [Stern i sar., 1996]. Tako, antimikrobna aktivnost elaginske kiseline može da se objasni inaktivacijom enzima tako što gradi kompleks sa ćelijskim polisaharidima.

Zubni karijes je jedna od najčešćih oralnih bolesti širom sveta. Jasno je da kariogeni mikroorganizmi, naročito *Staphylococcus mutans* igraju suštinsku ulogu u patogenezi karijesa. Ona je uključena u pokretanje skoro svih karijes lezija u gleđi [Wings i sar., 2010]. Prevencija karijesa je fokusirana na borbu protiv kareogenih bakterija. Mehanizam delovanja je sprečavanje adhezije mikroorganizama na površini zuba uz formiranje glukana nerastvornih u vodi. Hemijski agensi, kao što su fluor i hlorheksidin koji se zadnjih decenija koriste za sprečavanje karijesa pokazuju sporedne efekte kao što su bojenje zuba i fluoroza. Dakle, ne postoji savršeno antimikrobno sredstvo za sprečavanje karijesa do sada. Upotreba prirodnih proizvoda je najuspešnija strategija za otkrivanje novih lekova. Prema Harvey-u, biodiverzitet (raznovrsnost) je osnova za proširivanje prirodnih proizvoda koji se koriste za otkrivanje novih lekova . Elaginska kiselina je obećavajuće jedinjenje protiv oralnih patogena kod ljudi [Wings i sar., 2010].

2.5. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu fenolnih jedinjenja. Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika u osnovnoj C6-C3-C6 strukturi, od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji C-2 (flavoni, flavonoli, flavononi, dihidroflavoni, flavani i antocijanidini), na poziciji C-3 (izoflavoni) i na poziciji C-4 (neoflavoni) (Slika 11).

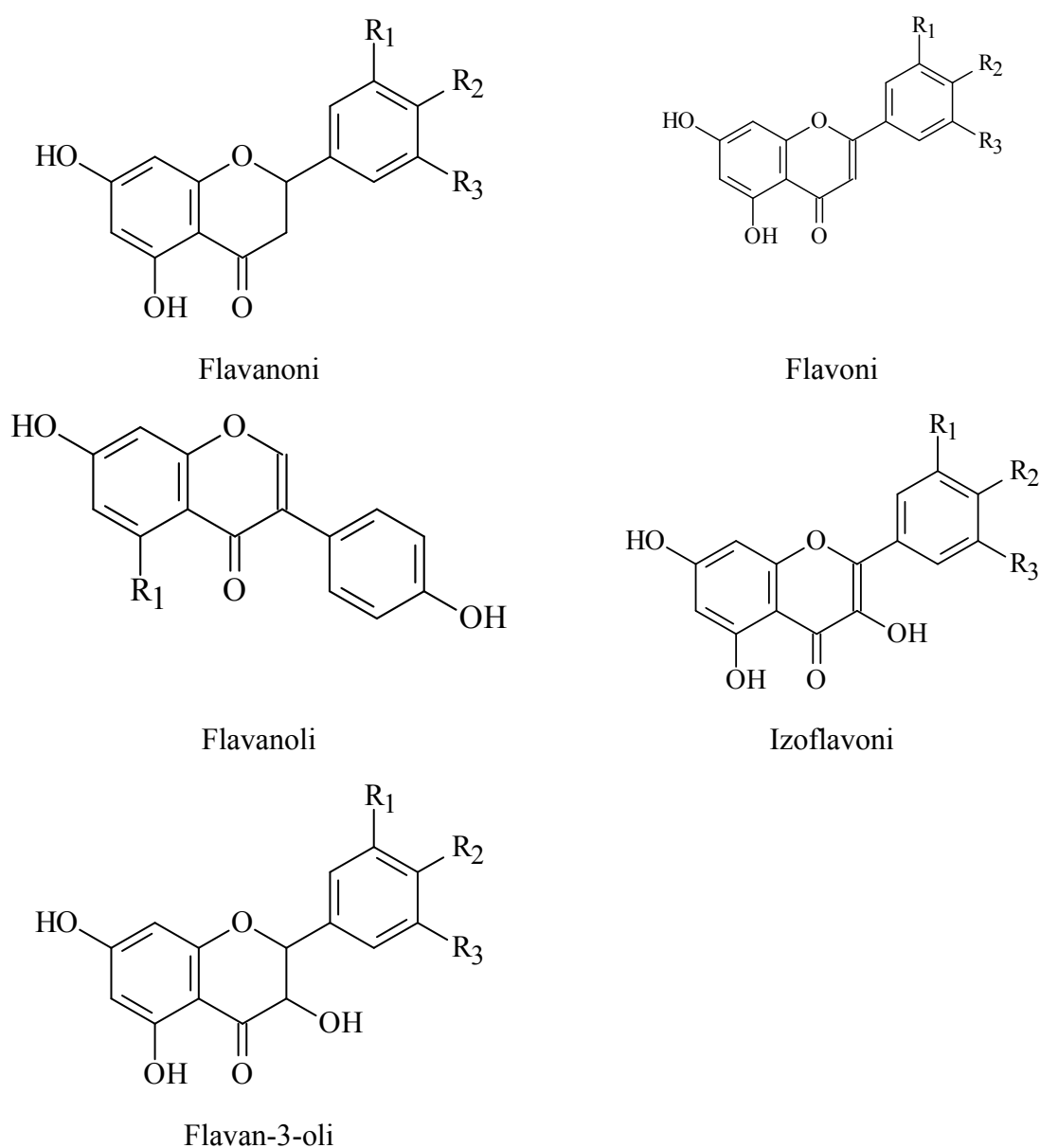


Slika 11. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi su ime dobili prema latinskoj riječi *flavus* (žuta) iako su poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (antocijani) u biljnom tkivu [Winkel-Shirley, 2001]. Predstavljaju najbrojniju grupu fenolnih jedinjenja koju nalazimo u različitim biljnim vrstama i identifikovano ih je više od 6400 [Harborne i Baxter, 1999; Procházková i sar., 2011].

U prirodi se najčešće sreću jedinjenja sa hidroksilnim grupama u C-3' i C-4' položaju i nešto manje sa jednom hidroksilnom grupom u položaju C-4'. Šećerna komponenta flavonoida je najčešće vezana u položaju C-3 i rede u položaju C-7. Kao šećerna komponenta najčešće se javlja glukoza, a rede galaktoza, ramnoza i ksiloza [Hermann, 1989]. Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura, kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida). Flavonoidi su rasprostranjeni u svim zelenim biljkama, a nađeni su i u nižim organizmima. Najzastupljeniji flavonoidi u biljkama prikazani su na Slici 12. Najrasprostranjeniji su flavonoli, koji imaju oko 200-300 poznatih aglikona i flavoni. Kvercetin, kempferol i miricetin su najzastupljeniji flavonoli, a od flavona najpoznatiji su luteolin i apigenin. Halkoni, auron, flavanoni, dihidrohalkoni i izoflavoni se pojavljuju mestimično i u manjem broju biljnih vrsta. Flavanoni i izoflavoni su bezbojni, dok halkoni i auron predstavljaju žute cvetne pigmente [Tumbas, 2010]. Utvrđeno je da su flavonoidna jedinjenja efikasni “skevendžeri“

(hvatači) superoksid anjon i peroksil radikala, da imaju inhibitorni efekat na proces lipidne peroksidacije, kao i sposobnost heliranja metala. Kao i u slučaju fenolnih kiselina, antioksidativno delovanje jedinjenja ove grupe zavisi od strukturnih karakteristika. Dokaz protektivnog delovanja flavonoida *in vivo* su epidemiološka istraživanja holandskih naučnika koja pokazuju da su koronarne bolesti i dnevni unos flavonoida obrnuto proporcionalni [Hertog i sar., 1993]. Zahvaljujući “skevendžer“ aktivnosti hidroksil radikala utvrđeno je da flavonoidi, kao i gotovo sva ostala fenolna jedinjenja, poseduju veliki broj bioloških aktivnosti: vazodilatatorno, imunostimulatorno, antikancerogeno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko i antivirusno [Brown, 1980; Ho i sar., 1992; Middleton i Kandaswami, 1992].



Slika 12. Hemijska struktura nekih biljnih flavonioda

Na Slici 12 su prikazane osnovne strukture za konkretne predstavnike biljnih flavonoida.

Flavonoidi prisutni u biljkama razlikuju se po položaju hidroksilnih i glikozidnih grupa i po konjugaciji između prstena A i B. Najčešće se javljaju flavoni i flavonoli s hidroksilnim grupama u položajima 3 i 4 u prstenu B, a ređe oni s hidroksilnom grupom samo u položaju 4. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3, a manje u položaju 7. Šećer koji se najčešće veže je glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Flavanoni i flavoni često se nalaze zajedno za razliku od flavona i flavonola koji se međusobno isključuju u mnogim biljkama. Antocijani su gotovo odsutni u biljkama bogatim flavanonima [Kazazić, 2004].

Flavoni i flavonoli su slične strukture, imaju nezasićenu vezu između C2 i C3 atoma ugljenikovog prstena, razlikuju se u tome što flavonoli imaju hidroksilnu grupu vezanu na C3 atomu ugljenikovog prstena dok flavoni nemaju.

Flavoni su u značajnim količinama zastupljeni u lekovitom i aromatičnom bilju. Najčešći flavoni su apigenin i luteolin. Većina flavona se pojavljuje u obliku 7-*O*-glikozida.

Flavonoli su najzastupljenija podgrupa flavonoidnih jedinjenja. Najčešći flavonoli su miricetin, izomiricetin, kvercetin i kempferol, uglavnom su prisutni u obliku *O*-glikozida gde se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom [Veberić, 2010].

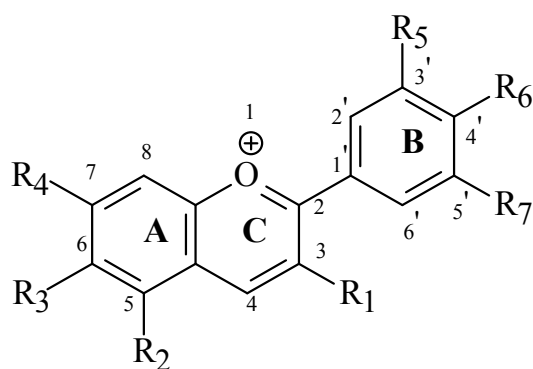
Flavanoli (flavan-3-oli), poznati su kao katehini. Kompleksna su podgrupa flavonoida prisutnih od jednostavnih monomera ((+)-katehin) i njihovih izomera ((-)-epikatehin), do oligomera i polimera kao što su proantocijanidin, poznatiji kao kondenzovani tanini. Flavanoli se u prirodi vrlo retko sreću kao slobodni, najčešće se nalaze u obliku glikozida ili estara [Bravo, 1998; Murković, 2003; Veberić, 2010]. Kada sadrže hidroksilnu grupu vezanu na prsten B mogu se nagraditi estri sa galnom kiselinom pa nastaju galokatehin i epigalokatehin [Veberić, 2010].

Flavanone karakteriše prisustvo C2, C3 dvostruke veze keto grupa na C4 atomu i hiralni centar na C2. Prsten C je povezan sa B prstenom na C2 atomu. Struktura flavanona je visoko reaktivna pa vrlo lako dolazi do hidroksilacije, glikozidacije i metilacije. Glikozidi flavanona su prisutni u visokim koncentracijama u citrusnom voću kao što su neohesperidin i naringin [Veberić, 2010]. Glikozidi flavanona takođe su prisutni i u aromatičnom bilju [Ignat i sar., 2011].

Kod izoflavona, prsten B je povezan s prstenom C na C2 atomu umesto na C3. Izoflavoni se nalaze isključivo u leguminozama. Genistein i daidžein kao važni predstavnici

izoflavona su poznati po estrogenoj aktivnosti pa se koriste kao fitoestrogeni. Poznati su kao prirodni aglikoni ali se mogu naći i kao glikozidi [Veberić, 2010; Ignat i sar., 2011] .

Antocijani i njihovi konjugovani derivati antocijanidini su široko rasprostranjeni u biljnom svetu, u voćnom tkivu i cveću gde su odgovorni za plavu, crvenu i ljubičastu boju. Na Slici 13 prikazana je osnovna struktura antocijana [Dent, 2013].



Slika 13. Osnovna struktura antocijana

Nalaze se u listu, stabljici, semenu i izdanku. Za razliku od ostalih flavonoida, antocijani na svom centralnom prstenu imaju pozitivno naelektrisanje pa imaju svojstvo jona (flavijum jon) što ih razlikuje od ostalih flavonoida. Antocijani takođe grade konjugate s hidroksicimetnim i organskim kiselinama. Najčešće prisutni antocijanidi u biljkama su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin, koji imaju zajednički prsten prikazan na slici 13, a različite R- ostatke [Pereira i sar., 2009; Veberić, 2010; Ignat i sar., 2011].

2.6. Makro- i mikroelementi

Analiza ljudskog tkiva je pokazala da se u njemu kao i kod drugih organizama, nalazi veliki broj različitih metala. Na osnovu sadržaja metala u ljudskom telu, ovi elementi se mogu podeliti u dve grupe. Metali, koji se javljaju u relativno visokim količinama i koje dnevno treba unositi oko 100mg i više, nazivaju se *makroelementi* ili *makrominerali*. U ovu grupu se ubrajaju kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum. Metali koji se javljaju u malim količinama i čija je dnevna doza oko par miligrama ili manje, nazivaju se *mikroelementi* ili *mikrominerali* odnosno *elementi u tragovima*. U ovu grupu metala ubrajaju se gvožđe, cink, bakar, mangan, selen, kobalt, nikl, hrom, bor i dr. Gvožđe se u znatnoj količini može naći u tkivu svih živih organizama, izuzev kod nekih bakterija iz roda *Lactobacillus*. Takođe, u tkivu ali u nižim koncentracijama prisutni su cink, bakar, mangan, nikl, molibden, kobalt i još neki

elementi. Odstupanja u sadržaju metala u tkivima od očekivanih, su najčešće posledica izloženosti organizama kontaminaciji od strane životne sredine ili pak usled sposobnosti da sam organizam u tkivu akumulira neke elemente koji se u njemu obično ne nalaze.

U živim organizmima metalni joni vrše regulaciju širokog spektra fizioloških mehanizama sa značajnom specifičnošću i selektivnošću, i to pre svega kao komponente enzima i drugih molekulskih kompleksa. Reaktivnost kompleksa zavisi kako od specifičnih osobina odgovarajućeg proteina tako i od fleksibilnosti osobina samog metala [Lippard, 1993].

Danas je poznato da mineralne materije, u celini, imaju ulogu u održavanju koncentracije vodonikovih jona na određenom nivou, izgradnji skeleta i koštanog tkiva, učestvuju u izgradnji gotovo svih ostalih ćelija organizma, uključujući tu i izgradnju telesnih tečnosti: krvi, limfe, citoplazme, protoplazme i drugo, zatim u održavanju osmotskog pritiska, od koga zavisi normalan mehanizam ishrane ćelije i ravnoteže tečnosti u organizmu, regulisanju metabolizma vode, održavanja koloidnog stanja, koje je važno pri nekim hemijskim reakcijama u ćelijama i tkivima organizama. Takođe, poznato je da samo pranje lica sa mineralnom vodom pomaže u smanjenju iritacija kože, a sami minerali pomažu da ćelije kože upiju više vode što dovodi do povećanja hidratacije kože.

2.7. Iritacija kože

Koža je najveći organ ljudskog tela koji pokriva celu površinu tela i razdvaja organizam od spoljašnje sredine. Ona ima važnu ulogu u održavanju homeostaze, sprečavanju gubitka telesnih tečnosti i prodiranja stranih materija u organizam. Štiti organizam od spoljašnjih fizičkih i bioloških agenasa, ima termoregulatornu, metaboličku i endokrinu funkciju. Istovremeno predstavlja efikasnu imunološku barijeru i ima estetski značaj. Sastoji se od epidermisa i hipodermisa. Epidermis se sastoji od dva dela, varijabilnog, živog dela (*stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* i *stratum lucidum*) koga čine matične ćelije u diferencijaciji i nevarijabilnog dela (*stratum corneum*), koga u proseku čini 10-30 slojeva kornifikovanih, mrtvih ćelija oko kojih se nalazi lipidni matriks od intercelularnog lipidnog dvosloja lamelara.

Stratum corneum je najotporniji sloj kože. Izgleda kao svetla traka crvene boje. Ćelije ovog sloja nemaju jedro. Pretvorene su u keratinske ljuspe između kojih se nalaze lipidi. Na površini ovog sloja keratinske ljuspe se odvajaju i otpadaju. Ovaj se proces zove deskvamacija. Iako nemaju jedro ove su ćelije metabolički aktivne. Deskvamacija je posledica aktivnosti lipolitičkih enzima koji razlažu lipide između potpuno keratinizovanih ćelija prema modelu cigla-malter koji je predložio Elias 1991. godine [Bouwstra i sar., 2001].

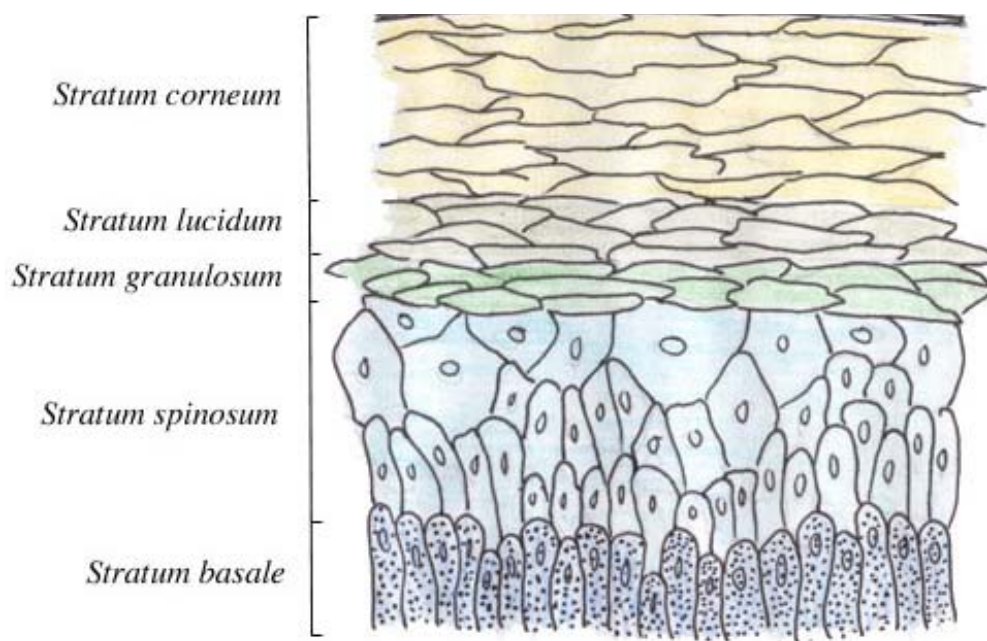
Keratin je glavni sastojak keratinocita rožastog sloja takozvanih korneocita. Uloga mu je da obezbedi rožastom sloju, koji je neposredno izložen delovanju agenasa iz spoljašnje sredine hemijsku i mehaničku stabilnost.

Ovako formirana barijera sprečava gubitak vode iz kože i unutrašnjosti organizma, a sa druge strane sprečava prodor toksičnih, ali i lekovitih materija kroz kožu. Površinski sloj epiderma se smatra glavnom barijerom za perkutanu apsorpciju. Može biti razgrađen delovanjem izvesnih fizičkih i hemijskih agenasa koji dovode do rupture disulfidne veze [Popović i sar., 1991] .

Promena boje kože ukazuje na promene nekih funkcija kože. Na boju kože utiče kombinacija pigmenata i debljina rožastog sloja. Boja kože može imati crveni, žuti, braon ili plavičasti ton. Crveni pigment je oksigenisani hemoglobin, žuti su karotenoidi i najpoznatiji među njima β -karoten, plavu boju daje redukovani hemoglobin, a braon pigment je melanin koji se stvara u melanocitima .

Iritacija je simptom disfunkcije epidermisa koje se najpre dešavaju u *stratum corneum-u*, a prati je i promena boje kože [Isailović, 2006] .

Na Slici 14 data je građa epidermisa.



Slika 14. Građa epidermisa

Sve supstance su potencijalni iritansi. Reaktivnost kože je u vezi sa koncentracijom supstanci i dužinom izlaganja, mada se i to ne može tako jednostavno posmatrati. Iritacija je uglavnom kompleksni biološki proces. Postoje nekoliko kliničkih tipova iritacije: akutni

iritacioni dermatitis, iritaciona reakcija, produženi akutni iritacioni dermatitis, kumulativni iritacioni dermatitis, traumatski iritacioni dermatitis, pustularni i akneformni dermatitis i neuroeritematozna iritacija.

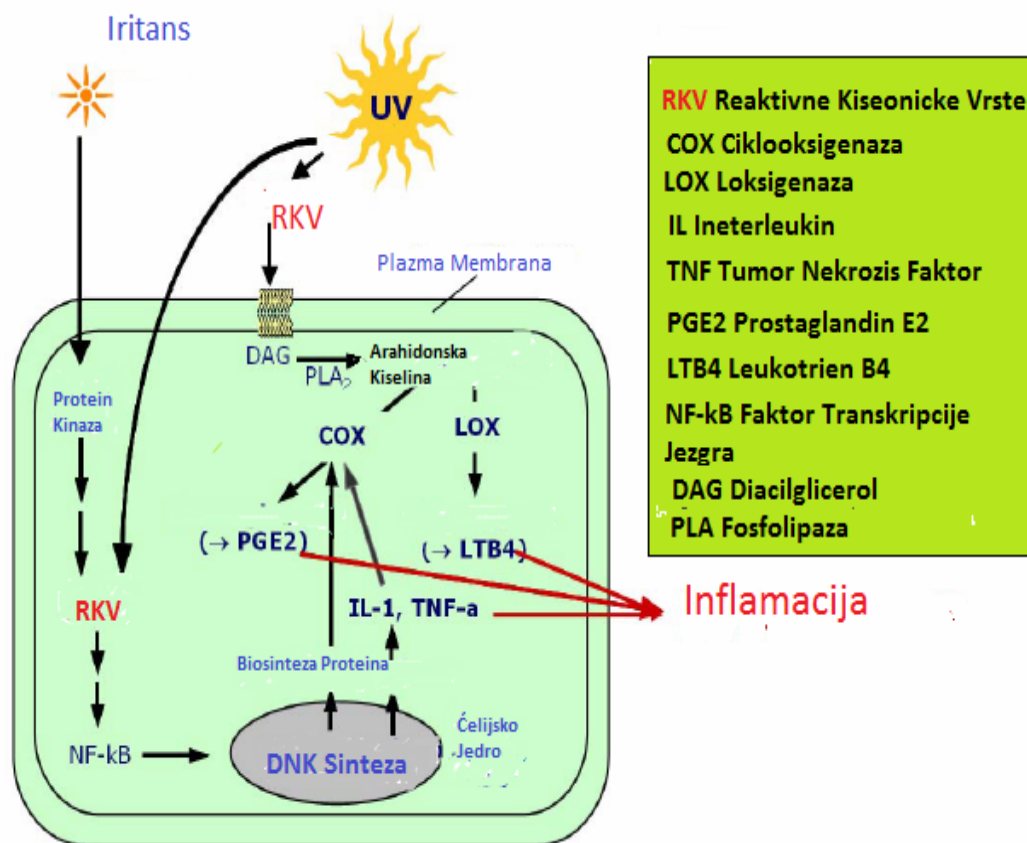
Vrsta i težina reakcija na koži zavise od organizma. Koncept iritacije je da se razvija odgovor kože, a može da dođe do kumulativnog efekta ako su pređašni iritansi memorisani u koži. Sličan koncept može da se primeni i na alergijske reakcije. Supstance su imunogene i tolerantogene zavisno od nosača na koje su kovalentno vezane. Klinički i biološki odgovor T i B ćelija varira zavisno da li je pacijent alergičan na neku supstancu. Reaktivnost zavisi i od telesne strukture. Navodi se pojedinačno delovanje jedinjenja na kožu što u kozmetologiji nije slučaj. Agens može da bude i aditiv pa mogu da se jave sinegristični neželjeni efekti, a dešava se da neka od prisutnih supstanci može da smanji iritacioni potencijal druge [Hermanns i sar., 2000].

Iritacija kože je kompleksni biološki proces. Opisan je kliničkom manifestacijom (eritem, edem) i hemijskim i fizičkim izazivačima, koji stvaraju zapaljenje na dodirnoj površini. Mnogobrojni spoljašnji faktori utiču na kliničku sliku iritantnog kontaktnog dermatita. Reakcija nastaje nakon jednog ili ponovljenog izlaganja dejstvu izazivača. Kao posledica može nastati narušavanje kožne barijere sa kasnijim porastom gubitka transdermalne vode i stimulacijom produkcije citokina [Loden i sar., 2000]. Iritacija je odgovor na nadražaj koji izazivaju razni stimulansi. Obuhvata produkciju citokina iz keratinocita. Ovi se citokini ubrajaju u pro-inflamatorne medijatore [Smith, 2002]. Nađeno je u novim istraživanjima da je prostaglandin PGE2 generalni medijator iritacije. U liniji keratinocita Ha Ca T (*in-vitro testovi*) nađeno je da je došlo do njegovog stvaranja pod uticajem izazivača [Natsh i sar., 2007]: UVB zračenja, antiperspirantne soli i surfaktanata. Patofiziološke promene su prekid barijerne funkcije kože i oslobađanje citokina iz keratinocita. Tri su glavne promene u kožnoj barijeri epidermalne, inflamatorne i oslobađanje citokinina [Smith, 2002].

Na ovaj način se podstiče zapaljenska reakcija kože. Moguće je i direktno oštećenje keratinocita što indukuje oslobađanje medijatora zapaljenja. Međutim, u subakutnim ili nevidljivim uslovima iritacije, zapaljenje može biti odsutno ili minimalno, ali kožna barijera može biti i dalje poremećena. Štaviše, subjektivna iritacija, bez vidljivih znakova, kao npr. pečenje ili svrab, može se takođe pojaviti. Čini se da ne postoji direktna povezanost između subjektivne i objektivne iritacije [Loden i sar., 2000, Chew i sar., 2006].

Iritacija kože se obično vizuelno subjektivno ocenjuje bodovanjem na skali eritema i edema i objektivnim *in vivo* neinvazivnom metodom bioinženjeringa kože. Mehanizam upale koji je prikazan na Slici 15 je jedan od mogućih puteva [Axterer i sar., 2006].

Mehanizmi Inflamacije



Slika 15. Mehanizam inflamacije

Kako je u procesima inflamacije najčešće povećan transepidermalni gubitak vode kroz kožu, efekat povećanja vlažnosti nakon aplikacije preparata sa gavezom doprinosi boljem dermatološkom učinku preparata [Arsić i sar., 2003].

2.7.1. Antiiritantne supstance

Termin antiiritans uveo je 1965. godine Goldemberg za različite supstance u topikalnom proizvodu koje su bile u stanju da smanje takozvani iritacioni potencijal drugih komponenti u tom istom proizvodu. Antiiritansi se dodaju kozmetičkim formulacijama kako bi se poboljšala njihova podnošljivost, a i kako bi se postiglo glavno dejstvo proizvoda, smirenje i lečenje kože. Generalno, danas se za antiiritantsne agense smatraju one supstance

koje smanjuju iritaciju kože. Oni najčešće deluju na dva načina: antiinflamatorno i stabilizuju narušenu lipidnu barijeru *stratum corneum-a*.

Antiiritansi koji smanjuju iritacioni potencijal supstanci u topikalnom proizvodu i na taj način ga čine podnošljivijim deluju na više načina:

- stvaranjem hemijskih kompleksa sa iritirantnom supstancom, sprečavanjem potpunog kontakta iritirajuće supstance i kože pomoću oblažućih agenasa kako bi se smanjilo širenje iritacije,
- blokiranjem reaktivnih mesta na koži aplikacijom masnih supstanci pre primene iritanasa na kožu [Andersen Flemming i sar., 2006].

Eritem je jedan od odgovora na iritaciju, a sposobnost smanjenja eritema je merilo antiiritantne aktivnosti koja može da se tumači i kao sposobnost uklanjanja slobodnih radikala. Čistači slobodnih radikala doprinose zaštiti kože tako što neutrališu štetne supstance koje mogu nastati izlaganjem kože sunčevom zračenju ili zagađenju. U ovu grupu spadaju superoksid dizmutaza i peroksidaza koje se nalaze u kvascu [Lods i sar., 2000].

Efekat tretmana antiiritantnim agensom se procenjuje korišćenjem kliničkog bodovanja-subjektivnom evalucijom i metodama bioinženjeringa: merenjem hidratacije, transepidermalnog gubitka vlage (TEWL) i boje kože, pre i posle aplikacije u određenim vremenskim intervalima, na zdravim dobrovoljcima i na eksperimentalno izazvanoj akutnoj iritaciji [Andersen Flemming i sar., 2006].

Mnoge supstance imaju dokazano antiiritantno delovanje. U kozmetičkim preparatima se najčešće kao antiiritantne supstance upotrebljavaju imidazol, hidroksi i karboksilna jedinjenja, a mnoga su u fazi istraživanja [Loden i sar., 2000]. Ispitivana je antiiritantna aktivnost nifedipina, glicerola, ulja repice, bisabolola. To su sve supstance koje na različite načine ostvaruju antiiritantno delovanje [Andersen Flemming i sar., 2006].

Sirovine biljnog porekla (biljna ulja, ekstrakti, etarska ulja i dr.) nalaze široku primenu u izradi savremenih kozmetičkih preparata najčešće kao kozmetički aktivne supstance (KAS). Fitokozmetika je sve prisutnija na tržištu kao posledica sveopšteg trenda “povratka prirodi” ali i zbog dokazanih pozitivnih efekata koje preparati sa aktivnim materijama biljnog porekla ostvaruju nakon primene na kožu. Biljni ekstrakti i supstance biljnog porekla mogu da ostvare i antiiritantno delovanje na različite načine [Glogovac, 2012]:

- antioksidantnim dejstvom, kojim inhibiraju enzime koji učestvuju u procesima oksidacije,
- antiinflamatornim delovanjem,
- povećanjem energetskeg nivoa ćelija epiderma.

Dokazano antiiritantno delovanje imaju supstance izolovane iz biljaka, naročito iz grupe biljnih fenola: bioflavonoidi, flavonolignani i antocijanidi. Najcenjeniji prirodni sastojci sa antiiritantnim i antiinflamatornim delovanjem izolovani i prečišćeni su azulen i apigenin (izolovani iz etarskog ulja kamilice), bisabolol, glukani, hlorogenska kiselina, ruzmarinska kiselina, rutin, melanin, biljna DNK [Glogovac, 2012]. Novija istraživanja pokazuju da likohalkon A izolovan iz herbe *Glycyrrhiza inflata* smanjuje proinflamatorne medijatore i redukuje iritaciju [Weber i sar., 2006].

Etarska ulja, frakcije etarskog ulja i mirisne materije smanjuju iritaciju [Natsh i sar., 2007].

Gavez je uvek posmatran u biljnom svetu kao idealno rešenje za bolnu, crvenu, upaljenu i oštećenu kožu. Tipična analiza biljke pokazuje njenu hemijsku složenost i pokazuje da različiti delovi biljke sadrže različite aktivne sastojke koji se mogu odvojiti od osnovnih komponenti. Fitoaktivne komponente su sastojci koji daju gavezu odgovarajuću farmakološku funkciju [Axterer i sar., 2006]

Mehanizam kojim koža postaje iritirana i upaljena je složen i zavisi od brojnih faktora. Nijedan put se ne može smatrati potpuno odgovornim za nastajanje eritema kože ili pruritičkih kožnih oboljenja. Za razliku od savremenih alopatskih lekova koji sadrže jedinstvene aktivne komponente koje deluju na jedan specifičan način, kod biljnih lekova prisutno je udruženo delovanje. Biljka sadrži mnoštvo različitih molekula koji deluju sinergistički na ciljne elemente kompleksnog ćelijskog puta. Pojedinačno ovi elementi mogu da rade prilično efikasno, međutim, vremenom je dokazano da ukupni efekat daleko superiorniji kada se koristi cela biljka [Axterer i sar., 2006].

2.7.2. Uticaj nosača na aktivnost bioaktivnih supstanci

Idealan topikalni nosač (vehikulum) bi trebalo da ispuni više različitih funkcija: kozmetičku prihvatljivost, biokompatibilnost, hemijsku, mikrobiološku i fizičku stabilnost i sposobnost da lako oslobodi lekovitu supstancu u *stratum corneum-u* (Tabela 3). Efekat vehikuluma na raspoloživost lekovite supstance verovatno je najviše izražen kod topikalne primene, više nego i kod ijednog drugog puta primene.

Poznato je da potentne aktivne supstance mogu biti klinički neefikasne, ukoliko se inkorporiraju u neodgovarajući vehikulum i obrnuto, poboljšanje terapijske aktivnosti se može postići pravilnim izborom vehikuluma kod inače slabo potentnih lekovitih supstanci.

Nosač može da utiče na oslobađanje lekovite supstance, propustljivost kože, poboljšanje ili smanjenje perkutane penetracije. Izbor nosača je jedan od najvažnijih koraka

za povećanje efikasnosti ciljano primenjenih bioaktivnih supstanci. Terapijska efikasnost ekstrakta gaveza može da zavisi od fizičko-hemijskog sastava nosača [Araujo i sar.,2012].

Uprkos onome što se želi postići formulacijama ne postoji univerzalni vehikulum. Svaki lek, u datoj koncentraciji zahteva primenu jedinstvenog vehikuluma za optimalnu terapiju [Rougier i sar., 2002; Smith i sar., 2002]. Tabela 3 pregledno daje kriterijume za izbor vehikuluma za lokalnu primenu lekova.

Tabela 3. Kriterijumi za izbor vehikuluma za lokalnu primenu

FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKI KRITERIJUMI
Stabilnost leka
Stabilnost komponenti vehikuluma
Reološka svojstva - konzistencija, moć istiskivanja
Gubitak vode i drugih isparljivih sastojaka
Fazne promene-homogenost/fazna separacija, curenje
Veličina kapi/čestica i distribucija veličine kapi/čestica
pH vrednost
Mikrobiološka kontaminacija/sterilnost (u neotvorenim kontejnerima i u toku primene)
Olakšano/poboljšano ili kontrolisano oslobađanje leka iz podloge
KOZMETIČKI I KRITERIJUMI VEZANI ZA PRIMENU VEHIKULUMA NA KOŽU
Vizuelni izgled proizvoda
Miris, boja
Lakoća kojom se proizvod istiskuje iz kontejnera
Aplikacione karakteristike, tekstura (čvrstina, homogenost, masnoća, adhezivnost)
Rezidualni osećaj nakon primene, zadržavanje na koži
BIOFARMACEUTSKI KRITERIJUMI
Olakšano/poboljšano oslobađanje leka i zadržavanje u koži
Kontrolisano oslobađanje leka i zadržavanje u koži
Ciljano oslobađanje leka i zadržavanje u koži

Kod lekova za lokalnu terapiju, oslobađanje aktivne supstance iz vehikuluma je prvi veoma značajan korak u postizanju lokalnog efekta. Mala brzina oslobađanja lekovite supstance, posle lokalne primene, uobičajeno, dovodi do niske biološke raspoloživosti u koži.

Poznato je da promene karakteristika podloge ili termodinamičkog potencijala aktivne supstance imaju za posledicu i promene u brzini oslobađanja iz izabranog nosača [Vuleta i sar., 2007].

2.7. 2.1. Emulzije

U farmaceutsko-kozmetičkoj praksi su široko zastupljeni proizvodi emulzionog tipa. Emulzije se koriste kao nosači, odnosno vehikulumi za lekovite supstance u dermatofarmaceutskim (topikalnim) preparatima. Primenom emulzija kao vehikuluma može se postići olakšana aplikacija lekovite supstance, poboljšanje resorpcije ili produženo oslobađanje lekovite supstance. Osnovni preduslov za primenu emulzija u praksi je odgovarajuća fizička stabilnost u predviđenom roku upotrebe, koji za većinu farmaceutsko-kozmetičkih preparata iznosi dve do pet godina. Dispergovanje ulja u vodi je termodinamički nefavorizovan proces jer zahteva veliku kontaktnu međupovršinu između dve faze koje se ne mešaju. Za stvaranje novih međupovršina potrebno je dovesti energiju u sistem, odnosno uložiti rad (u obliku toplote i/ili mehaničkog mešanja). Uložena energija se ugrađuje u sistem kao slobodna međupovršinska energija koja u stvari predstavlja potencijalnu energiju sistema. Po prestanku dovodenja energije, faze se najčešće razdvoje tako da samo dovodenje energije dvofaznom sistemu ulja i vode nije dovoljno za stvaranje stabilne mešavine u dužem vremenskom periodu. Zbog toga se mora voditi računa o sastavnim komponentama emulzionog sistema, što zahteva razvoj i optimizaciju novih formulacija krema [Glišić i sar., 2013].

Emulzije se sastoje od masne faze, vodene faze, emulgatora, koemulgatora i stabilizatora različitog tipa. U novije vreme se za izradu emulzija koriste površinski aktivne materije nejonskog ili anjonskog tipa. One se kombinuju sa masnim alkoholima sa velikim brojem ugljenikovih atoma obrazujući mešane emulgatore koji emulzije stabiliziraju složenim mehanizmima koje se opisuju teorijom gelske mreže.

Na temperaturi emulgovanja, kada vodena i masna faza dođu u kontakt, usled površinske aktivnosti emulgatora i primene energije mešanja unutrašnja faza emulzije se disperguje u obliku kapi. Pri tom, na granici dve faze, oko dispergovanih kapi dolazi do gustog pakovanja jednog broja molekula PAM (površinski aktivnih materija) i molekula masnih alkohola u mono- ili višekomponentne filmove. Usled specifičnog načina pakovanja molekula, unutar filmova se gradi faza lameralnih tečnih kristala, koji predstavlja prelazno stanje između tečnog i čvrstog agregatnog stanja. Preostali deo PAM i masnog alkohola prelazi u kontinuiranu fazu emulzije, hidratiše i bubri i takođe obrazuje lamelarne tečne

kristale. Međutim, tokom hlađenja emulzije ova tečno-kristalna faza postepeno prelazi u gel-kristalnu fazu, tako da u spoljašnjoj fazi emulzije nastaje lamelarna gelska mreža. Na taj način spoljašnja faza se strukturiira i zgušnjava (porast viskoziteta), što dodatno stabilizuje emulziju. Pored tradicionalnih mešanih emulgatora, na ovaj način emulzije stabilizuju novije generacije emulgatora koji se baziraju na sirovinama prirodnog porekla i biodegradibilnim, ekološki prihvatljivim sirovinama [Vasiljević i sar., 2007].

Od emulgatora se očekuje da nisu agresivni, ne isušuju kožu, ne spiraju lipide sa površine kože i ne stupaju u interakcije sa proteinima kože. Sve emulzije, bilo farmaceutske bilo kozmetičke, termodinamički su nestabilni sistemi u kojima masna i vodena faza imaju težnju da se razdvoje. Nakon izrade, u periodu čuvanja mogu se desiti različiti vidovi nestabilnosti (raslojavanje, flokulacija, koalescencija, separacija faza). Mešani emulgatori novije generacije grade stabilne sisteme za duže vreme. Kombinacije nejonskih površinski aktivnih supstanci sa višim masnim alkoholima predstavljaju dobre i pouzdane stabilizatore U/V (ulje/voda) emulzija. Od nejonskih PAM često se koriste etoksilovani etri masnih alkohola, cetareti i steareti i masni alkoholi od kojih najčešće cetil, lauril, stearyl, miristil alkohol [Vasiljević i sar., 2007].

2.7. 2. 2. Geli

Osim emulzija, gelovi se sve više upotrebljavaju kao podloge-nosači bioaktivnih supstanci. Gelovi su polučvrsti sistemi sačinjeni od malih neorganskih čestica ili velikih organskih molekula koje geliraju tečnost. Mogu biti jednofazni i dvofazni. Geli su disperzni sistemi koji se sastoje od barem dve komponente, čvrste, koju čini koloidna materija i tečne. Najčešće su to jednofazni sistemi. Čvrsta komponenta gradi koherentan trodimenzionalan skelet (mrežu), u koju se uklapa tečna faza procesima liosorpcije, mehaničkog uklapanja ili kapilarnog uklapanja. Jednofazni geli se sastoje iz organskih makromolekula, homogeno raspršenih u tečnosti. Za izradu gela potrebni su sredstvo za geliranje, tečna komponenta i ostali sastojci koji po potrebi mogu biti najčešće konzervansi i humektansi. Sredstva za geliranje mogu biti brojne materije prirodnog, polusintetskog i sintetskog porekla. U farmaciji i kozmetologiji se danas najviše koriste polusintetska i sintetska gelirajuća sredstva za izradu hidrogelova. Polusintetski gelirajući agensi nastaju hemijskom modifikacijom molekula prirodnog porekla najčešće celuloze (metilceluloza, karboksimetilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksietilceluloza). Sintetska gelirajuća sredstva su polimerne supstance nastale reakcijama polimerizacije monomera sa ili bez dodataka sredstva za unakrsno povezivanje lanaca. Ako se radi o istim monomerima dobijaju se homopolimeri, a ako se radi o različitim monomerima

dobijaju se kopolimeri. Najčešće se dobijaju reakcijama polikondenzacije i polimerizacije. To su polivinilpirolidon, polivinilalkohol, polimeri akrilne kiseline, poloksameri. Poliakrilna kiselina (PAA) spada u grupu organskih sintetskih makromolekula. Zove se još i karboksivinil polimer (PH. JUG V) ili karbomer (PH EUR 2005). To je anjonski polimer akrilne kiseline. Neznatno se rastvara u vodi. Za obrazovanje gela koristi se 0,5-1% karbopola koji tek u baznoj sredini, neutralizacijom sa nekom neorganskom ili organskom bazom gradi gel velikog viskoziteta. Stabilni su na pH od 6-10. Ispod pH 3, a iznad pH 11 viskozitet im drastično opada. Poliakrilatni geli su osetljivi na katjone (Na^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} jone) čije prisustvo dovodi do koagulacije gela, a kada se pri izradi doda veća količina baze nastaju mekši geli. Geli izrađeni sa karbomerom su osetljivi na svetlost i mogu da se rastečne. Za zastitu ovih gela od UV zraka dodaje se hidrosolubilni UV filter benzofenon u koncentraciji od 0,05%. Karbomeri se međusobno razlikuju po viskozitetu. Tako 0,55% rastvor karbomera 934 ima viskozitet 32 500 mPas, dok rastvor karbomera 941, iste koncentracije, ima vrednost 8 900 mPas. Zbog razlike u viskozitetu koje imaju disperzije različitih karbopola u vodi jedan tip karbomera ne može se zameniti drugim bez provere. Poliakrilatni geli koji sadrže veću količinu alkohola, obično imaju niže viskozitete (mekši geli), što se može popraviti korišćenjem veće koncentracije karbopola. Ultrez 10 Polimer (Carbopol®Ultrez), slično ostalim karbomerima, dodatno stabilizuje preparat, utičući na konzistenciju gela. To je lako dispergujući polimer akrilne kiseline. Karakteriše ga sposobnost da se u kontaktu sa vodom kvasi i redispeguje vrlo brzo, tako da nije potrebna primena snažnih mešalica i dispergatora kao kod konvencionalnih karbomera. Tako je za pripremu 500 g 0,5% disperzije polimera potrebno oko 5 minuta za kompletno vlaženje bez mešanja. Temperatura vode takođe doprinosi brzini dispergovanja i bubrenja, dok se kod tradicionalnih karbomera topla voda izbegava zbog mogućnosti stvaranja grudvica. Za dispergovanje karbopola Ultrez 10 temperatura ne treba da prelazi 60°C, jer se iznad ove temperature postiže suprotan efekat [Vasiljević i sar., 2007].

Kao sredstva za neutralizaciju mogu da se primene baze rastvorljive u vodi. Izrada gelova je uglavnom jednostavna, samo je potrebno izabrati odgovarajući način izrade i adekvatnu opremu. Važno je omogućiti proces hidratacije gelirajućeg sredstva u celokupnoj količini tečne faze [Vasiljević i sar., 2007].

Lekovita ili kozmetički aktivna supstanca u odnosu na svoje fizičko-hemijske osobine može da se rastvori u delu ili celokupnoj količini tečne faze ili suspenduje u pripremljenoj gel podlozi.

Mogućnost obrazovanja gela zavisi kako od oblika i simetričnosti molekula, tako i od sposobnosti solvatacije i umrežavanja. Umrežavanje se postiže stvaranjem bočnih, primarnih i sekundarnih veza. Primarne su jonske i kovalentne veze. Sekundarne veze se stvaraju preko polarnih i nepolarnih grupa ili stvaranjem vodoničnih mostova.

Geli mogu da sadrže i do 99% tečne faze i u tom smislu su vrlo ekonomični sistemi. Hidrosolubilna lekovita supstanca se može rastvoriti u delu ili celokupnoj količini vode, mešavini vode i alkohola ili vode i propilenglikola. Povećanje rastvorljivosti lipofilnih lekovitih supstanci u tečnoj fazi gela može se postići upotrebom solubilizatora kao što su PAM sa hidrofilno-lipofilnim balansom, od 15 do 18. Solubilizator se homogeno izmeša sa lipofilnom supstancom. Vodena faza, koja po potrebi može biti zagrejana, dodaje se u mešavinu lekovite supstance i solubilizatora, uz mešanje [Vasiljević i sar., 2007]. Kada se radi sa izrazito hidrofobnim lekovitim supstancama, preporučuje se upotreba sredstva za kvašenje, koja smanjuju površinski napon na granici dve faze i omogućuju lakše prijanjanje vehikuluma uz čvrstu česticu. Sredstvo za kvašenje treba dispergovati u vehikulumu, a zatim suspendovati hidrofobnu lekovitu supstancu. Geli su pogodan medijum za razvoj mikroorganizama zbog visokog sadržaja vode usled čega ih treba konzervisati. Tečna komponenta hidrogelova je najčešće voda, ali se koriste i mešavine vode i alkohola (etanola ili izopropanola). Voda je delimično vezana za makromolekule gelirajućeg sredstva, a delimično je slobodna. Ona ispunjava šupljine unutar prostorne gelske mreže i predstavlja slobodni rastvarač. Humektansi su sredstva koja sprečavaju isušivanje hidrogela i to su najčešće glicerol i propilenglikol. Konzervansi koji se dodaju gelima moraju biti zakonom dozvoljeni i kompatibilni sa sredstvom za geliranje [Vasiljević i sar., 2007]. Dobre osobine gela su da se lako primenjuju na intaktnu i ozleđenu kožu i sluzokožu, pogotovu su zgodni za vlasište, nakon razmazivanja dobro prijanjaju na kožu i omogućuju fiksiranje leka na obolelo mesto, a da ne ometaju normalno disanje kože. Izrađeni sa anjonskim poliakrilatima nakon utrljavanja u kožu ostvaruju dubinsko delovanje, što se može pojačati dodatkom metanola ili izopropanola. Prilikom njihove primene nije uočena iritacija kože, lako se spiraju sa mesta primene i njihova biofarmaceutska ispitivanja pokazuju bolje oslobađanje mnogih lekovitih supstanci iz gela u odnosu na masti i kremove [Vuleta, 2004].

Hidrogeli su laki za proizvodnju, nisu skupi, generalno su priznati kao bezbedni i široko su prihvaćene podlode u koje se inkorporiraju ekstrakti. Važno je da su ekstrakti rastvorni, stabilni i kompatibilni sa podlogom. Tehnologija izrade je najčešće takva da se u svež izrađen gel inkorporiraju ekstrakti. Najčešće izrađivani geli sa ekstraktima u kozmetologiji su za tretman celulita (ekstrakti divljeg kestena), za tretman posle brijanja

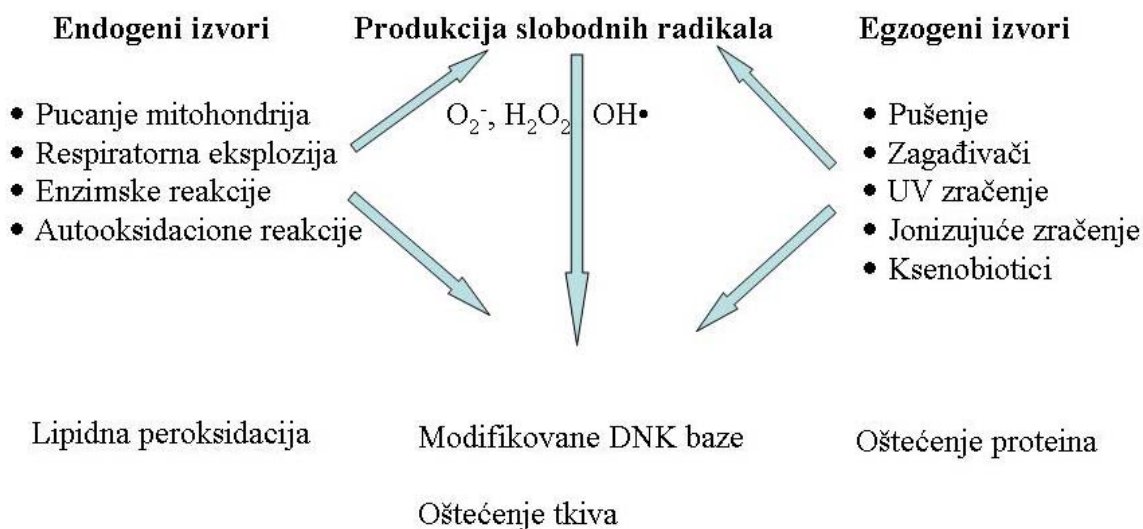
(ekstrakti kamlice, hamamelisa, crnog sleza), u anti-age preparatima (*Aloje vera*), za čišćenje (ekstrakti algi, hamamelisa, belog sleza, kamilice), za piling kože (ekstrakti lišajeva – *Usnea barbata*), protiv znojenja nogu (ekstrakti žalfije i hrasta).

Kod bioaktivnih proizvoda, pored nosača kao pomoćne komponente, važnu ulogu imaju i bioaktivne supstance. Prve aktivne materije koje su korišćene u kozmetici su biljnog porekla. Povoljno dejstvo lekovitog bilja na kožu i sluzokožu potiče od biološki aktivnih sastojaka, pa su kozmetički najaktivnije biljne materije: flavonoidi, terpeni, glikozidi, saponini, tanini, organske i neorganske kiseline. Ova jedinjenja, naneta na kožu, izazivaju omekšavanje epiderma, poboljšavanje cirkulacije krvi i prokrvljenje perifernih kapilara, bržu epitelizaciju i regeneraciju kože i deluju adstringentno, antiseptično, antiflogistički. Posebnu pažnju privlače supstance izolovane iz biljaka kao što su bisabolol iz kamilice, fitosteroli, esencijalne masne kiseline i druge. Aktivne materije u biljnim ekstraktima uglavnom deluju sinergistički [Lindee, 2000].

Fitokozmetika koristi standardizovane ekstrakte ili prečišćene komponente biljnog porekla i na taj način se obezbeđuje konstantno delovanje koje se može kvantifikovati. Istovremeno, korišćenjem standardizovanih preparata izbegavaju se neželjena dejstva na koži, najčešće u vidu kontaktnog dermatitisa ili povećane senzibilizacije. Naročito su u tom smislu reaktivni sastojci biljaka male molekulske mase, koji su u stanju da se vežu na reaktivne proteine površinskih antigena, koji funkcionišu kao nosači. Veliki broj poznatih lekovitih biljaka poseduje senzibilizirajuća svojstva. Njihova stabilnost je manja nego hemijski čistih supstanci zbog složenog međusobnog delovanja različitih jedinjenja koja ulaze u sastav ekstrakata, način dobijanja i uslova čuvanja [Glišić i sar., 2013]. Tokom čuvanja preparata može doći do promena fizičke, hemijske i mikrobiološke prirode. Od fizičkih promena najčešće su promena pH, viskoziteta, taloženje, razdvajanje faza, zamućenje i drugo. Česte hemijske promene su oksido-redukcija pojedinih sastojaka, hidroliza, kondenzacija i polimerizacija. Dešavaju se takođe i fotohemijske promene, što ukazuje na potrebu adekvatnog čuvanja preparata. Da bi se obezbedila i pratila stabilnost ekstrakata fizičkim, hemijskim ili biološkim metodama, potrebno je prethodno izvršiti njegovu standardizaciju. Proizvod se smatra stabilnim sve dok je sadržaj aktivnih principa veći od 90% deklarisanog sadržaja i dok nastali degradacioni proizvodi nisu toksični [Kovačević, 2004]. Za formulacije nosača neophodno je poznavanje biohemijskih procesa u koži i karakterizacija aktivnih komponenti [Glišić i sar., 2013].

2.8. Antioksidativna aktivnost

Kiseonik je od vitalne važnosti za sve žive organizme osim za striktne anaerobe. Ipak paradoks aerobnog načina života je oksidativno oštećenje ključnih bioloških molekula, koje ugrožava strukturu i funkcionisanje živog organizma. Čak i savremeni metabolički putevi poseduju svega par enzima "zaduženih" za molekul kiseonika iako snabdevanje energijom kompletno zavisi od transfera elektrona ovom akceptoru [McCord, 2008; Benzie, 2003]. Na Slici 16 su prikazani izvori slobodnih radikala u telu i posledice njihovog delovanja [Young i sar., 2001].



Slika 16. Glavni izvori slobodnih radikala u telu i posledice njihovog delovanja

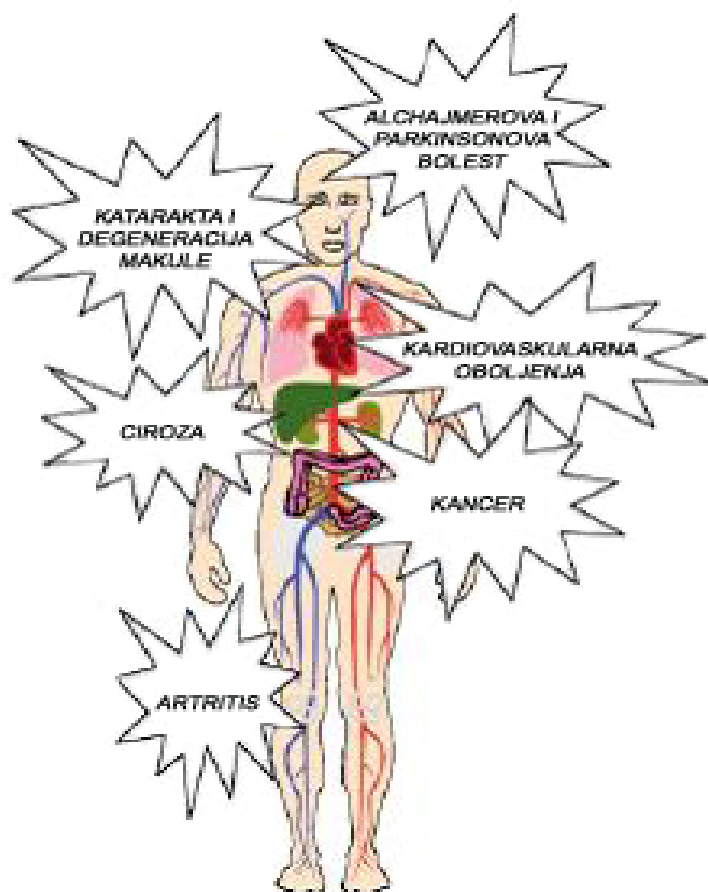
Postoji mnogo vrsta slobodnih radikala u živom svetu ali se najviše pažnje (pošto su najvažniji u patološkim poremećajima) posvećuje kiseoničnim radikalima [Young i sar., 2001.; Pietta, 2000]. Veoma često se koristi termin reaktivne kiseonične vrste (RKV) i uključuje ne samo kiseonične radikale, već i neke neradikalske derivate kiseonika [McCord, 2008; Pietta, 2000]. U Tabeli 4 dati su najvažniji reaktivni oblici kiseonika.

Tabela 4. Najvažniji reaktivni oblici kiseonika (RKV)

Radikali	Ne-radikalni oblici
suproksidni anjon $O_2^{\cdot -}$	singlet kiseonik O_2
peroksidni $HOO^{\cdot}$	vodonik peroksid H_2O_2
hidroksi $HO^{\cdot}$	organski peroksidi $ROOH$
alkoksil $RO^{\cdot}$	ozon O_3
peroksi $ROO^{\cdot}$	hipohlorna kiselina $HOCl$
	vodonik peroksid H_2O_2

Subtoksični nivoi RKV imaju važnu fiziološku ulogu u biološkoj signalizaciji (npr. superoksid radikal je antibiotik izuzetno širokog spektra, medijator inflamacije, prenosnik signala i regulator genske ekspresije). RKV se smatraju mogućim signalnim molekulima za utvrđivanje koncentracije kiseonika u okruženju pošto se i koncentracija kiseonika (uključujući i hipoksiju) i RKV registruje preko istog mehanizma [McCord, 2008; Gutteridge i sar., 2000].

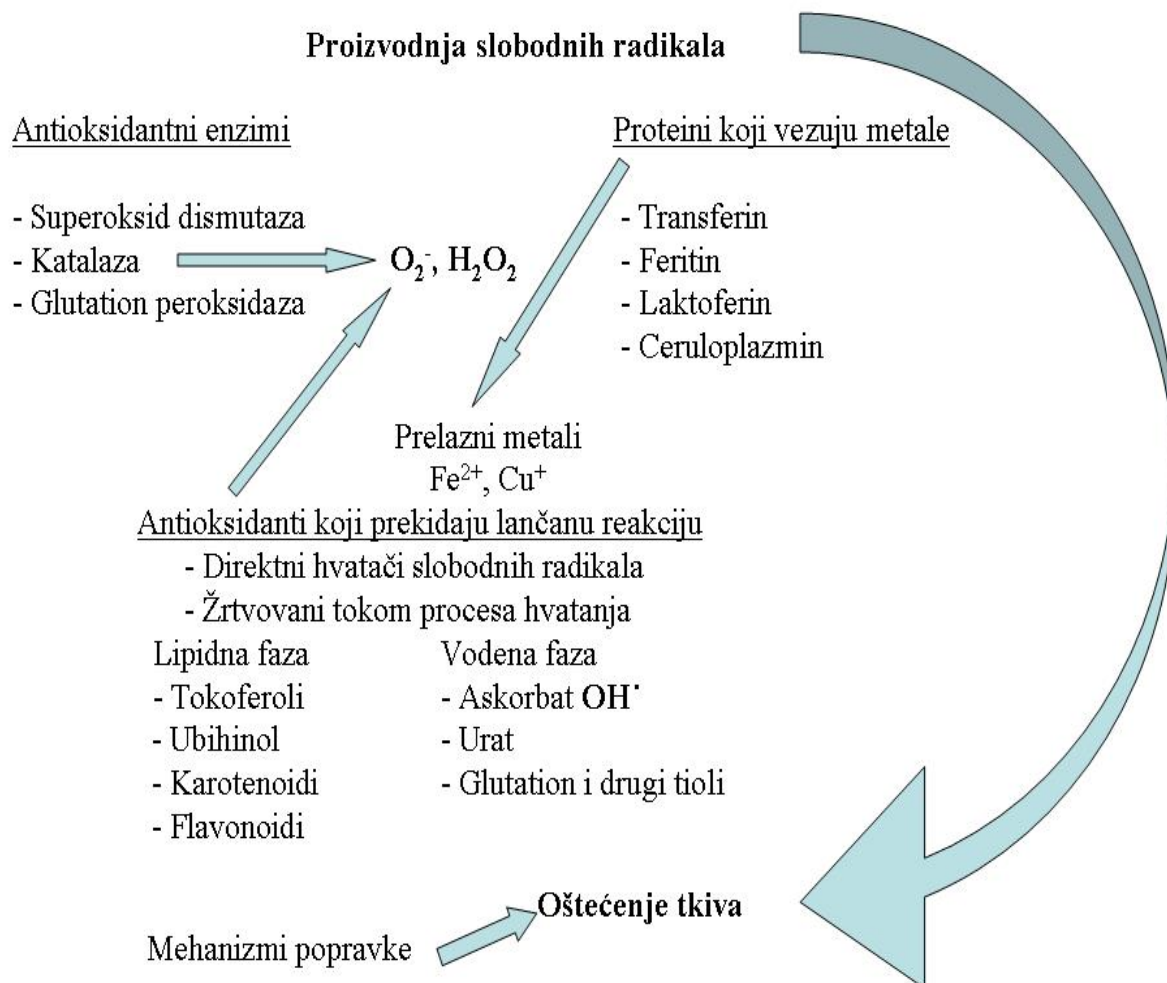
„Antioksidativne strategije“ su potrebne da bi se ograničila štetna reakcija između RKV i raspoloživih supstanci – dragocenih supstrata kao što su tiolne grupe proteina, DNK baze i polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acid* – PUFA). Oksidativno oštećenje ovih molekula dovodi do inaktivacije enzima, mutacija, pucanja membrana, povećanja aterogenosti LDL-a, disfunkcije mitohondrija i izumiranja ćelija. Ovi toksični efekti kiseonika su uključeni u proces starenja i razvoj hroničnih, inflamatornih, degenerativnih i bolesti vezanih za starenje [McCord, 2008; Turrens, 2003]. Oksidativni stres je uključen i u razvoj gotovo polovine svih humanih karcinoma, a utvrđena je veoma dobra korelacija antioksidativne i antimutagene aktivnosti [Yen i sar., 1995].



Slika 17. Bolesti i poremećaji do kojih dovode RKV

Na Slici 17 prikazana su moguća oboljenja do kojih mogu dovesti RKV izazivajući oštećenje proteina, lipida i DNK kod čoveka, čime menjaju i strukturu i funkciju ključnih bioloških molekula [Gracy i sar., 1999].

Smatra se da oksidativni stres značajno doprinosi razvoju i pogoršanju svih inflamatornih oboljenja (artritis, vaskulitis, glomerulonefritis, lupus, respiratorni distress sindrom odraslih), ishemijskih oboljenja (bolesti srca, moždani udari, intestinalna ishemija), hemohromatoze, AIDS-a, emfizema, transplantacija organa, gastričnog ulcera, hipertenzije i preeklampsije, neuroloških oboljenja (multiple skleroze, amiotrofične lateralne skleroze, mišićne distrofije, Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti), alkoholizma, imunosupresije, dijabetesa, opadanja kose, bolesti povezanih sa pušenjem i mnogih drugih. Razlog što je hiperprodukcija slobodnih radikala uzrok tako širokog spektra oboljenja je to što je oksidativni metabolizam neraskidivi deo metabolizma svake ćelije. Kada je ćelija povređena ili obolela to rezultira mitohondrijalnim oštećenjem (influks kalcijuma, cepanje membrana i sl.), pa raste proizvodnja superoksida [McCord, 2008.; Duthie i sar., 2000].



Slika 18. Antioksidantna odbrana od napada slobodnih radikala

Antioksidanti se mogu podeliti na „endogene“ (sastavni deo organizma) i „egzogene“ (uneti hranom), a javljaju se i "popravni" antioksidanti (sposobni da poprave nastalo oštećenje koje RKV načine, a to su uglavnom proteaze, lipaze, transferaze i DNK reper-enzimi) [Pietta, 2000]. Prema drugoj podeli antioksidativni sistemi odbrane se mogu razvrstati u tri glavne grupe: antioksidantne enzime, proteine koji vezuju prelazne metale i antioksidante koji prekidaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Slika 18) [Young i sar., 2001].

Antioksidativni enzimi katalizuju neutralisanje slobodnih radikala. Proteini koji vezuju prelazne metale sprečavaju njihovu interakciju sa vodonik peroksidom i superoksidom što dovodi do nastanka visoko reaktivnih hidroksi radikala. Antioksidanti koji prekidaju lančanu reakciju su snažni donori elektrona koji reaguju sa slobodnim radikalima pre nego što se oštete ciljni molekuli, sami se oksiduju i moraju biti regenerisani ili zamenjeni. Radikali antioksidanata su nereaktivni i ne mogu da napadnu druge molekule [Young i sar., 2001]. U Tabeli 5 dati su mehanizmi antioksidativnog dejstva [Benzie, 2003].

Tabela 5. Mehanizmi antioksidativnog dejstva

Mehanizam antioksidativnog dejstva	Primer antioksidanta
Fizička barijera sprečava nastajanje RKV ili njihov prilaz važnim biološkim mestima	UV filtri, ćelijske membrane
Hemijske zamke/tuneli apsorbuju energiju i elektrone, suzbijajući ROS	karotenoidi, antocijanidini
Katalitički sistemi neutrališu ili ometaju RKV	antioksidativni enzimi: SOD (superoksid dizmutaza), katalaza i glutation reduktaza
Haber–Weiss-ovoj reakciji	feritin, katehini ceruloplazmin, askorbinska i urična
Žrtveni i antioksidanti koji prekidaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije, hvataju i uništavaju RKV	kiselina, tokoferoli, glutation, flavonoidi

Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala fenolnih komponenti pripisuje se osobini donacije vodonika: što je veći broj hidroksilnih grupa to je veća verovatnoća za aktivnost uklanjanja slobodnih radikala [Samee i sar., 2004]. U slučaju derivata benzojeve i

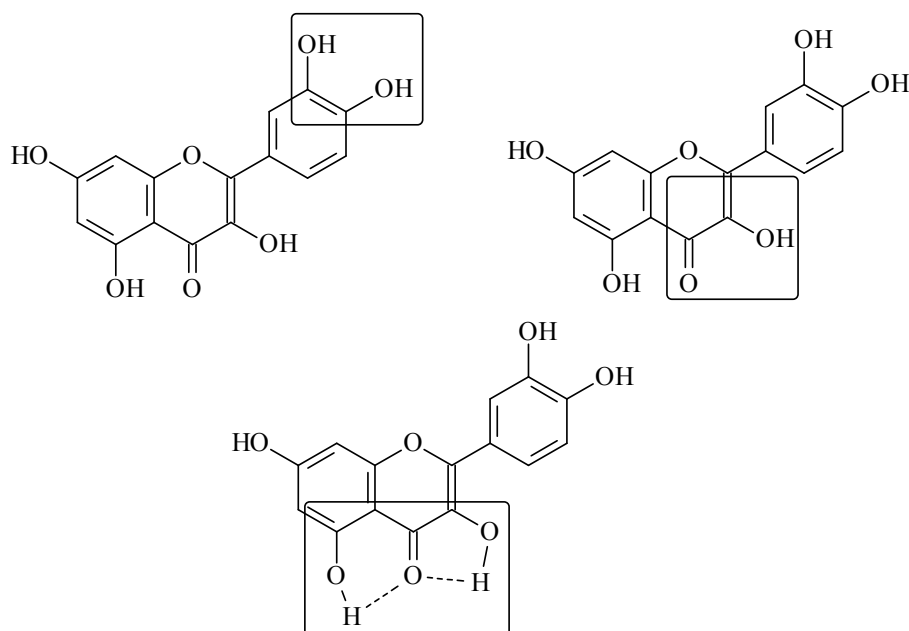
cimetne kiseline sa povećanjem broja hidroksilnih grupa raste i antioksidativna aktivnost. Supstance sa 3 OH grupe na fenil prstenu fenolnih kiselina ili na B prstenu flavonoida imaju izraženu antioksidantnu aktivnost. Gubitak jedne hidroksilne grupe neznatno smanjuje antioksidativnu aktivnost, dok gubitak dve OH grupe drastično utiče na smanjenje antioksidativne aktivnosti. Međutim, ne pokazuju sve OH grupe fenolnih jedinjenja istu reaktivnost. Položaj i stepen hidroksilacije flavonoida, posebno u B prstenu, je od najvećeg značaja kada je u pitanju antioksidantna aktivnost, pri čemu 3', 4'-dihidroksi konfiguracija pokazuje aktivnost. Uvođenje metoksi grupe u fenolnu kiselinu povećava antioksidativnu aktivnost [Samee i sar., 2004; Fukumoto i sar., 2000]. Raspoloživost hidroksilnih grupa je tesno povezana sa hemijskom strukturom i prostornom konformacijom, koje mogu modifikovati reaktivnost molekula pa čak i orijentacija hidroksilne grupe. Kako efikasnost u neutralisanju slobodnih radikala zavisi od sposobnosti antioksidanta da formira stabilan radikal, različiti molekuli šećera mogu ili povećati ili smanjiti stabilnost radikala i uticati na antioksidativnu aktivnost [Wang, 1997].

Hidroksilna grupa u *orto* položaju se smatra najvažnijom i za tanine kada je u pitanju inhibicija slobodnih radikala. Aktivnost tanina se povećava sa porastom molekulске mase i broja galoilnih grupa. Dimerni, trimerni i polimerni tanini generalno pokazuju jaču aktivnost prema DPPH radikalu u odnosu na monomere i derivate malih molekula [Yokozawa i sar., 1998]. Antioksidativna aktivnost tanina na autooksidaciju polinezasićenih masnih kiselina se pripisuje stabilnosti slobodnih radikala ovih jedinjenja, koji pokazuju dobar efekat neutralizacije drugih radikalskih vrsta [Milić i sar., 2000].

Grupa autora koja je proučavala antioksidativnu aktivnost fenola hrane je došla do zaključka da je aktivnost fenola u različitim rastvaračima različita. Sa porastom polarnosti rastvarača raste i antioksidativna aktivnost [Pinelo i sar., 2005].

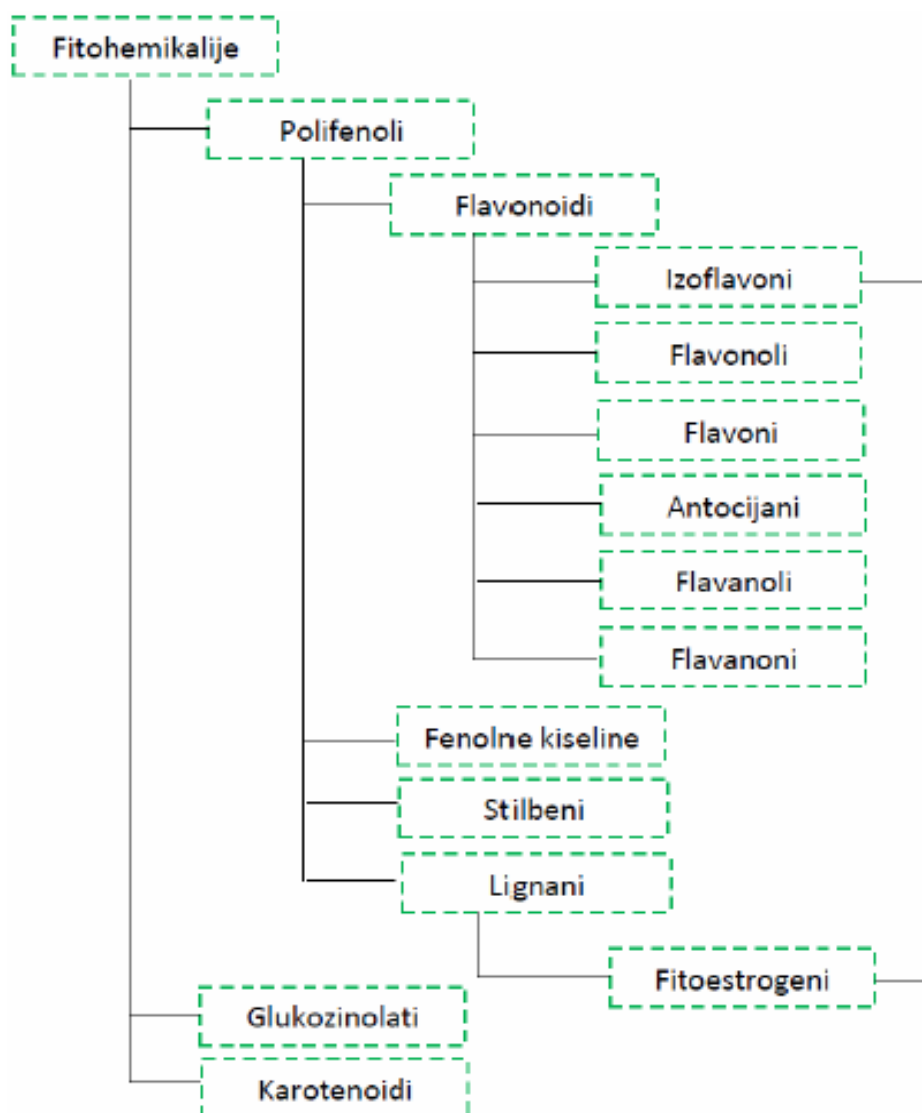
I oksidanti i antioksidanti imaju različite hemijske i fizičke karakteristike. Pojedinačni antioksidanti mogu, u nekim slučajevima, delovati različitim mehanizmima u istom sistemu ili se jedan mehanizam dejstva može razlikovati u zavisnosti od reakcionog sistema. Antioksidanti čak mogu na različite načine da odgovore na različite radikale ili izvore oksidanata. Zbog višestrukih karakteristika reakcije i mehanizama kao i različitih faza i lokalizacija u kojima se reakcije dešavaju, pojedinačno ispitivanje nikada neće u potpunosti rasvetliti sve izvore radikala ili sve antioksidante u kompleksnim sistemima. Ne postoji jednostavna, univerzalna metoda kojom se ukupan antioksidativni kapacitet može kvantitativno i precizno izmeriti [Prior i sar., 2005].

Postoje brojni testovi za određivanje antioksidativnog potencijala ali se svi oni mogu podeliti u dve grupe: ispitivanje sposobnosti uklanjanja radikala i ispitivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije (LP) pod uslovima koji je favorizuju. Test sistemi za procenu sposobnosti uklanjanja radikala mere redukciju ili stabilnih radikala ili radikala generisanih radiolizom, fotolizom ili Fentonovom reakcijom. Ubrzani test sistemi za ispitivanje sposobnosti inhibicije LP uglavnom uključuju lipide koji se brzo oksiduju da bi se oponašao dugi indukcionni period za kratko vreme, a za ubrzavanje oksidacije koristi se povišena temperatura [Schwarz i sar., 2001]. Fenolna jedinjenja (polifenoli) u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Antioksidativna aktivnost fenola je rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonika, nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksil radikali. Relativno velika stabilnost fenoksil radikala objašnjava se delokalizacijom elektrona, uz postojanje više rezonantnih struktura. Osim pomenutog mehanizma, biljni fenoli mogu i heliranjem jona metala sprečiti njihovo katalitičko dejstvo u produkciji RKV [Živković, 2009]. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina se pripisuje prisutnosti i položaju hidroksilnih grupa unutar molekula. Povećava se uvođenjem druge hidroksilne grupe u položaj *orto* ili *para*, a još dodatno uvođenje jedne ili dve metoksi grupe u *orto* položaj u odnosu na hidroksilnu grupu [Fukumoto i sar., 2000; Dewick, 2002]. Na Slici 19 prikazane su funkcionalne grupe važne za antioksidativnu aktivnost u fenolnim jedinjenjima [Kazazić, 2004].



Slika 19. Funkcionalne grupe u fenolnim jedinjenjima važne za neutralisanje slobodnih radikala

Na Slici 20 su date fitohemikalije sa izraženim antioksidativnim svojstvima [Radojković, 2012].



Slika 20. Različite grupe fitohemikalija sa izraženom antioksidativnom aktivnošću

2.9. Antimikrobna aktivnost

Uprkos brzom razvoju antibiotika, humane infekcije bakterijskog, gljivičnog ili virusnog porekla i dalje predstavljaju značajan medicinski problem. Neracionalna primena klasičnih-sintetskih antibiotika dovela je do razvoja rezistencije velikog broja mikroorganizama [Cowan, 1999]. Intrahospitalne (nozokomijalne) infekcije javljaju se kod oko 10% bolesnika i najčešće su lokalizovane na koži, u urinarnom i respiratornom traktu. Većina izolovanih sojeva bakterija, koji izazivaju navedene infekcije, pokazuju izrazitu rezistenciju na veći broj antibiotika. Infekcije rana i kože najčešće izazivaju: *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* i *Proteus* spp. Piogene infekcije kože i potkožnog tkiva (impetigo, folikulitis, furunkuli, karbunkuli i celulitis) pretežno izazivaju stafilokoke i streptokoke, a osnovna karakteristika navedenih infekcija je pojava supuracije, nekroza tkiva i formiranje apscesa. Nozokomijalne urinarne infekcije često uzrokuju: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus* spp. Poslednjih godina, kao uzročnici bolničkih infekcija sve češće se izoluju bakterije koje predstavljaju normalnu mikrofloru kože, kao što su koagulaza negativne stafilokoke i *Acinetobacter* spp. [Brooks i sar., 2004].

Nekomplikovane kožne infekcije (koje se često nazivaju i infekcije kože i mekog tkiva), su druga najčešće dijagnostifikovana bolest kože [Elston, 2004]. Poznato je da idealan topikalni antibiotik treba da ima dovoljno širok spektar dejstva, ne sme da izaziva rezistenciju i mora pokazivati nizak potencijal za izazivanje neželjenih efekata. Sa druge strane, kod primene uobičajeno korišćenih topikalnih antibiotika, pored pojave rezistencije, veoma su česti slučajevi alergijskog kontaktnog dermatitisa [Gehrig i sar., 2008].

Na osnovu navedenog, ne iznenađuje činjenica da je sve veći broj istraživanja u svetu usmeren ka pronalaženju novih prirodnih sirovina sa antimikrobnim delovanjem. Lekovite biljke su naročito interesantne kao izvori biološki aktivnih supstanci sa antimikrobnim delovanjem. Ovi sastojci su relativno lako dostupni, ispoljavaju minimum neželjenih efekata i nisku toksičnost [Gisby i sar., 2000].

Biljke poseduju skoro neograničenu sposobnost sinteze hemijski raznovrsnih niskomolekulskih jedinjenja, kroz različite biosintetske puteve sekundarnog metabolizma. Sinteza ovih supstanci, često, predstavlja mehanizam odbrane i odgovor biljke na napad biljnih patogena i pojavu infekcije (fitoaleksini). Ako u biljci imaju ovakvu ulogu, sasvim je jasno, da će je ova jedinjenja ispoljiti i u *in vitro* uslovima. Ipak, kao što je i napomenuto, ekstrapolacija ka *in vivo* efikasnosti nije tako jednostavna, pa zato i nema puno biljnih lekova potvrđene efikasnosti i opravdane primene kod infektivnih oboljenja. Takođe, i pored intenzivnih istraživanja viših biljaka, farmaceutska industrija nije otkrila potentno, netoksično jedinjenje širokog antimikrobnog spektra koje bi vredelo dalje transformisati radi dobijanja novog antibiotika [Lewis i sar., 2006].

Istraživanja poslednjih decenija su definisala najvažnije sastojke biljaka koji poseduju antimikrobnu aktivnost. Ovi sastojci su i odgovorni za određenu delotvornost biljnih droga. Potvrđeno je da antimikrobnu aktivnost poseduju brojni polifenolni sastojci biljaka (jednostavni polifenoli, fenolne kiseline, lignani, hinoni, flavonoidi, tanini, kumarini),

terpenoidi i etarska ulja, alkalodi, lektini, polipeptidi, poliacetileni, masne kiseline pa čak i neki jednostavni šećeri ili organske kiseline [Hammer i sar., 1999].

Najdetajnije su ispitivana etarska ulja (kao smeše) odnosno pojedinačni sastojci etarskih ulja [Hammer i sar., 1999; Dorman i sar., 2000]. Poslenjih dvadesetak godina, intenzivirano je ispitivanje flavonoidnih jedinjenja. Što se tiče antimikrobne aktivnosti, pokazalo se da su flavonoidi robinetin, miricetin, apigenin, rutin, galangin, 2,4,2'-trihidroksi-5'-metil halkon i lanhokarpol proglašeni za vodeće supstance.

Flavonoidi inhibiraju rast mikroorganizama različitim mehanizmom: kvercetin inhibira DNK girazu i energetskei metabolizam, soforaflavon G i (-)epigalokatehin galat inhibiraju funkciju citoplazmatske membrane, likohalkoni A i C inhibiraju energetskei metabolizam itd. [Cushnie i sar., 2005]. Neki od dostupnih podataka o predloženim mehanizmima preko kojih sastojci biljaka ostvaruju antimikrobnu aktivnost predstavljeni su u Tabeli 6 [Kovačević i Kundaković,2007].

Tabela 6. Mogući mehanizmi delovanja supstanci izolovanih iz biljaka na mikrobe

Klasa	Jedinjenje	Mehanizam delovanja
Jednostavni fenoli	Katehol	Lišavanje supstrata
	Epikatehin	Oštećenje membrane
Fenolne kiseline	Cimetna kiselina	
Hinon	Hipericin	Vezivanje za adhezin, kompleksiranje sa ćelijskizidom i inaktivacija enzima
Flavonoidi	Hrizin	Vezivanje za adhezin, kompleksiranje sa ćelijskim zidom i inaktivacija enzima
	Abisinon	Inaktivacija enzima Inhibicija HIV reverzne transkriptaze
Tanini	Elagnitanin	Vezuje se za proteine Vezuje se za adhezin Preuzima supstrat Kompleksira se sa ćelijskim zidom Oštećuje membranu

Pored uobičajenog skrininga antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata, shodno savremenim problemima i potrebama, rade se i određena specifična ispitivanja prirodnih proizvoda. Ispituje se aktivnost biljnih ekstrakata i sastojaka, između ostalog, na sojeve bakterija rezistentne na određene antibiotike. Ispitivani su ekstrakti nekoliko biljaka, eugenol, farnezol, benzojeva i cimetna kiselina. Najbolji rezultati su dobijeni sa ekstraktima ploda biljaka *Caryophyllus aromaticus* (karanfilić) i *Syzygium joabolanum* (inhibicija rasta testiranih sojeva mikroorganizama 57-64%). Rezistentni sojevi su bili još osetljiviji na delovanje ekstrakata (inhibicija rasta mikroba 83%). Takođe, primena ekstrakata plodova karanfilića i jabolana, kore nara i herbe timijana kombinovana sa antibioticima, dovela je do sinergističkog efekta i značajno umanjila rast rezistentnih sojeva mikroorganizama. Ovakva primena je bila naročito delotvorna kod *Pseudomonas aeruginosa* [Nascimento i sar., 2000].

Neki istraživači razvijaju ideju korišćenja nekoliko supstanci relativno slabe antimikrobne aktivnosti koje bi delovale sinergistički i rezultirale dobrim i snažnim antimikrobnim efektom. Ovakva ideja je preuzeta iz prirode i podražava odgovor biljaka na infekciju, produkcijom različitih odbrambenih supstanci [Lewis i sar., 2005].

Hemijske supstance izolovane iz biljaka, potvrđene antimikrobne aktivnosti, služe za hemijsku transformaciju u cilju dobijanja potentnijih i boljih antimikrobnih supstanci i lekova [Nikolić, 1998, 2003].

Tako su, na primer, sintetisani derivati katehina koji su na 3-OH bili supstituisani različitim alkil i aromatičnim radikalima. Potvrđeno je da derivati kod kojih je uveden supstituent sa 7-9 C atoma ispoljavaju bolje antivirusno (virus influence) delovanje u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Ovo ukazuje da primena ekstrakata zelenog čaja možda zaista može delovati profilaktički i predstavljati zaštitu od gripa ili nekih drugih infekcija [Song i sar., 2007]. Ispitivanje delovanja poznatih tradicionalnih lekovitih biljaka na bakterije i gljive koje su uzročnici infektivnih bolesti kože, takođe je predmet savremenih istraživanja [Ristić i sar., 2004; Weckesser i sar., 2007].

Vekovima se preparati koji sadrže flavonoide koriste kao glavni aktivni konstituenti preparata za lečenje bolesti [Havsteen, 1983]. Lekovita svojstva propolisa su pominjana još u Starom Zavetu, a prepisivao ga je i Hipokrat (460-377 p. n. e.) u Staroj Grčkoj za lečenje rana i čira. Smatra se da su za antimikrobne osobine propolisa odgovorni flavonoidi galangin i pinocembrin [Grange i sar., 1999].

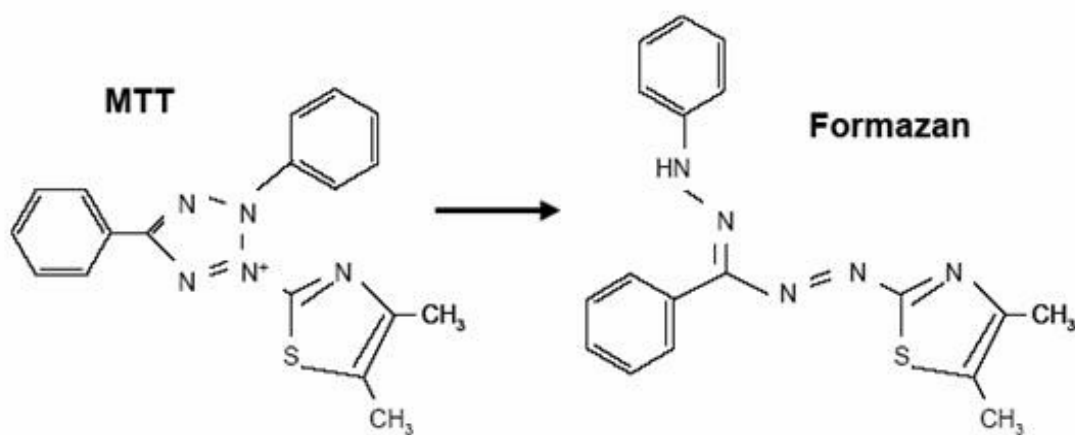
Utvrđeno je da se kondenzovani tanini vezuju za ćelijski zid bakterija preživara, sprečavajući rast i aktivnost proteaza [Jones i sar., 1994]. Iako su tanini poznati kao

antimikrobni agensi, postoje neke vrste bakterija koje mogu rasti na materijalu bogatom taninima [Scalbert, 1991], razvijanjem rezistencije u odnosu na antimikrobne komponente tanina.

Galna kiselina i njeni metil estri ispoljavaju jasan inhibitorski efekat na nekoliko veoma opasnih intestinalnih bakterija [Jones i sar., 1994], a za šest drugih jednostavnih fenolnih kiselina je utvrđeno da su aktivni protiv različitih bakterija i plesni [Aziz i sar., 1998]. Vanilinska i kafeinska kiselina u potpunosti inhibiraju rast α -toksina koji stvaraju *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Za antimikrobnu aktivnost meda utvrđeno je da su potencijalno značajne prisutne fenolne kiseline [Aziz i sar., 1998]. U literaturi su nađeni podaci o antiinflamatornom delovanju gaveza, ali ne i o antiimikrobnom delovanju vodenog ekstrakta korena gaveza.

2.10. Određivanje vijabilnosti i proliferacije ćelija

Laboratorijski standardni kolorimetrijski metod određivanja preživljavanja i proliferacije ćelija sisara je test u kojem se koristi žuta tetrazolijumska so MTT [3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolijum-bromid], koju metabolički aktivne ćelije redukuju pomoću enzima mitohondrijske suksinat dehidrogenaze, dajući ljubičasti formazanski proizvod (Slika 21).



Slika 21. Redukcija MTT-a do formazana

Redukcijom MTT-a do formazana se detektuje aktivnost enzima, a pošto je njegova aktivnost znak da su ćelije žive, MTT test se koristi i za određivanje citotoksičnosti različitih agenasa. Tetrazolijumske soli se u metabolički aktivnim ćelijama brzo redukuju do formazana. Povećanje ćelijske toksičnosti rezultuje metaboličkom disfunkcijom koja se ogleda opadanjem količine formazana u testu. Ovaj test, dakle, detektuje žive, a ne mrtve

ćelije, a generisani signal zavisi od stepena aktivnosti ćelija. Kolorimetrijske metode bazirane na redukciji tetrazolijumskih soli, koriste se i sa ciljem da se kvantifikuje ćelijska proliferacija.

S obzirom da su formazani intenzivno obojeni ove soli mogu biti kolorimetrijski reagens za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija [Žižak, 2012]. Glavne prednosti kolorimetrijskog određivanja supstanci su brzina, preciznost i odsustvo primene radioizotopa. Da bi se povećala rastvorljivost nerastvornog ljubičastog formazana, dodaje se solubilizirajući rastvor, obično dimetil sulfoksid (DMSO), acidifikovani etanolni ili propanolni rastvor ili rastvor deterdženta (natrijum lauril sulfata u razblaženoj hloridnoj kiselini), pri čemu formazan prelazi u obojeni rastvor. Apsorbancija ovog obojenog rastvora se meri na spektrofotometru (obično između 500 i 600 nm) ili ELISA čitaču [Živković, 2009].

Postoji niz metoda za određivanje preživljavanja ćelija, neke se baziraju na direktnom brojanju ćelija ili kolonija ćelija u uzorku, a neke su indirektne. Citotoksično dejstvo agenasa je direktno, kada se indukuje direktna smrt ćelije, a indirektno kada se indukuje reproduktivna ćelijska smrt, kada je ćelija živa, ali se ne razmnožava.

Indirektne metode mogu biti kolorimetrijske ili su bazirane na merenju intenziteta ugradnje radionuklida u biomakromolekule. Citotoksično dejstvo ispitivanih agenasa se procenjuje indirektnim putem preko određivanja preživljavanja ciljnih ćelija nakon njihovog rasta u prisustvu tih agenasa. Preživljavanje ćelija (S-engl. *Survival*) se definiše kao odnos broja preživelih ćelija u uzorku tretiranom ispitivanim agansom (NL) i broja ćelija u kontrolnom uzorku u kome su ćelije rasle samo u prisustvu hranljive podloge (NK). Obično se izražava u procentima (S %) i određuje pomoću jednačine 1.

$$S (\%) = (NL/NK) \cdot 100 \quad (1)$$

Iz dobijenih vrednosti određuje se procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanih jedinjenja kao mere intenziteta citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja koja je karakteristična za svako jedinjenje, IC50 vrednost. IC50 se definiše kao koncentracija koja snižava preživljavanja ciljnih ćelija na 50% u odnosu na kontrolni uzorak. IC50 je obrnuto srazmerna intenzitetu citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja. IC50 dobijena na osnovu izmerenih preživljavanja ćelija je mera i direktne i indirektne reproduktivne toksičnosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

Za ispitivanja je korišćen vazdušno-suvi koren gaveza (*Symphyti radix*) dobijen iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić". Koren je samleven u laboratorijskom dezintegratoru (laboratorijski električni mlin "BRAUN AROMATIC KSM2"). Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen je pomoću seta sita (Erweka, Nemačka) i jednačine 2:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right) \quad (2)$$

gde su: d - srednji prečnik čestica, mi - maseni procenat i-te frakcije (%) i di - srednji prečnik i-te frakcije.

3.1.1.1. Osnovna hemijska ispitivanja biljnog materijala

Kvalitet korena gaveza određen je osnovnim hemijskim ispitivanjima koja obuhvataju određivanje:

- gubitka sušenjem (vlage),
- ostatka posle žarenja (pepeo) i
- nerastvornog pepela (SiO_2) u razblaženoj hlorovodoničnoj kiselini

Određivanje gubitka sušenjem (vlage). Sadržaj vlage u korenu gaveza, koji je osušen prirodnim putem, određen je gravimetrisjkom postupkom prema *Ph. Jug.* IV. Sadržaj vlage je važan parametar za očuvanje kvaliteta droge jer su u suvom biljnom materijalu enzimski procesi i kontaminacija mikroorganizmima svedeni na minimum.

Određivanje ostatka posle žarenja (pepela). Pepeo predstavlja količinu neisparljivih mineralnih materija, koje se dobijaju posle potpunog sagorevanja droge. Sadržaj pepela u korenu gaveza određen je gravimetrijskim postupkom koji propisuje *Ph. Jug.* IV.

Određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO₂). Nerastvorljivi pepeo (SiO₂) u kiselini, predstavlja deo pepela koji se ne rastvara u razblaženoj hlorovodoničnoj kiselini. Nerastvorljivi deo pepela u kiselini iz korena gaveza određen je gravimetrijskim postupkom koji propisuje *Ph. Jug. IV*

3.1.2. Hemikalije

U eksperimentalnom delu rada korišćen je acetonitril, (HPLC-čistoće) (Merck-Darmstadt Germany); alantoin (2,5-diokso-4-imidazolidinil urea) (Merck-Darmstadt, Germany), ružmarinska kiselina, elaginska kiselina (Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD), 2-propanol (Fisher Scientific), MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid, (Carl Roth, Germany), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH radikal), rutin, aluminijum(III)-hlorid heksahidrat (Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD), koncentrovana azotna kiselina (Centrohem, Srbija) Folin Ciocalte reagens za fenole, Na₂CO₃ (Centrohem, Srbija).

Za izradu farmaceutskih oblika korišćene su sledeće hemikalije: Emulgade[®] SE (INCI Gliceril stearat, cetearet-20, cetearet-12, cetearil alkohol, cetil palmitat) (Cognis, Nemačka); Carbopol[®] Ultrez 10 (Noveon, USA); Cetil alkohol (Ph.Jug.V) (Comcen Srbija); Stearil alkohol (Ph.Jug.V) (Comcen, Srbija), Myglyol[®] 318 (Ph.Jug.V) (Comcen, Srbija), Propilenglikol (Ph.Jug.V) (SB Trade, Srbija). Za konzervisanje je korišćen natrijum-benzoat (Ph.Jug.V) (Centrohem, Srbija), a za okluziju natrium lauril sulfat (NaLS) (HPLC-čistoće) (Merck-Darmstadt Germany).

3.1.3. Kulture mikroorganizama

Za ispitivanje *in vitro* antibakterijske aktivnosti ekstrakta i standardnih supstanci korišćeni su sledeći kontrolni laboratorijski sojevi bakterija koji pripadaju American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA: gram-pozitivne bakterije, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), gram-negativne bakterije, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857), (ATCC 9027) i *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) i gljivice *Aspergillus niger* (ATCC 16404) i *Candida albicans* (ATCC 10231).

Kulture mikroorganizama, pohranjene u mikrobiološkoj laboratoriji PMF-a u Nišu na -20°C pod odgovarajućim uslovima, presejane su dva puta neposredno pre primene u mikrodilucijonom testu, kada su pripremljene i sveže suspenzije mikroorganizama.

Standardizovane suspenzije su pripremane ispiranjem mikroorganizama pomoću 0,9% rastvora NaCl sa kosog agara i razblaživanjem do odgovarajućeg broja ćelija, takođe fiziološkim rastvorom. Broj mikroorganizama određen je turbidimetrijski.

3.1.4. Ćelijske linije

Korišćene su dve sisarske ćelijske linije, epitelne ćelije tubula bubrega psa (MDCK) i fibroblasti potkožnog vezivnog tkiva miša (L929). Odabrane su ove ćelijske linije jer su to često korišćeni modeli za ispitivanja na epitelnim ćelijama i fibroblastima. Ćelije su kultivisane u medijumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; PAA Laboratories, Austria) sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS; PAA Laboratories, Austria), 2 mM L-glutamina (PAA Laboratories, Austria) i antibiotik-antimikotik rastvora (PAA Laboratories, Austria) u inkubatoru na 37⁰C u atmosferi koja je zasićena vlagom i koja sadži 5% CO₂. Ćelijama je medijum menjan na svaka 2 do 3 dana, a pasaža ćelija je rađena kada ćelije dostignu približno 80% konfluentnosti.

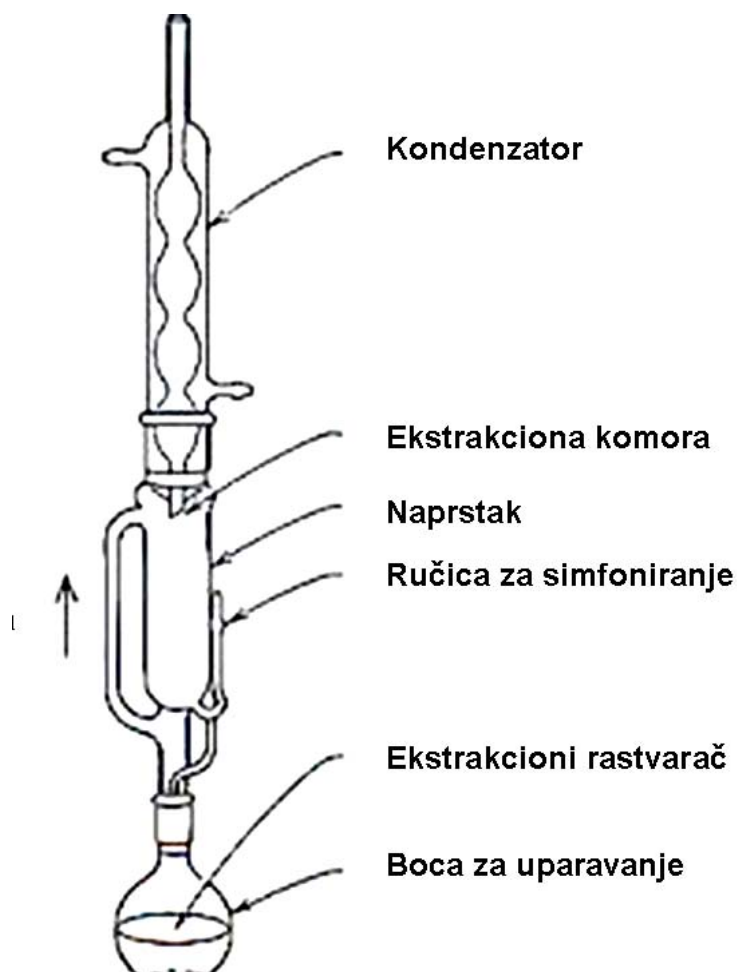
Ćelije su odlepljene sa dna posude u kojoj su rasle pomoću rastvora Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Austria) i centrifugirane na +4⁰C, 10 minuta na 1000 o/min. Nakon ispiranja i podešavanja odgovarajuće gustine, ćelije su posađene u sterilne ploče sa 96 bunarčića (Greiner Bio-One, Austria) i to 2x10⁴ ćelija/0,1cm³ medijuma u ispitivanjima vijabilnosti i 5x10³ ćelija/0,1cm³ medijuma u ispitivanjima proliferacije. Nakon 24 sata kultivacije ćelija dodato je po 0,1cm³ prethodno pripremljenih uzoraka. Kao pozitivna kontrola uzete su ćelije kojima je dodato samo 0,1cm³ medijuma koji je korišćen za razblaživanje ispitivanih uzoraka (vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda alantoina). Svaka koncentracija alantoina i vodenog ekstrakta gaveza je ispitivana u 4 do 8 ponavljanja, a u istom broju ponavljanja je stavljena i pozitivna kontrola. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim uzorcima 24 sata u istraživanjima vijabilnosti, odnosno 72 sata u istraživanjima proliferacije.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Ekstrakcija po Soxhlet-u je cirkulaciona metoda ekstrakcije. Izvodi se u Soxhlet-ovom aparatu. Rastvarač natapa biljni materijal i nakon dostizanja nivoa sifona, tečni ekstrakt biva presifoniran u prihvatni sud, gde se greje na temperaturi ključanja rastvarača. Pare rastvarača, kroz za to namenjenu cevčicu, dospevaju u kondenzator, gde se hlade, kondenzuju i kap po kap ponovo natapaju biljni materijal. Ceo proces se ponavlja više puta, odnosno do potpunog

iscrpljivanja biljne sirovine. Nakon završene ekstrakcije, dobijeni ekstrakt se koncentruje uparavanjem. Izgled aparature za ekstrakciju po Soxhlet-u dat je na Slici 22.



Slika 22. Aparatura za ekstrakciju po Soxhlet-u

3.2.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija u polaznom biljnom materijalu

Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (30g) je smešten u ekstrakcioni deo aparature po Soxhlet-u. U prihvatni sud je stavljeno 300 cm³ vode i vršena ekstrakcija na temperaturi ključanja u toku 6 sati. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na 50°C. Dobijeni ekstrakt je sušen u vakuum sušnici na 50°C do konstantne mase i izračunat sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija (q_0) u polaznom biljnom materijalu

3.2.1.2. Uticaj operativnih uslova na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina

Za ekstrakciju ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina iz korena gaveza primenjena je ekstrakcija po Soxhlet-u na temperaturi ključanja rastvarača.

Ekstrakcija korena gaveza podrazumevala je optimizaciju ekstrakcije vodom kao ekstragensom, koja je ujedno i najbolji rastvatač za alantoin, glavni farmakološki agens u korenu gaveza i dobijanje ekstrakta pri optimalnim uslovima ekstrakcije primenom Soxhlet metode.

Dobijanje vodenog ekstrakta iz korena gaveza obuhvata dve faze:

- optimizaciju procesa ekstrakcije usitnjenog korena gaveza i dobijanje optimalnih parametara ekstrakcije vodom i
- dobijanje vodenog ekstrakta korena gaveza pri optimalnim uslovima ekstrakcije.

U cilju određivanja optimalnih parametara ekstrakcije vodom metodom po Soxhlet-u iz korena gaveza ispitan je uticaj vremena ekstrakcije i hidromodula (odnos biljni materijal/rastvarač).

3.2.1.2.1. Uticaj vremena ekstrakcije na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina

Usitnjeni i homogenizovani biljni materijal (10g) je ekstrahovan vodom pri hidromodulu 1:10 m/v, u različitim vremenskim intervalima (60, 120, 180, 240 i 360 minuta) na temperaturi ključanja rastvarača.

3.2.1.2.2. Uticaj hidromodula na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina

Usitnjeni i homogenizovani biljni materijal je ekstrahovan vodom 240 minuta sa različitim hidromodulima (1:5, 1:6,5 i 1:15 m/v) na temperaturi ključanja rastvarača.

3.2.1.3. Kinetika ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija

Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (30g) je ekstrahovan Soxhlet ekstrakcijom vodom pri hidromodulu 1:10m/v na temperaturi ključanja rastvarača u zadatim vremenskim intervalima (15-240 minuta). Za određivanje prinosa ekstraktivnih materija (suvog ekstrakta) uzimano je po 2cm³ vodenog ekstrakta korena gaveza u zadatim vremenskim intervalima (15-

240 minuta), koji su preneti u posudu aparata (SCALTEC SMO 01, Scaltec Instruments, Germany). Sadržaj suvog ostatka u masi (% , ili g/100g b.m.), dobijen nakon sušenja na 105°C, očitao je na ekranu aparata. Prinos ekstraktivnih materija izračunava se na osnovu sadržaja suvog ostatka. Dobijeni ekstrakt prema optimalnim uslovima ekstrakcije je uparen do suva na vakuum uparivaču i sušen do konstantne mase na 50°C. Suvi ekstrakt je čuvan u dobro zatvorenim bocama na temperaturi od 4°C i dalje analiziran na sadržaj alantoina i drugih biološki važnih jedinjenja.

3.2.2. Ispitivanje hemijskog sastava vodenog ekstrakta korena gaveza

3.2.2.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

Tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom izvršeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje alantoina u vodenom ekstraktu korena gaveza. HPLC analiza uzoraka i standarda alantoina urađena je na tečnom hromatografu Agilent 1100 Series, Waldborn, Germany pri sledećim uslovima:

Kolona: Supelco, C18; 4. 6×250mm, 5 µm

Eluent: acetonitril:voda, 80:20v/v

Brzina protoka mobilne faze: 1cm³/min

Zapremina injektiranog uzorka: 20µl

Detekcija: detektor DAD Agilent 1200 Series

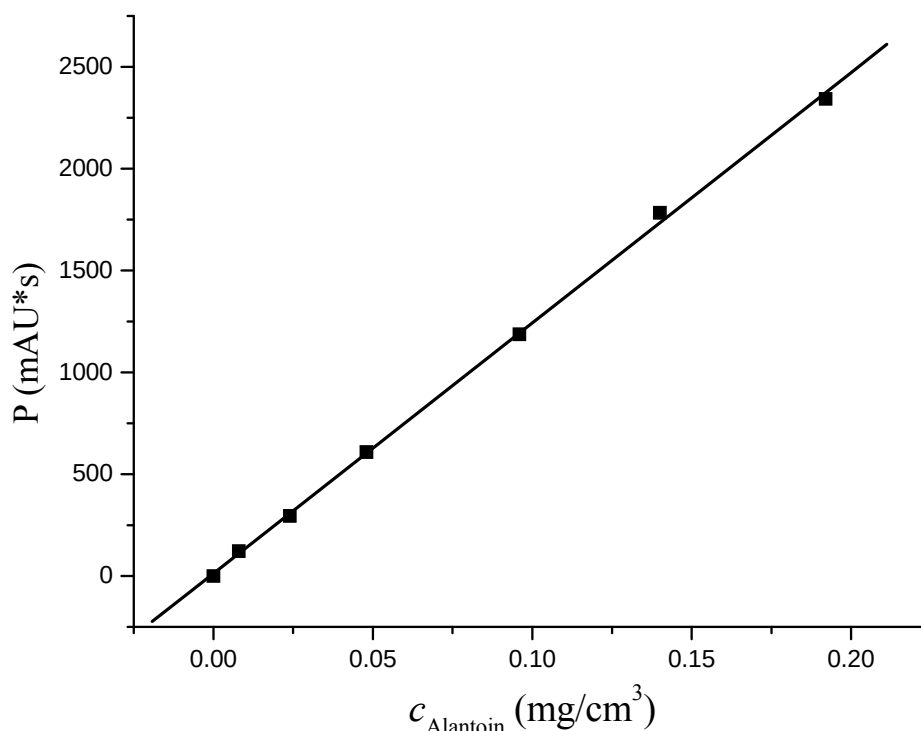
Talasna dužina: 214nm

Temperatura: 25°C

Kvalitativno i kvantitativno određivanje alantoina u ekstraktu vršeno je upotrebom standarda alantoina. Kalibraciona kriva za kvantitativno određivanje alantoina je konstruisana na osnovu serije rastvora standarda alantoina različitih koncentracija (0,008-0,192mg/cm³). Koncentracija alantoina se određuje na osnovu površine pika u HPLC hromatogramu. Kalibraciona kriva alantoina data je na Slici 23 kojoj odgovara jednačina 3 sa koeficijentom korelacije R²=0,9992.

$$P \text{ (mAU}\times\text{s)} = 12,87 + 12298,88 \times c \text{ (mg/cm}^3\text{)} \quad (3)$$

gde je: $P \text{ (mAU}\times\text{s)}$ - površina pika, $c \text{ (mg/cm}^3\text{)}$ - koncentracija alantoina.



Slika 23. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja alantoina HPLC metodom

3.2.2.2. UHPLC–DAD–HESI–MS analiza vodenog ekstrakta korena gaveza

Detekcija i kvantifikacija komponenata u vodenom ekstraktu korena gaveza izvršena je primenom metode tečne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (LC/MS).

Kombinacija tečne hromatografije visokog pritiska i masene spektrometrije pored dobrog razdvajanja i visoke osetljivosti omogućava i snimanje spektara pojedinačno razvojenih komponenti iz složenog uzorka čime se dobija obilje podataka o ispitivanom uzorku [Covey i sar., 1986; Dallugr i sar., 1997].

Na osnovu analize masenih pikova čiji je položaj u masenom spektru određen odnosom mase i naelektrisanja jona (m/e) mogu se identifikovati nepoznata jedinjenja određivanjem strukture njihovih karakterističnih fragmenata.

Svi eksperimenti su urađeni na *Thermo Scientific* tačno-hromatografskom sistemu visokih performansi (UHPLC) sastavljenom od kvaternerne pumpe sa degaserom, termostatirajuće kolone, autosemplera i DAD detektora (diode array detector), koji je bio povezan sa *Fleet Ion Trap* masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA). Softveri *Eskalibur* (verzija 2.1.0) i *LTQ Fleet* (verzija 2.7) su korišćeni za

kontrolu, obradu i analizu podataka. Razdvajanje je vršeno na *Hypersil gold C18* ($50 \times 2,1$ mm, $1,9 \mu\text{m}$) koloni proizvedenoj od strane *Thermo Fisher Scientific*.

UHPLC–DAD–HESI–MS analiza vodenog ekstrakta gaveza je izvedena u skladu sa metodom koja je bila razvijana od strane Kečkeša i njegovih saradnika [2013] sa izvesnim modifikacijama. Mobilna faza se sastojala od (A) vode + 0,1% mravlja kiselina i (B) acetonitrila.

Za hromatografsko razdvajanje korišćen je linearni gradijent na način koji je opisan u Tabeli 7. Zapremina injektiranja je bila $10 \mu\text{L}$, protok mobilne faze $0,35 \text{ cm}^3/\text{min}$, a razdvajanje jedinjenja je praćeno na talasnim dužinama od 272, 294, 308 i 360 nm . Svaki spektar je zabeležen u opsegu od 200-800nm.

Tabela 7. Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu

Vreme, min	Mobilna faza (A)	Mobilna faza (B)
0	90	10
2	80	20
4,5	10	90
4,8	10	90
4,9	90	10
12	90	10

Korišćena je elektrosprej jonizacija pri atmosferskom pritisku u pozitivnom i negativnom modu. Parametri HESI-izvora su bili sledeći: napon izvora $5,0 \text{ kV}$, napon kapilare 46 V , napon tube $85,00 \text{ V}$, temperatura kapilare 400°C , protok glavnog (*sheath*) i pomoćnog (*auxiliary*) gasa je bio 32 i 12 *au* respektivno. Identifikacija je izvršena na osnovu spektralnih karakteristika: PDA spektra, masenog spektra i MS fragmentacije.

3.2.2.3. Sadržaj ukupnih fenola u vodenom ekstraktu korena gaveza (Folin Ciocalteu metoda)

Sadržaj ukupnih fenola određen je u ekstraktu po proceduri Folin-Ciocalteu-a. Ekstrakt (1 cm^3) dobijen pod optimalnim uslovima ($0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$) ili standard galne kiseline ($25\text{-}500 \text{ mg}/\text{dm}^3$) prenešen je u normalni sud od 25 cm^3 i dodato 9 cm^3 destilovane vode. Slepa proba umesto ekstrakta sadrži 10 cm^3 destilovane vode. Na rastvor uzoraka dodat je Folin Ciocalteu reagens za fenole (1 cm^3), a zatim nakon 5 minuta i 10 cm^3 7% Na_2CO_3 . Smeša se energično meša. Nakon inkubacije (90 minuta) na sobnoj temperaturi smeši je izmerena absorbanca na

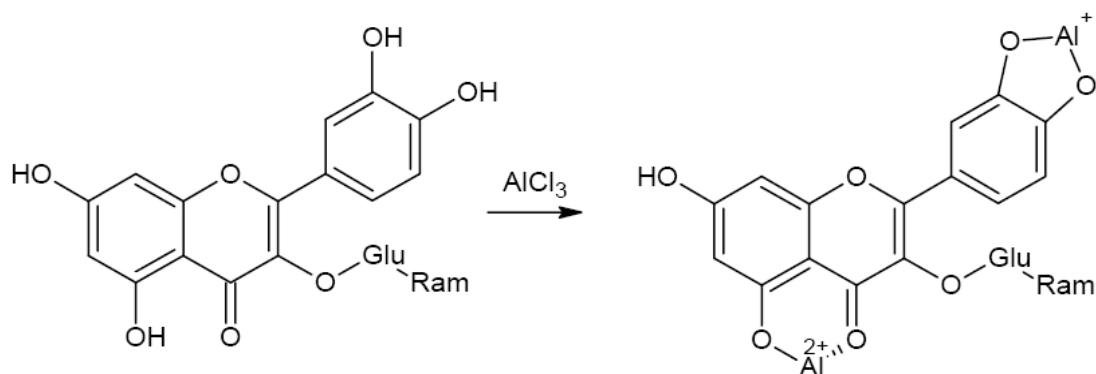
765 nm. Ukupni fenoli se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline mgGKE/1g suvog ekstrakta [Singelton i sar., 1999; Stanojević i sar., 2013] i određuju prema jednačini 4:

$$A_{765} = 0,431 \cdot c_{\text{GK}} - 9,33 \cdot 10^{-3}, R^2 = 0.9992 \quad (4)$$

gde je: A_{765} - apsorbanca galne kiseline na 765 nm, c_{GK} - koncentracija galne kiseline

3.2.2.4. Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza

Flavonoidi i flavon-glikozidi iz biljnog materijala imaju osobinu da sa metalima daju odgovarajuće komplekse. Naročito je važan kompleks koji gradi rutin sa aluminijum (III)-hloridom [Markham, 1989] čije formiranje je prikazano na Slici 24.



Slika 24. Struktura rutina i njegovog kompleksa sa aluminijumom

Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum (III)-hloridom [Markham, 1989; Lin J. -Y. i Tang C. -Y., 2007; Stanojević i sar., 2009]. U 2 cm³ ekstrakta ili standarda rutina (5-100mg/dm³) dodato je 0,1cm³ 10 % rastvora AlCl₃·6H₂O, 0,1cm³ 1M CH₃COOK i 2,8 cm³ destilovane vode. Posle inkubacije od 40 minuta na sobnoj temperaturi merena je apsorbanca na 415 nm (VARIAN UV-VIS Cary-100 Conc. Spectrophotometer). Slepna proba je destilovana voda. Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktu izražen je kao mg ekvivalenta rutina po g suvog ekstrakta (mg RE/g) i određen je na osnovu jednačine 5 čiji je koeficijent linearne korelacije $R^2 = 0,9991$.

$$A_{415} = 14,171 \cdot c_{\text{R}} + 4,61 \cdot 10^{-2} \quad (5)$$

gde je: A_{415} - apsorbanca rutina na 415 nm, c_{R} - koncentracija rutina

3.2.2.5. Određivanje sadržaja mikro- i makroelemenata ICP-OES metodom

Vodeni ekastrakt korena gaveza dobijen pod optimalnim uslovima ispitan je na sadržaj makro- i mikroelemenata na aparatu ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*, ARCOS FHE12, SPECTRO, Germany).

Optička emisiona spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES) je relativno nova metoda emisije spektrohemijske analize [Velimirović, 2013]. To je kombinacija izvora pobuđivanja sa spektrometrima. Izvor ima osobinu da svojom energijom dovede atome u stanja u kojima su sposobni da emituju zračenje. U tom smislu svaki izvor prilagođen za potrebe kvalitativne i kvantitativne spektrohemijske analize mora da obezbedi isparavanje uzorka kada je u tečnom ili čvrstom stanju, atomizaciju čestica pare na slobodne atome i pobuđivanje atoma. Kao izvor pobuđivanja se najčešće koristi induktivno spregnuta plazma, ICP (*Inductively Coupled Plasma*). To je jonizovani gas koji se zbog jedinstvenih osobina smatra posebnim agregatnim stanjem materije uz čvrsto, tečno i gasovito stanje. Slobodna naelektrisanja (katjoni i elektroni) čine plazmu električno provodljivom zbog čega ona snažno oseća uticaj elektromagnetnog polja. ICP-spektrometrija se uspešno koristi za analizu različitih uzoraka u rastvoru. Određivani elementi se po pravilu prevode u rastvor koji se u obliku aerosola uvodi u plazmu.

Kao noseći gas korišćen je Argon 5,0 (čistoće 99,999%). Pored uzoraka za analizu pripremljeni su i kalibracioni standardi. Za pripremu rastvora za kalibraciju korišćen je Multistandard IV multielementarni standardni rastvor (Merck), koji sadrži Al, As, B, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Ti, V i Zn u koncentracijama od 1000 ppm. Priprema standardnih rastvora za ispitivanje odabranih elemenata vršena je razblaživanjem Multistandarda IV, tako da su koncentracije standarda za izradu kalibracionih dijagrama bile u opsegu očekivanih koncentracija ispitivanih elemenata. U Tabeli 8 prikazane su odabrane talasne dužine detekcije za svaki element u ekstraktu gaveza, korelacioni koeficijent (R^2), limit detekcije (LD), kao i opseg linearnosti.

Tabela 8. Parametri kalibracione prave za određivane elemente: λ , R^2 , LD i opseg linearnosti

Naziv elementa	Talasne dužine za detekciju (nm)	Korelacioni koeficijent (R^2)	Limit detekcije ($\mu\text{g/L}$)	Opseg linearnosti (mg/L)
Ag	224,641	0,99993	0,39	0,015-12,00
	328,068	0,99995		0,000399-12,00
Al	167,078	0,99985	$7,6 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-5}$ -2,40
	394,401	0,99998		0,00155-12,00
B	182,641	0,99999	6,43	0,00737-12,00
	249,773	0,99999		0,00643-12,00
Ba	233,527	0,99995	0,183	0,000183-12,00
	190,21	0,99991		0,00353-12,00
Bi	223,061	0,99996	3,53	0,0368-12,00
	183,801	0,99995		1,6-480,00
Ca	396,847	0,99946	2,14	0,00214-2,41
	214,438	0,99994		0,000127-12,00
Cd	228,616	0,99980	0,327	0,000327-12,00
Co	283,563	0,99998	0,435	0,000435-12,00
Cu	224,700	0,99999	0,259	0,000907-12,00
	324,754	0,99999		0,000259-12,00
Fe	259,941	0,99997	0,118	0,000118-12,00
Ga	417,206	0,99994	1,7	0,0017-12,00
In	325,609	1,00000	4	0,004-12,00
K	404,721	0,99998	0,378	0,798-300,00
	766,491	0,99999		0,000378-1,20

Nastavak Tabele 8.

Naziv elementa	Talasne dužine za detekciju (nm)	Korelacioni koeficijent (R^2)	Limit detekcije ($\mu\text{g/L}$)	Opseg linearnosti (mg/L)
Li	323,261	1,00000	$5,75 \times 10^{-2}$	0,0798-12,00
	670,780	0,99997		$5,75 \times 10^{-5}$ -1,20
Mg	279,553	0,99997	0,115	0,000115-6,04
	285,213	0,9999		4,03-120,00
Mn	257,611	0,99992	$3,57 \times 10^{-2}$	$3,57 \times 10^{-5}$ -12,00
Na	330,237	0,99994	4,75	7,98-480,00
	598,592	0,99989		0,00475-12,00
Ni	231,604	0,99994	0,474	0,000474-12,00
Pb	220,353	0,99998	1,78	0,00178-12,00
Sr	407,771	0,99998	$6,23 \times 10^{-3}$	$6,23 \times 10^{-6}$ -2,41
Tl	190,864	0,99998	1,72	0,00172-12,00
Zn	213,856	0,99997	$8,2 \times 10^{-2}$	$8,2 \times 10^{-5}$ -12,00

Priprema uzoraka. Ekstrakt gaveza pripremljen je postupkom mokre digestije tako što je 1cm^3 dobijenog vodenog ekstrakta korena gaveza preliiven sa 10cm^3 koncentrovane azotne kiseline. Nakon toga vršeno je zagrevanje smeše na vodenom kupatilu do obezbojavanja rastvora i prestanka izdvajanja para. Dobijeni rastvori su filtrirani kroz kvantitativni filter papir i filtrati prebačeni u normalne sudove od 100 cm^3 . Za razblaživanje uzoraka korišćena je destilovana voda prečišćena od strane Fisher Chemical (HPLC grade). Nakon pripreme uzorci su podvrgnuti ICP-OES analizi.

Analiza uzoraka. Sva merenja su vršena na ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*, ARCOS FHE12, SPECTRO, Germany), metodom kvantitativne analize, u skladu sa uputstvima proizvođača. Radni uslovi ICP-OES instrumenta i parametri za određivanje koncentracije odabranih elemenata su dati u Tabeli 9, a u Tabeli 10 emisije linije elemenata.

Tabela 9. Operativni uslovi za ICP-OES

Snaga plazme (W)	1400
Protok gasa (L/min)	
Coolant	13
Auxiliary	0,80
Tip nebulajzera	Cross flow
Protok nebulajzera (L/min)	0,95
Brzina pumpe (rpm)	30
Stabilizaciono vreme (s)	0
Broj proba za svako merenje	3
Pravac posmatranja plazme	aksijalni

Priprema standardnih rastvora za ispitivanje odabranih elemenata vršena je razblaživanjem Multistandarda IV, tako da su koncentracije standarda za izradu kalibracionih dijagrama bile u opsegu očekivanih koncentracija ispitivanih elemenata.

Tabela 10. Emisione linije

Element	Talasne dužine za detekciju (nm)
Ag	328,068
	224,641
Al	167,078
	394,401
Ar	430,010
B	249,773
	182,641
Ba	233,527
Bi	223,061
	190,241
Ca	396,847
	183,801
Cd	214,438
Co	228,616

NastavakTabele 10.

Cr	283,563
Cu	324,754
	224,700
Fe	259,941
Ga	417,206
In	325,609
K	766,491
	404,721
Li	670,780
	323,261
Mg	279,553
	285,213
Mn	257,611
Na	598,592
	330,237
Ni	231,604
Pb	220,353
Sr	407,771
Tl	190,864
Zn	213,856

3.2.3. Izrada gelova i kremova

Za izradu kremova primenjen je postupak emulgovanja toplo/toplo gde je vodena faza (natrijum benzoat, voda) zagrejana na 75°C i polako dodavana u masnu fazu (cetil alkohol, stearil alkohol, Myglyol[®]318) zagrejanu na 70°C u kojoj se nalazi i mešani emulgator (Emulgade SE[®]). Sadržaj se meša na laboratorijskoj mešalici (IKA[®]-WERKE RW 16 basic) sa propellerskim mešačem brzinom 800o/min do potpunog emulgovanja na temperaturi od 70°C. Nakon emulgovanja nastavljeno je sa homogenizacijom, mešanjem brzinom od 500 o/min do hlađenja na sobnu temperaturu kada je u ovako pripremljeni nosač (emulzija U/V) inkorporisana propilenglikolna disperzija suvog ekstrakta gaveza (uzorak A₅), propilenglikolni rastvor alantoina (uzorak A₃) i propilenglikol (uzorak A₁-placebo). Sastav pripremljenih kremova (A₁, A₃, A₅) prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 11. Sastav izrađenih kremova (količina data u gramima)

Sastojci	Formulacija		
	A ₁	A ₃	A ₅
Alantoin	/	0,10	/
Ekstrakt gaveza (suvi)	/	/	1,12
Emulgade SE [®]	5,50	5,50	5,50
Cetil alkohol	2,00	2,00	2,00
Stearil alkohol	2,00	2,00	2,00
Myglyol [®] 318	16,00	16,00	16,00
Natrijum-benzoat	0,15	0,15	0,15
Propilenglikol	5,00	5,00	5,00
Prečišćena voda do	100,00	100,00	100,00

Gelovi su izrađeni tako što je u vodenu disperziju 1% Carbopol[®] Ultrez 10 koja je hidratizovala deset minuta dodavan 10% rastvor natrijum hidroksida, a zatim disperzija homogenizovana na mešalici sa propelerskim mešačem brzinom od 500 o/min uz dodatak konzervansa natrijum benzoata nakon čega su dodavani propilenglikol (uzorak A₂-placebo), rastvor alantoina u propilenglikolu (uzorak A₄) i disperzija suvog ekstrakta u propilenglikolu (uzorak A₆). Sastav izrađenih gela (A₂, A₄, A₆) prikazan je u Tabeli 12.

Tabela 12. Sastav izrađenih gela

Sastojci	Formulacija		
	A ₂	A ₄	A ₆
Alantoin	/	0,10	/
Ekstrakt gaveza (suvi)	/	/	1,12
Carbopol [®] Ultrez 10	1,00	1,00	1,00
Propilenglikol	5,00	5,00	5,00
Natrijum-hidroksid, rastvor 10%	4,00	4,00	4,00
Natrijum-benzoat	0,15	0,15	0,15
Prečišćena voda do	100,00	100,00	100,00

Na osnovu sadržaja alantoina u ekstraktu koji je određen HPLC metodom računat je sadržaj alantoina u uzorcima A₃, A₄, A₅, A₆ i iznosi 0,1% [Savić i sar., 2012].

3.2.4. Karakterizacija polučvrstih podloga tipa kremova polarizacionom mikroskopijom

Polarizaciona mikroskopija uzoraka sprovedena je pod uveličanjem 400 puta u svetlosnom polju, kao i između ukrštenih polarizatora i analizatora uz primenu λ -pločice [mikroskop LEICA DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka]. Mikrografije uzoraka A₁, A₃ i A₅ su snimljene digitalnom kamerom [LEICA DFC425, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka].

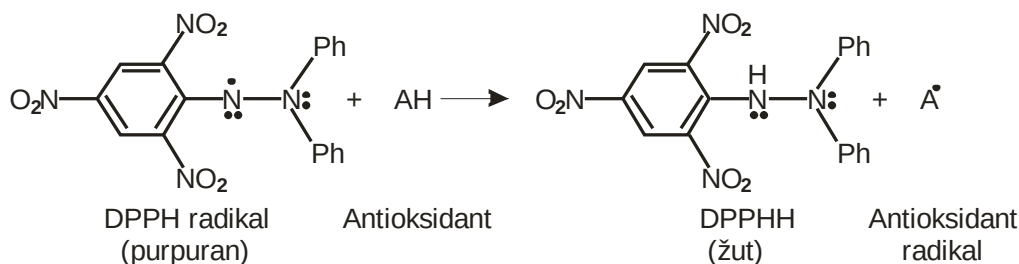
Za izradu kremova (uzorci A₁, A₃, A₅) korišćen je mešani emulgator odnosno emulgujući vosak koji se sastoji od masnih alkohola (cetil i stearyl) i nejonskog PAM (površinski aktivnog emulgatora, zaštićenog imena Emulgade SE[®]). Stabilizacija emulzionih sistema pomoću mešanih emulgatora [Barry i Rowe, 1989; Eccleston 1997, 2000, 2001, 2004; Junginger, 1997], kao što je slučaj u ovom eksperimentu, objašnjava se teorijom gelske mreže. Utvrđeno je da je za stabilnost emulzija stabilisanim navedenim emulgatorima odgovorno formiranje specifičnih lamelarnih faza, (tečno kristalnih i gel), koje su u stanju da inkorporiraju velike količine vode. Tečno-kristalne faze (TK) pokazuju karakteristike i tečnog i čvrstog agregatnog stanja i nazivaju se mezofaze. Lamelarna tečno-kristalna faza (LTK) pokazuje svojstvo dvostrukog prelamanja polarizacione svetlosti.

Posmatranjem ovih sistema pomoću polarizacionog mikroskopa sa postavljenom dodatnom λ -pločicom koja prelama svetlost, vide se teksture obojene u žutu, tirkiznu i ružičastu boju. Ova vrsta mikroskopije koristi se u svrhu vizuelizacije i karakterizacije faze tečnih kristala u emulzijama [Tasić-Kostov, 2013].

3.2.5. Ispitivanja farmakoloških aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza

3.2.5.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza, standarda alantoina, ružmarinske i elaginske kiseline određena je primenom DPPH metode. DPPH metod se zasniva na sposobnosti DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala da primi od donora elektron ili vodonik pri čemu prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik. Reakciju karakteriše promena intenzivno ljubičaste boje rastvora DPPH radikala u žutu koja potiče od DPPH-H, što se spektrofotometrijski prati preko pada apsorbance na 517nm [Choi i sar., 2002; Aquino i sar., 2002; Sanchez-Moreno i sar., 2002]. Reakcija DPPH radikala sa antioksidantom prikazana je na slici 25.



Slika 25. Reakcija DPPH radikala i antioksidanta

Suv ekstrakt gaveza je rastvoren u etanolu i napravljena serija etanolnih rastvora različite koncentracije (0,0032-0,412mg/cm³). Etanolni rastvor DPPH radikala (1cm³, 300 μmol rastvor (3×10⁻⁴ mol/dm³)) je dodat u po 2,5 cm³ ekstrakata različitih koncentracija. Ovaj postupak radi se u dve probe. Jednoj seriji uzorka odmah se meri apsorbanca na 517nm, druga serija uzoraka je inkubirana na sobnoj temperaturi, u mraku, 20 min i nakon inkubacije meri apsorbanca na istoj talasnoj dužini. Apsorbanca na 517 nm je određena i za etanolni rastvor DPPH radikala razblaženog u navedenom odnosu (1cm³ DPPH radikala date koncentracije kome je dodato 2,5 cm³ etanola) i za ekstrakt pre tretiranja DPPH radikalom (2,5 cm³ ekstrakta kome je dodat 1cm³ etanola). Za slepu probu se uzima etanol.

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci (kontrola, uzorak i blank) računa se kapacitet neutralisanja DPPH radikala (%) u ispitivanim ekstraktima prema jednačini 6 [Cvetković i Marković, 2008; Stanojević i sar., 2008; Stanojević i sar., 2013].

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right] \quad (6)$$

gde su:

A_U = apsorbanca „uzorka“ na 517nm. „Uzorak“ etanolni rastvor ekstrakta tretiran rastvorom DPPH radikala.

A_B = apsorbancija „blank-a“ na 517nm. „Blank“ – etanolni rastvor ekstrakta koji nije tretiran rastvorom DPPH radikala.

A_K = apsorbancija „kontrole“ na 517nm. „Kontrola“ – etanolni rastvor DPPH radikala (razblažen u odnosu 1cm³ DPPH radikala koncentracije 3×10⁻⁴mol/dm³ kome je dodato 2,5cm³ etanola).

Apsorbanca uzoraka merena je na UV-VIS spektrofotometru VARIAN Cary-100 Conc. Spectrophotometer.

Uporedo sa ispitivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakta ispitivana je i antioksidativna aktivnost čistog alantoina (0,0035-0,1mg/cm³), ruzmarinske kiseline (0,0035-

0,1mg/cm³), elaginske kiseline (0,0035-0,1mg/cm³) i butil hidroksi toluola (0,0035-0,2mg/cm³).

3.2.5.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza, alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline ispitivana je primenom mikrodilucione metode. Postupak je urađen na mikrotitarskim pločama sa 96 konusnih udubljenja (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, 2003). Suspenzija inokulirana bakterijskim sojevima pripremljena je od kultura odgovarajućih mikroorganizama starih jedan dan, a broj kolonija kultura u suspenziji podešen je na 0,5 McFarland-ovog (kolonija bakterijskih mikroorganizama $2,0 \times 10^6$ CFU/cm³ i spora gljivica $2,0 \times 10^5$) standarda turbidimetrijski. Sterilna voda upotrebljena je za rastvaranje i za razblaživanje uzoraka do početne koncentracije alantoina od 10 mg/cm³, ruzmarinske kiseline 10 mg/cm³, elaginske kiseline 5 mg/cm³ i početne koncentracije ekstrakta od 40 mg/cm³. Koncentracija ispitivanih uzoraka (nastalih serijom dvostrukih razblaženja *in situ*) bila je u opsegu od $1,1 \times 10^{-6}$ do 5 mg/cm³ vodeni rastvor elaginske kiseline, $2,2 \times 10^{-6}$ do 10 mg/cm³ za vodeni rastvor alantoina i ruzmarinske kiseline i $1,96 \times 10^{-2}$ do 40 mg/cm³ za vodeni rastvor vodenog ekstrakta gaveza. Dve kolone u svakoj ploči korišćene su kao kontrolne. Jedna kolona je bila pozitivna, i ona je sadržala antibiotik širokog spektra dejstva (Doksiciklin, serija razblaženja 50–0,02 µg/cm³). Druga kolona sadržala je rastvarač (sterilna voda). Rast mikroorganizama praćen je dodatkom 10 µl resazurina (BHD Laboratory Supplies) kao indikatora (pripremljenog rastvaranjem tablete od 270 mg u 40 cm³ sterilne vode) u svako udubljenje na inokulisanoj mikrotitarskog ploči ispunjenoj uzorcima koji se testiraju. Ploče su inkubirane na 37°C tokom 24 sata za bakterije, odnosno na 28°C tokom 48 sti za gljivice. Po isteku vremena za inkubiranje, ploče su izvađene, a zatim je vizuelno određivana vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) na osnovu promene boje indikatora. Promena boje iz ljubičaste u roze, ili potpuno obezbojavanje smatra se pozitivnim rezultatom. Najniža koncentracija gde je došlo do promene boje (obezbojavanja) beležena je kao MIC vrednost.

Minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija (MBC/MFC) određena je zasejavanjem sadržaja iz svakog udubljenja mikrotitarske ploče u kome je uočena opisana promena boje indikatora na sterilne podloge od hranljivog agara pripremljene u sterilnim petri šoljama. Petri šolje su inkubirane na 37°C tokom 24 sata (bakterije), odnosno na 28°C tokom 48 sati (gljivice). Nakon inkubacije minimalna baktericidna-fungicidna koncentracija

supstance procenjavana je kao ona gde je došlo do izostanka rasta 99,9% ćelija početnog inokuluma. Svi testovi su ponovljeni tri puta.

Najšire prihvaćena definicija za MIC je - *najniža koncentracija koja inhibiše vidljivi rast testiranih sojeva mikroorganizama*, a za MBC je - *koncentracija koja ubija više od 99,9% ćelija početnog inokuluma* (dobija se na osnovu broja poraslih kolonija nakon subkultivacije na pločastom agaru) (NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards). Epruveta sa najmanjom količinom supstance u kojoj nema zamućenja, odnosno porasta ispitivanog mikroorganizma, pokazuje minimalnu koncentraciju supstance koja deluje na mikroorganizam i naziva se *minimalna inhibitorna koncentracija* (MIC). Da bi se odredila minimalna mikrobicidna koncentracija potrebno je da se sadržaj poslednje 4 epruvete, u kojima nema zamućenja, zaseje na čvrstu hranljivu podlogu u petri šolji. Na ploči, na kojoj ima manje od 99,9% porasta kolonija ispitivanog mikroorganizma posle 24 sata inkubacije, koncentracija supstance je mikrobicidna i naziva se *minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija* (MBC/MFC).

3.2.5.3. Vijabilnost i proliferacija ćelijskih linija MDCK I L929

Za određivanja efekata na vijabilnost i proliferaciju ćelija korišćen je vodeni ekstrakt korena gaveza (*Symphytum officinale* L.) dobijen pod optimalnim uslovima Soxhlet ekstrakcijom i alantoin kao standard. Suvi vodeni ekstrakt gaveza rastvoren je u medijumu i ispitivan u koncentracijama: $10\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $40\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $400\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i $1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Standard alantoina je rastvoren u medijumu i ispitivan u koncentracijama: $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $4\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $40\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Sadržaj alantoina u ukupnom ekstraktu, dobijenom pod optimalnim uslovima ekstrakcije, iznosi 8,90g/100g suvog ekstrakta i određen je HPLC metodom [Savić i sar., 2012].

Vodeni ekstrakt korena gaveza i standard alantoina ispitivani su na 2 ćelijske linije, epitelnim ćelijama tubula bubrega psa (MDCK) i fibroblastima miša (L929).

Ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama ekstrakta i alantoina 24 sata, za ispitivanja vijabilnosti/citotoksičnosti i 72 sata, za ispitivanja proliferacije/citostatičnosti.

Nakon završenog perioda inkubacije za obe ćelijske linije urađen je MTT test [Hamideh Ghodrati Azadi i sar., 2008].

MTT test se bazira na redukciji tetrazolijumske soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT), od strane mitohondrijalnih dehidrogenaza metabolički aktivnih ćelija do formazana prema reakciji datoj na Slici 21. U vodenoj sredini dobijaju se ljubičasti kristali formazana.

Nakon inkubacije ćelija sa ispitivanim uzorcima u testu proliferacije i vijabilnosti, ćelije su isprane fosfatnim puferom, zatim je dodato po 0,1 cm³ MTT rastvora koncentracije 1 mg/cm³. Ćelije su inkubirane sa rastvorom MTT-a 3 sata, a zatim su formirani kristali formazana rastvoreni dodatkom 0,1 cm³ 2-propanola. Apsorbanca rastvora formazana merena je spektrofotometrijski na *ELISA plate Reader*-u na talasnoj dužini od 540 nm.

Srednja vrednost apsorbance računata je za svaku ispitivanu koncentraciju alantoina i vodenog ekstrakta korena gaveza kao i za negativnu kontrolu. Procenat od kontrole je izračunat prema jednačini 7.

$$\% \text{ od kontrole} = \frac{\text{srednja vrednost apsorbance ispitivane koncentracije}}{\text{srednja vrednost apsorbance kontrole}} \cdot 100 \quad (7)$$

Za sve ispitivane koncentracije rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na negativnu kontrolu za koju je uzeta vrednost 100%. Određene su vrednosti standardne devijacije (SD) i koeficijenta varijacije (CV), a za statistički značajne vrednosti uzimane su one za koje je $p < 0,05$.

Kvantitativne promene ćelijske vijabilnosti predstavljene su kao efekti necitotoksičnosti, ako je više od 90% vijabilnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu, blago citotoksični, ako je 60-90% vijabilnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu, umereno citotoksični, ako je 30-60% vijabilnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu i ozbiljno citotoksični, ako je manje od 30% vijabilnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu. Vijabilnost ćelija u kontroli je predstavljena kao 100%. Kvantitativne promene ćelijske proliferacije predstavljene su kao necitostatične, ako je proliferativnost veća od 90% u odnosu na negativnu kontrolu, blago citostatični, ako je proliferativnost 60-90% u odnosu na negativnu kontrolu, umereno citostatični, ako je proliferativnost 30-60% u odnosu na negativnu kontrolu i ozbiljno citostatični, ako je proliferativnost manja od 30% u odnosu na negativnu kontrolu. Proliferativnost ćelija u kontroli predstavljena je kao 100%.

3.2.5.4. Antiiritantna aktivnost

Istraživanje je dizajnirano da proceni i uporedi efekte kremova i gelova sa ekstraktom gaveza i alantoinom na veštački izazvanu iritaciju ljudske kože neinvazivnim merenjem biofizičkih parametara. Merena su četiri parametra: električna kapacitivnost (EC) pomoću sonde *Corneometer*® CM 825 koji kvantifikuje hidrataciju u *stratum corneum*-u, eritema indeks (EI) pomoću sonde *Mexameter*® MX 18 koja kvantifikuje eritem i transepidermalni gubitak vlage (TEWL) kao parametar promene barijerne funkcije kože (sonda *Tewameter*®).

TM 300). Mereni su bazalni parametri, a zatim parametri posle aplikacije vodenog rastvora natrijum lauril sulfata (NaLS) koncentracije 12% koji je izazivač iritacije. Iritirana koža je tretirana uzorcima (A_1 - A_6) da bi se pratila i upoređivala promena iritacije zavisno od uticaja koje aktivne komponente u formulacijama ispoljavaju na kožu [Araujo i sar., 2012, Tupker i sar., 1997; Takiwaki i sar., 1995; Aramaki i sar., 2001].

Merenja su izvršena na trinaest dobrovoljaca mlađeg životnog doba, posle dobijanja saglasnosti Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu broj 01-9002-7. Iritacija je izazvana na tri mesta leve i tri mesta desne podlaktice na sledeći način: 60 μ l 12% vodenog rastvora NaLS pipetirano je na komad filter papira (3cm $\times$ 3cm) koji je prilepljen na kožu i prekrivan Parafilmom[®] da bi se izazvala okluzija. Okluzija traje šest sati posle čega se iritaciono sredstvo uklanja [Savić i sar., 2010; Tupker i sar., 1997; Weltfriend i sar., 1996].

Dvadeset četiri sata posle okluzije mereni su parametri, nakon čega su ispitanicima podeljeni uzorci (placebo kremovi i gelovi, kremovi i gelovi sa ekstraktom korena gaveza i sa standardom alantoina, sastav dat u tabelama 11 i 12) koji su aplikovani ujutru i uveče po sledećem rasporedu: leva ruka na tri iritirana mesta sa uzorcima A_1 , A_2 , A_3 , a desna ruka sa uzorcima A_4 , A_5 i A_6 . Merenja su vršena tri i sedam dana nakon aplikacije preparata [Arsić i sar., 2012; Almeida i sar., 2008].

Podaci su prikazani u vidu apsolutnih i relativnih brojeva. Za upoređivanje dobijenih prosečnih vrednosti u ponovljenim merenjima korišćen je General Linear Model za ponovljena merenja. Statistička hipoteza testirana je na nivou značajnosti za rizik od $\alpha = 0,05$. Analiza podataka je urađena u programskom paketu SPSS 16.0.

Parametri su izraženi kao apsolutne promene u odnosu na početne-bazalne vrednosti u različitim vremenskim intervalima (dvadeset četiri sata, tri i sedam dana nakon aplikacije uzoraka). Značajne razlike su obeležene sa **a** i to su statistički značajne promene apsolutnih vrednosti parametara posle tri dana aplikacije u odnosu na vrednosti 24 sata nakon iritacije, **b** je statistički podatak za sedam dana nakon aplikacije prema vrednostima 24 sata od iritacije i **c** je statistički podatak za sedam dana u odnosu na tri dana nakon aplikacije uzoraka.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Ispitivanje kvaliteta polaznog biljnog materijala

Kvalitet ispitivane droge, korena gaveza, određen je primenom metoda osnovnih hemijskih ispitivanja koje obuhvataju određivanje sadržaja vlage, pepela i nerastvornog pepela (SiO_2) u razblaženoj kiselini. S obzirom da je veličina čestica biljnog materijala važna tehnološka karakteristika za dalja ispitivanja, pre svega za ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja, koren gaveza je usitnjen metodom mehaničkog usitnjavanja (mlevenjem u mlinu) do finog praška, a veličina čestica određena je analizom sejanja kroz odgovarajuća sita. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u Tabeli 13.

Tabela 13. Osnovni parametri ispitivanja kvaliteta i srednji prečnik čestica korena gaveza

Droga	Sadržaj vlage, (%, m/m)	Pepeo, (%, m/m)	SiO_2 , (%)	Srednji prečnik čestica, (mm)
Koren gaveza	8,54%	10,68%	28,79%	0,25

Na osnovu dobijenih vrednosti za osnovne ispitivane parametre, kao i stepen usitnjenosti, može se zaključiti da je biljna sirovina odgovarajućeg kvaliteta i da se on nalazi u granicama propisanim Farmakopejom (*Ph. Jug.* IV).

4.2. Optimizacija procesa ekstrakcije

Radi određivanja najpogodnijih uslova za ekstrakciju korena gaveza analizirano je više parametara. Kako je praktično važno uvrstiti što veći broj parametara koji utiču na ekstrakciju, bilo je neophodno odabrati one koji imaju najveći uticaj na proces ekstrakcije alantoina, heterocikličnog derivata purina, nosioca glavnih farmakoloških aktivnosti korena gaveza koji je neophodan za dalju pripremu preparata za topikalnu primenu. Imajući u vidu fizičke karakteristike alantoina, kao pogodan ekstragens odabrana je voda u kojoj je najviše rastvoran (0,5%) i to na temperaturi ključanja kada se dodatno rastvorljivost povećava, pri čemu je očuvana njegova stabilnost (stabilan je na 80°C uz duže zagrevanje). Voda kao ekstragens je pogodna i

zbog pH sredine (pH=7), što obezbeđuje takođe stabilnost alantoinu (stabilan je u opsegu pH=3-8). Kao pogodan metod za ekstrakciju primenjena je ekstrakcija po Soxhlet-u.

Pored ovih parametara, koji su odabrani na osnovu fizičkih karakteristika alantoina, potrebno je odrediti vreme ekstrakcije i odnos biljni materijal:rastvarač (hidromodul) za ekstrakciju alantoina iz korena gaveza.

4.2.1. Uticaj vremena ekstrakcije i hidromodula na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina u ekstraktima

Sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina ispitivan je za odnos biljni materijal:rastvarač 1:10m/v, primenom Soxhlet ekstrakcije. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj alantoina u ekstraktima određen HPLC metodom i prinos ukupnih ekstraktivnih materija (mg/cm³) (hidromodul 1:10m/v)

Vreme ekstrakcije, min	Ukupne ekstraktivne materije, mg/cm³	Alantoin, mg/cm³
60	2,8	0,175
120	4,3	0,306
180	5,8	0,448
240	6,2	0,552
360	6,3	0,567

Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da sa porastom vremena ekstrakcije raste prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina. Nakon vremena ekstrakcije od 240 minuta do 360 minuta sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija se neznatno povećava (za oko 1,6%). Sa povećanjem vremena ekstrakcije od 240 do 360 minuta takođe i sadržaj alantoina u dobijenim ekstraktima neznatno raste (za oko 2,5%). Povećanje prinosa ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaja alantoina na 360 minuta je neznatan, a utrošak energije je znatno povećan, pa je kao optimalno vreme ekstrakcije uzeto vreme od 240 minuta.

Uticaj hidromodula na prinos ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaj alantoina za optimalno vreme ekstrakcije (240 min) prikazan je u Tabeli 15.

Tabela 15. Uticaj hidromodula na sadržaj alantoina i prinos ukupnih ekstraktivnih materija (vreme ekstrakcije 240 min)

Hidromodul, m/v	Ukupne ekstraktivne materije		Alantoin	
	mg/cm³	g/100 g b.m.	mg/cm³	g/100g s.e.
1/5	15,24	7,62	0,511	3,351
1/6,5	9,44	6,15	0,333	3,534
1/10	6,20	6,20	0,552	8,910
1/15	7,52	11,28	0,641	8,510

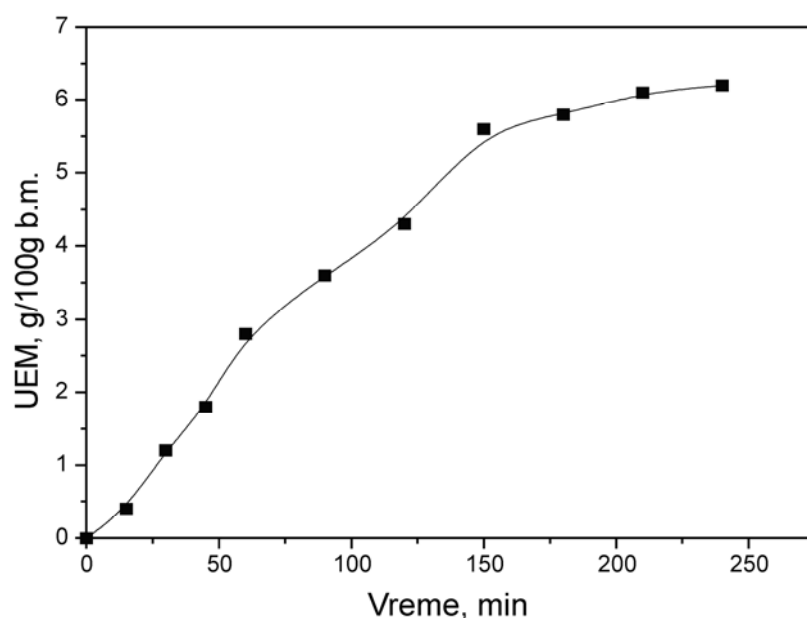
Rezultati prikazani u Tabeli 15 pokazuju da sa porastom odnosa biljni materijal/rastvarač nema pravilnog povećanja sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija računatih po cm³ ekstrakta i po 100g biljnog materijala. Sa povećanjem hidromodula od 1/5m/v do 1/10m/v koncentracija ukupnih ekstraktivnih materija (mg/cm³) opada, što je i očekivano, jer se povećava zapremina rastvarača. Međutim, pri hidromodulu 1/15m/v umesto smanjenja koncentracije ukupnih ekstraktivnih materija zbog povećanja količine rastvarača dolazi do povećanja koncentracije ukupnih ekstraktivnih materija (7,52 mg/cm³), što se može povezati sa formiranjem omotača od sluzi izolovanih iz biljnog materijala na površini čaure. Povećana zapremina rastvarača olakšava difuziju ukupnih ekstraktivnih materija kroz formirani sloj sluzi, što najverovatnije dovodi do povećanja koncentracije ukupnih ekstraktivnih materija pri odnosu 1/15m/v.

Sadržaj alantoina u ekstraktu (mg/cm³) takođe ne pokazuje pravilnu zavisnost sa povećanjem zapremine rastvarača, što je povezano sa rezultatima dobijenim za ukupne ekstraktivne materije. Sadržaj alantoina na 100 g suvog ekstrakta (ukupnih ekstraktivnih materija) pokazuje da je optimalan hidromodul 1:10 m/v, s obzirom da je u ovom ekstraktu određen najveći sadržaj alantoina (8,91 g/100g b.m.), primarne farmakološki aktivne komponente koja je od začaja za dalja istraživanja i izradu preparata za topikalnu primenu. Iz Tabele 15 se takođe uočava da za hidromodul 1:15 m/v nema povećanja sadržaja alantoina i ako je sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija za ovaj hidromodul znatno veći od sadržaja dobijenog pri hidromodulu 1:10 m/v. Ovi rezultati ukazuju da je optimalni hidromodul za ekstrakciju alantoina 1:10 m/v, tako da je ekstrakt dobijen pri ovom hidromodulu, za vreme ekstrakcije od 240 minuta

korišćen za dalja hemijska i farmakološka ispitivanja i rezultati pokazuju da se pri ovim uslovima postiže visok stepen ekstrakcije alantoina iz korena gaveza.

4.2.2. Kinetika ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija

Vodeni ekstrakt korena gaveza dobijen Soxhlet ekstrakcijom ispitivan je na prinos ukupnih ekstraktivnih materija tokom vremena. Sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija u polaznom biljnom materijalu određen prema postupku opisanom u delu 3.2.1.1. iznosi 6,3 g/100g b.m., nakon vremena ekstrakcije od 360 minuta (q_0). Promena prinosa ukupnih ekstraktivnih materija u zavisnosti od vremena ekstrakcije prikazana je na slici 26.



Slika 26. Zavisnost promene prinosa ukupnih ekstraktivnih materija od vremena ekstrakcije po Soxhlet-u za hidromodul 1:10 m/v

Na Slici 26 koja predstavlja zavisnost promene ukupnih ekstraktivnih materija od vremena ekstrakcije uočava se da sa porastom vremena ekstrakcije raste i prinos ukupnih ekstraktivnih materija na temperaturi ključanja rastvarača. Najveći prinos ukupnih ekstraktivnih materija pri navedenim uslovima ekstrakcije postignut je za vreme od 240 min i iznosi 6,2 g/100g b. m..

Za modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija iz korena gaveza vodom korišćen je kinetički model Ponomarjeva [Пonomарев,1976].

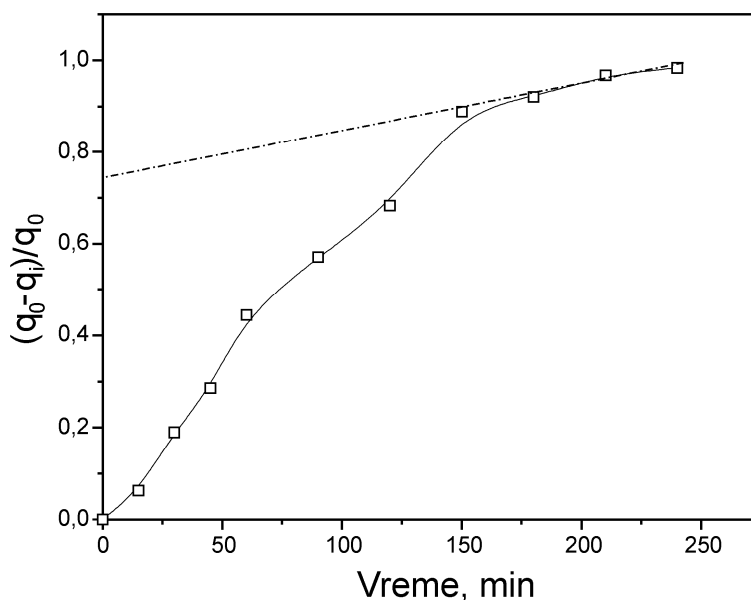
Jednačina Ponomarjeva pretpostavlja da u periodu spore ekstrakcije postoji linearna zavisnost između normalizovane mase ekstrahovanih supstanci $(q_0 - q_i) / q_0$ i vremena t :

$$(q_0 - q_i) / q_0 = b + k \cdot t \quad (8)$$

gde je: b – koeficijent ispiranja (koeficijent brze ekstrakcije),
 k – koeficijent pravca linearne zavisnosti (koeficijent spore ekstrakcije),
 q_0 – sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija u polaznom biljnom materijalu i
 q_i – sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija u biljnom materijalu posle vremena t .

Koeficijent ispiranja je mera mase ekstraktivnih supstanci u odnosu na njihovu početnu masu u periodu spore ekstrakcije. Jednačina iz koje je određen koeficijent ispiranja i koeficijent pravca, odnosno koeficijent spore ekstrakcije, predstavlja jednačinu prave čiji je koeficijent pravca k , a odsečak na ordinatnoj osi koeficijent ispiranja b [Пономарев, 1976].

Zavisnost $(q_0 - q_i) / q_0$ ukupnih ekstraktivnih materija od vremena ekstrakcije prikazana je na Slici 27.



Slika 27. Zavisnost $(q_0 - q_i) / q_0$ od vremena ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija dobijenih Soxhlet ekstrakcijom

Najveći stepen ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija (6,2 g/100g b.m., tj. 98,4%) u odnosu na polazni sadržaj u biljnom materijalu (6,3 g/100g b.m.) dobija se za vreme od 240 minuta (Slika 27).

U Tabeli 16 prikazane su vrednosti koeficijenata b i k , period brze ekstrakcije (PBE, min) i stepen ekstrakcije (SE, %) u periodu brze ekstrakcije u jednačini kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija.

Tabela 16. Period brze ekstrakcije (PBE), stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijeneta b i k u jednačinama kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija

PBE, min	150
SE, %	88,90
b	0,725
$k \cdot 10^3, \text{min}^{-1}$	1,11

Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija (slike 26 i 27) vidi se da sa vremenom raste prinos ukupnih ekstraktivnih materija. Posle vremena ekstrakcije od 210 minuta porast prinosa ukupnih ekstraktivnih materija za vreme do 240 minuta se neznatno povećava. Zbog toga se vreme od 210 minuta može uzeti kao optimalno vreme Soxhlet ekstrakcije za dobijanje ukupnih ekstraktivnih materija, ali obzirom da je optimalno vreme za ekstrakciju alantoina 240 minuta, vreme od 240 minuta je uzeto kao optimalno vreme ekstrakcije i za ukupne ekstraktivne materije i za alantoin, za hidromodul 1:10 m/v. Postoje dva perioda porasta prinosa ukupnih ekstraktivnih materija: brzi i spori period ekstrakcije. Vreme perioda brze ekstrakcije je 150 minuta. U periodu brze ekstrakcije se, spiranjem i rastvaranjem ekstraktivnih materija sa površine razorenih ćelija biljnog materijala ekstrahuje 88,90% ukupnih ekstraktivnih materija (Tabela 16). To pokazuje da je stepen usitnjenosti biljnog materijala korišćenog za ispitivanja zadovoljavajući, odnosno da visok stepen razorenosti ćelija povećava površinu sa koje se u brzom periodu spiraju i brzo rastvaraju polarne ekstraktivne materije u vodi i na taj način obezbeđuje i visok stepen njihove ekstrakcije u ovom periodu [Savić i sar., 2012].

Posle utvrđenog sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija bilo je potrebno kvalifikovati i kvantifikovati bioaktivne komponente u vodenom ekstraktu korena gaveza, dobijenom pri optimalnim uslovima ekstrakcije.

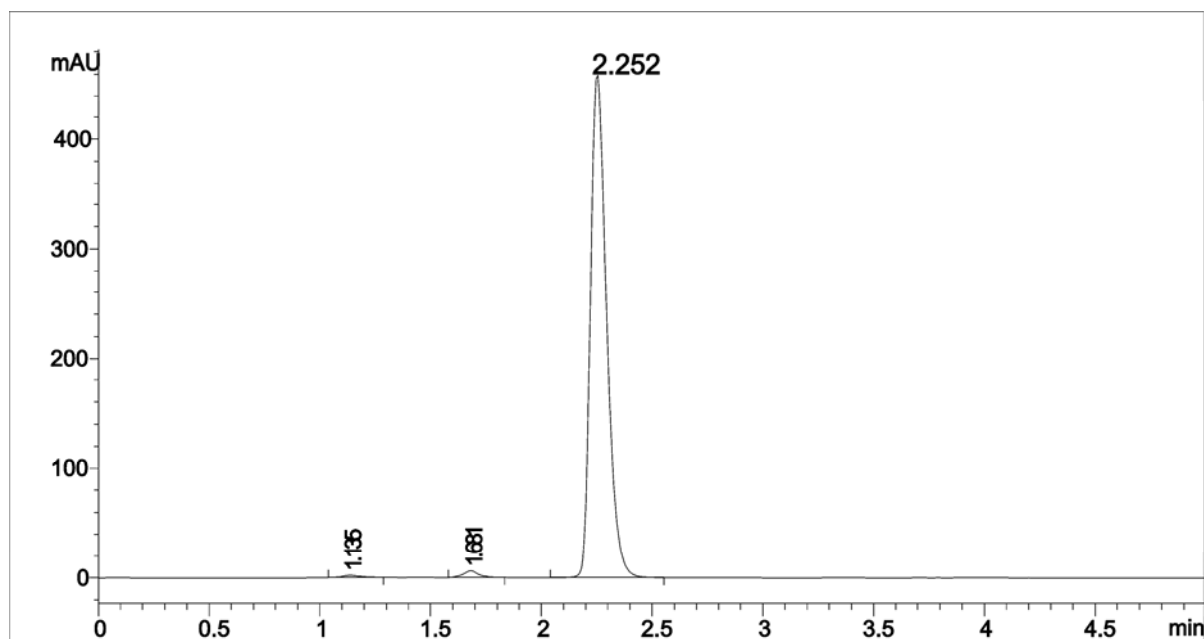
4.3. Karakterizacija vodenog ekstrakta korena gaveza

Vodeni ekstrakt korena gaveza dobijen Soxhlet ekstrakcijom pri optimalnim uslovima je neviskozni bistri tamno braon rastvor. Čaura od filter papira u koju je bila smeštena droga je barijera za ekstrakciju sluznih materija [Staiger, 2012] kojih ima u korenu gaveza, što uslovljava ovakvu konzistenciju ekstrakta.

4.3.1. Hemijski sastav vodenog ekstrakta korena gaveza

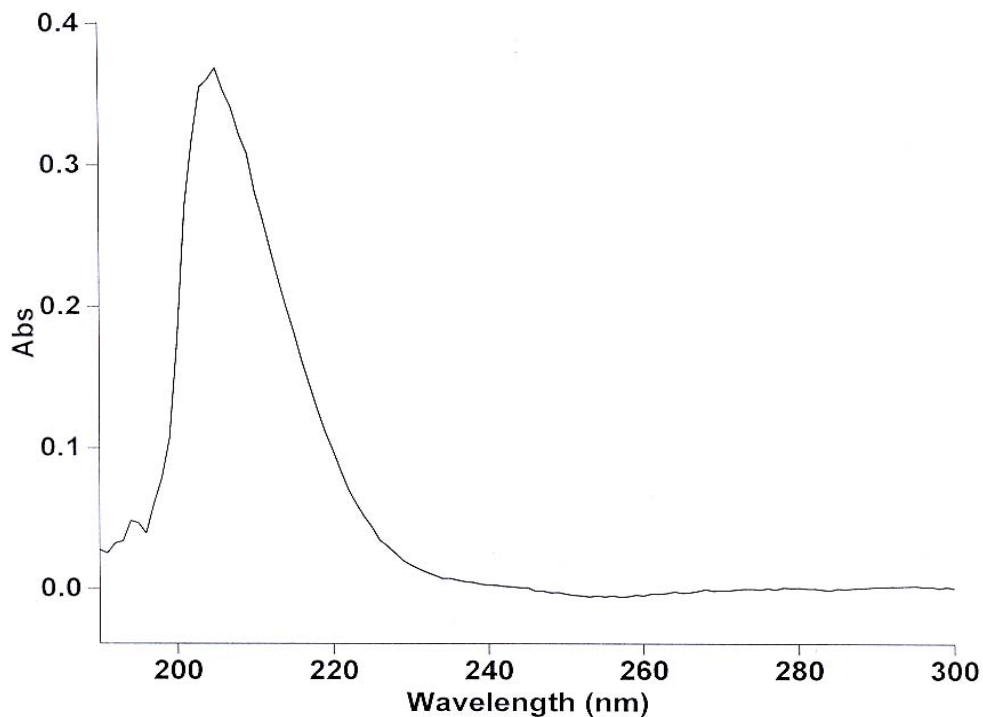
4.3.1.1. Određivanje sadržaja alantoina u vodenom ekstraktu korena gaveza HPLC metodom

Sadržaj alantoina u vodenim ekstraktima korena gaveza dobijeni za različito vreme ekstrakcije (optimalni hidromodul 1:10m/v) ispitan je metodom tečne hromatografije visokog pritiska (HPLC). Za analizu alantoina korišćeni su suvi ekstrakti dobijeni uparavanjem na vakuum uparivaču vodenih ekstrakata. Sadržaj alantoina u suvim ekstraktima (u ukupnim ekstraktivnim materijama, g/100g b.m.) kao i u biljnom materijalu (g/100g b.m.) određen je na osnovu jednačine kalibracione krive standardne komponente (poglavlje 3.2.2.2.) koja predstavlja zavisnost površine pika u HPLC hromatogramu od koncentracije alantoina. Na Slici 28 prikazan je HPLC hromatogram standarda alantoina.



Slika 28. HPLC hromatogram standarda alantoina

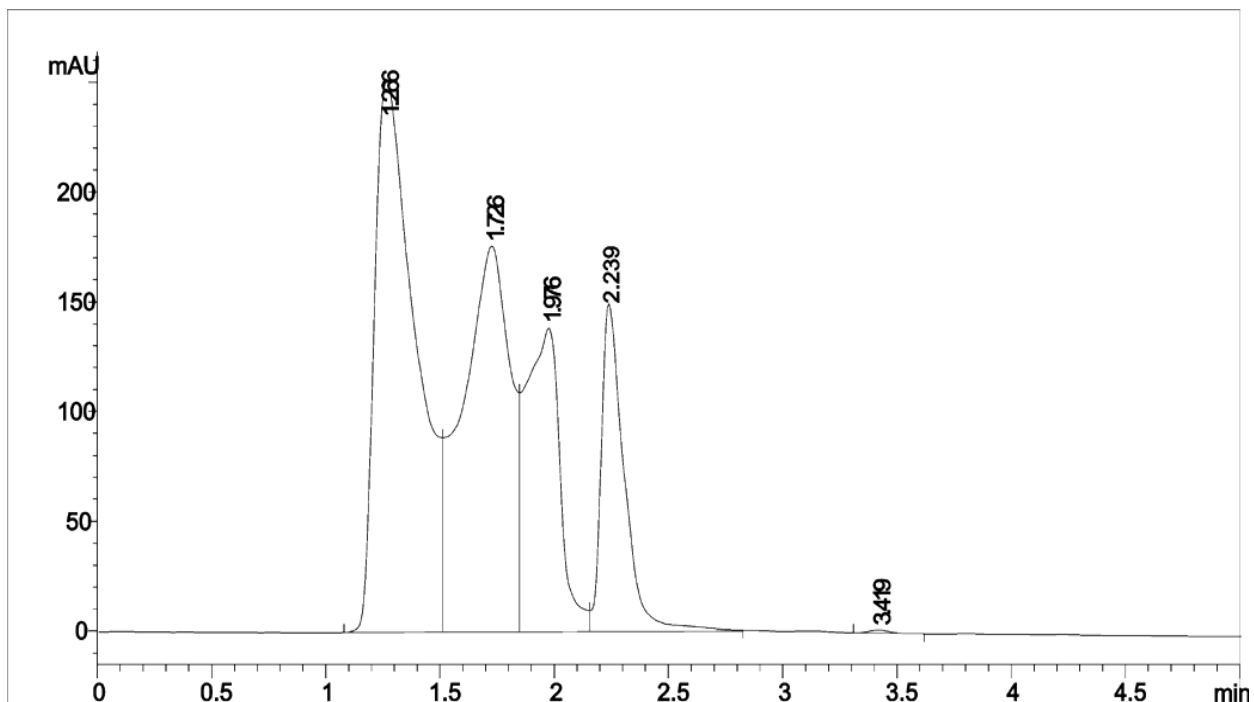
Sa HPLC hromatograma (Slika 28) uočava se da je standard alantoina visoke čistoće i da je pri definisanim uslovima hromatografske analize retenciono vreme na kome se javlja 2,252 minuta. UV spektar alantoina (vodeni rastvor, koncentracije 0,2%) prikazan je na Slici 29.



Slika 29. UV spektar standarda alantoina

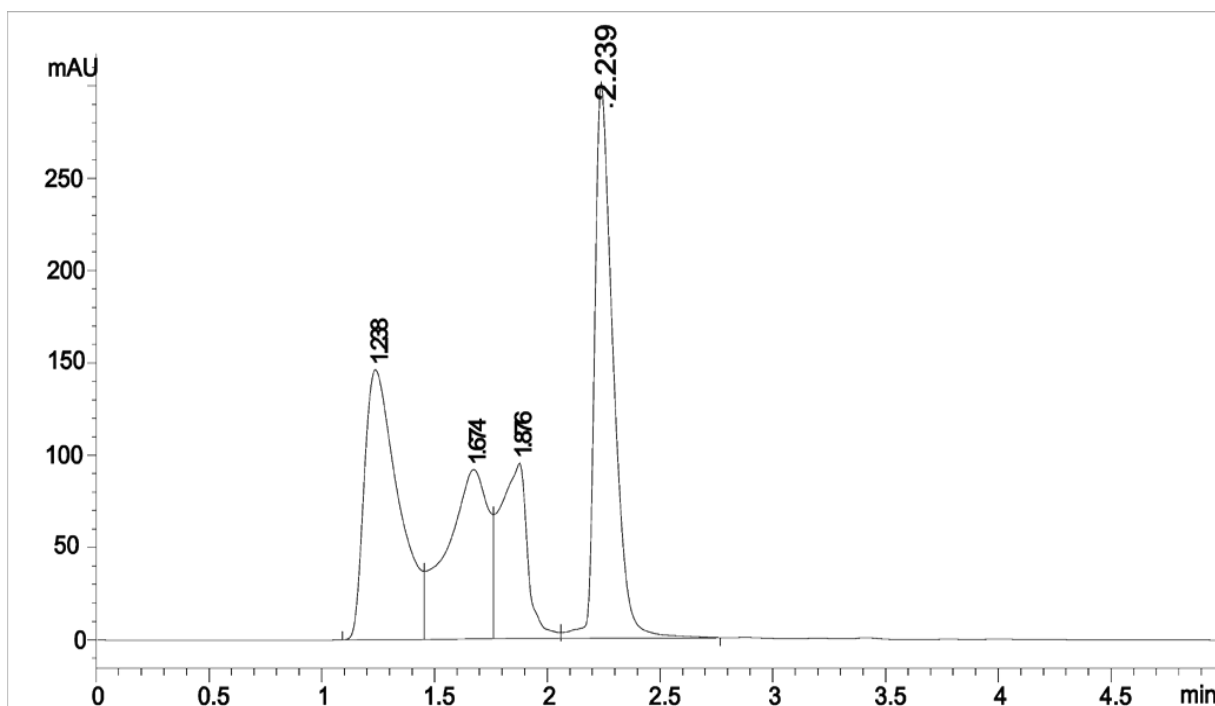
U UV spektru alantoina prisutan je maksimum apsorbance na 208 nm, koji potiče od $n \rightarrow \pi$ prelaza amidnih grupa prisutnih u strukturi.

HPLC hromatogram vodenog ekstrakta korena gaveza dobijen Soxlet ekstrakcijom, pri optimalnim uslovima ekstrakcije dat je na Slici 30.



Slika 30. HPLC hromatogram vodenog ekstrakta gaveza (Soxlet ekstrakcija; hidromodul, 1:10 m/v; vreme ekstrakcije 240 min)

Vodeni ekstrakt korena gaveza je složen po sastavu, na šta ukazuje i HPLC hromatogram (Slika 30). Ovo je i očekivano jer pored alantoina koji se javlja na retencionom vremenu 2,239 min (Slika 29), približno kao i standard, u ekstraktu su prisutne i druge komponente koje se javljaju na nižim retencionim vremenima. Da bi potvrdili prisustvo alantoina u ekstraktu, korišćena je metoda internog standarda, tako što je ekstraktu (200 μ l ekstrakta) dodato 200 μ l standarda alantoina koncentracije 0,192 mg/cm³ i takav uzorak analiziran tečnom hromatografijom pri identičnim uslovima. HPLC hromatogram ovog uzorka prikazan je na Slici 31.



Slika 31. HPLC hromatogram vodenog ekstrakta korena gaveza kome je dodata ista količina standarda alantoina (200 μ l vodenog ekstrakta korena gaveza i 200 μ l alantoina, koncentracije 0,192 mg/cm³)

Povećanje površine pika srazmerno povećanju koncentracije alantoina u uzorku kao i nepromenjeno retenciono vreme od 2,239 min za alantoin u odnosu na ekstrakt bez dodatka internog standarda, ukazuje na prisustvo i identifikaciju alantoina.

U Tabeli 17 dat je sadržaj alantoina u suvom ekstraktu i u biljnom materijalu u zavisnosti od vremena Soxhlet ekstrakcije.

Tabela 17. Sadržaj alantoina u suvom ekstraktu i u biljnom materijalu u zavisnosti od vremena Soxhlet ekstrakcije

Vreme, min	g/100g s. e.	g/100g b. m.
15	5, 59	0, 022
30	6, 65	0, 080
45	7, 17	0, 129
60	6, 27	0, 175
90	6, 49	0, 234
120	7, 12	0, 306
150	7, 73	0, 433
180	7, 72	0, 448
210	8, 30	0, 506
240	8, 91	0, 552

Iz Tabele 17 se vidi da sadržaj alantoina u ukupnom ekstraktu raste sa vremenom ekstrakcije. Sadržaj alantoina u ukupnom ekstraktu dobijenom na 240 minuta ekstrakcije iznosi 8,91 g/100 g suvog ekstrakta. Prinos alantoina izražen na 100g biljnog materijala takođe raste sa vremenom i za vreme ekstrakcije od 240 minuta iznosi 0,552 g/100 g biljnog materijala [Savić i sar.,2012].

Visok sadržaj alantoina u vodenom ekstraktu korena gaveza je u skladu sa literaturnim podacima [Staiger,2012] i pokazuje da su određeni optimalni uslovi za ekstrakciju alantoina iz korena gaveza definisani u ovom radu zadovoljavajući.

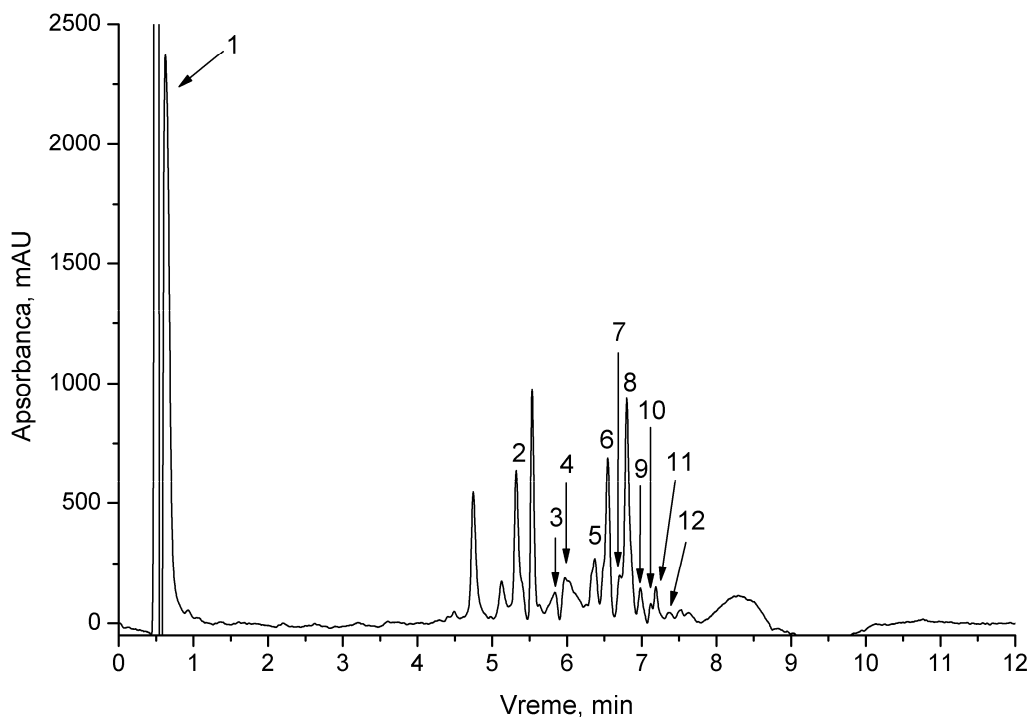
4.3.1.2. UHPLC–DAD–HESI–MS analiza vodenog ekstrakta korena gaveza

Metodom tečne hromatografije pokazano je da su u vodenom ekstraktu korena gaveza prisutna osim alantoina i druga jedinjenja (poglavlje 4.3.1.1.). Za dalju analizu dobijenog vodenog ekstrakta tj. kvalitativni i kvantitativni sadržaj komponenata primenjena je savremena UHPLC–DAD–HESI–MS metoda.

Veliki broj istraživanja je pokazao da gavez poseduje brojna korisna svojstva zbog prisustva mnogih jedinjenja sa biološkom aktivnošću. Nažalost, studije pokazuju da je ova biljka potencijalno toksična usled prisustva pirozolidinskih alkaloida kao što su likopsamin, ehimidin i

lasiokarpin i njihovi azotni oksidi [Oberlies i sar., 2004, Liu i sar., 2009]. Iz ovih razloga je veoma važno izvršiti kvalitativni i kvantitativni sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u vodenom ekstraktu gaveza, kako bi mogao biti korišćen kao aktivni princip za izradu preparata za topikalnu upotrebu i kako bi se biološka aktivnost sa druge strane povezala sa prisustvom određenih konstituenasa. Stoga je u ovom radu razvijena i primenjena nova osetljivija UHPLC–DAD–HESI–MS metoda za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava vodenog ekstrakta korena gaveza. Sva jedinjenja prisutna u vodenom ekstraktu korena gaveza su identifikovana na osnovu retencionih vremena odgovarajućih standarda, UV-VIS apsorpcionih spektara i masenih spektara koji su dovedeni u korelaciju sa literaturnim podacima [Mroczek i sar., 2006, Kečkeš i sar., 2013, Liu i sar., 2009, Kassim i sar., 2010, Tolun i sar., 2010].

Na Slici 32 prikazan je UHPLC hromatogram vodenog ekstrakta korena gaveza.



Slika 32. UHPLC hromatogram vodenog ekstrakta korena gaveza
detektovan na 272 nm.

UHPLC hromatogram vodenog ekstrakta korena gaveza (Slika 32) je znatno složeniji od HPLC hromatograma i pokazuje prisustvo 15 komponenata od kojih je identifikovano 12. U

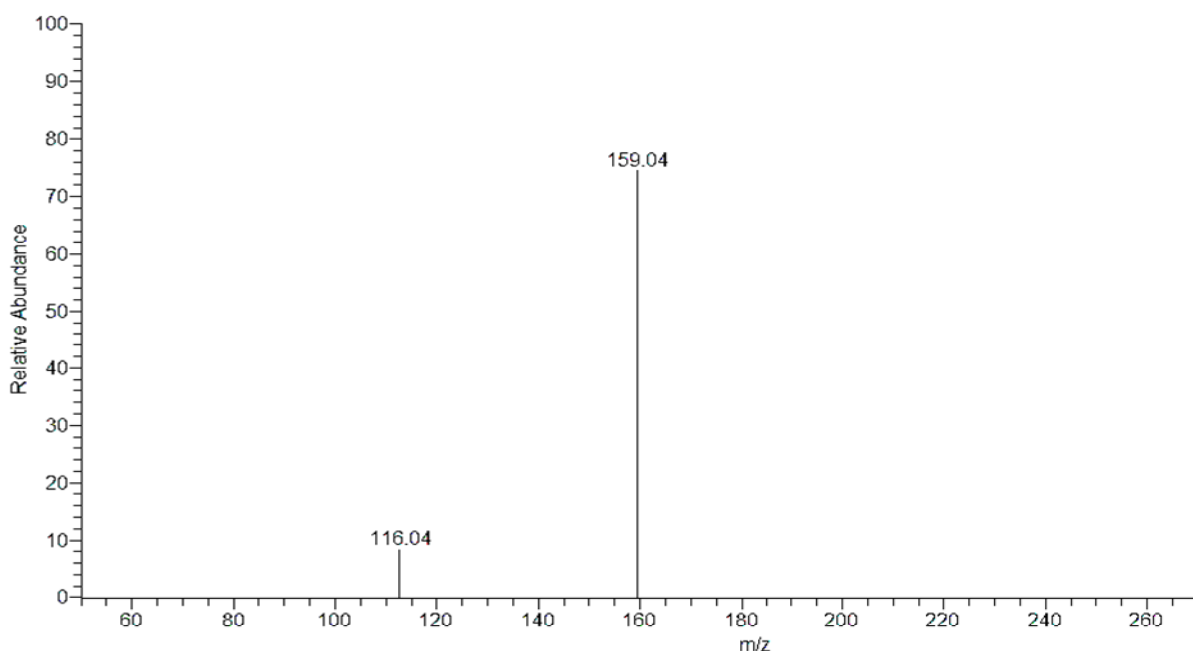
Tabeli 18 data su identifikovana jedinjenja, retencionna vremena i vrednosti m/z na kojima se javljaju odgovarajući fragmentni joni u masenim spektrima.

Tabela 18. Identifikovana jedinjenja u vodenom ekstraktu korena gaveza

Redni broj pika	Rt, min	Jonizacioni mod	Pseudomolekularni jon	MS/MS	Komponente
1	0,56	+	159	116	Alantoin
2	5,31	–	359	161,133	Ruzmarinska kiselina
3	5,95	+	300	120,138	Likopsamin
4	6,27	+	369	193,173	5-O-Feruloil hinska kiselina
5	6,48	+	273	255,227, 153	Pinobanksin
6	6,62	+	291	245,205, 179	Epikatehin
7	6,72	+	455	291, 163	<i>p</i> -Kumaroil-heksozid-metil glutarat
8	6,79	+	539	455, 291, 163	derivat <i>p</i> -kumaroil-heksozo-metil glutarata
9	6,97	–	315	151	Kvercetin-3-metiletar
10	7,10	–	301	257, 229	Elaginska kiselina
11	7,21	+	319	279, 149	Miricetin
12	7,51	+	412	394, 336, 238, 220, 120	Lasiokarpin

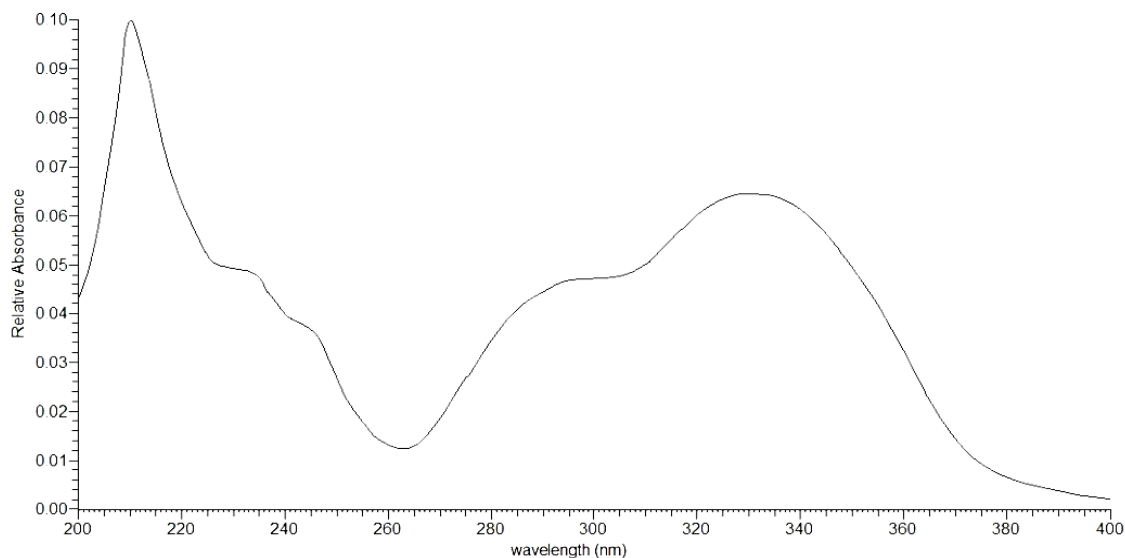
Prvi pik koji se javlja na retencionom vremenu 0,56 minuta identifikovan je kao alantoin. Prisustvo pseudomolekularnog jona $[M+H]^+$ u pozitivnom jonskom modu na m/z 159 $[M+H]^+$ i njegov fragment na m/z 116 takođe potvrđuju da pik 1 odgovara alantoinu [Tolun i sar., 2010].

Prisustvo alantoina u ekstraktu je dodatno potvrđeno standardom. Maseni spektar alantoina u saglasnosti je sa masenim spektrom komponente kojoj odgovara pik 1 u UHPLC hromatogramu i prikazan je na Slici 33.

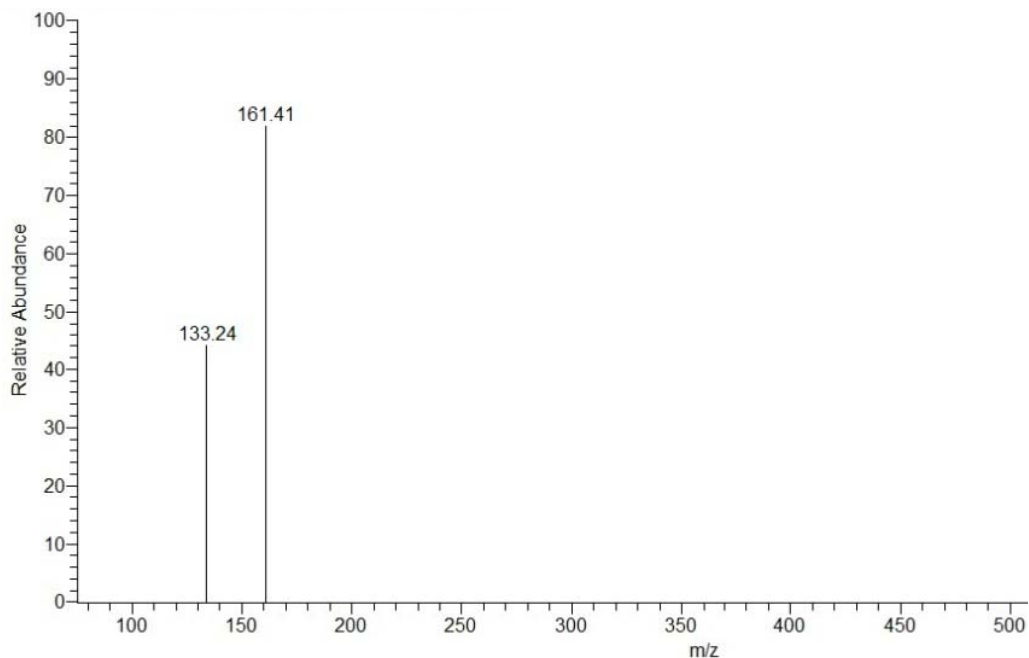


Slika 33. Maseni spektar alantoina

Ruzmarinska kiselina odgovara piku 2 koji se javlja u UHPLC hromatogramu na retencijom vremenu 5,31 minuta. Masena fragmentacija pseudomolekularnog jona $[M-H]^-$ u negativnom modu na m/z 359 je pokazala dva jonska fragmenta na m/z 161 i 133, na osnovu kojih se poređenjem sa literaturnim podacima [Ertas i sar., 2015] može zaključiti da pik 2 potiče od prisustva ruzmarinske kiseline. Prisustvo ruzmarinske kiseline u ekstraktu je potvrđeno dodatno i standardom. UV spektar ruzmarinske kiseline prikazan je na Slici 34 a, a maseni spektar ruzmarinske kiseline prikazan je na Slici 34b.



a)

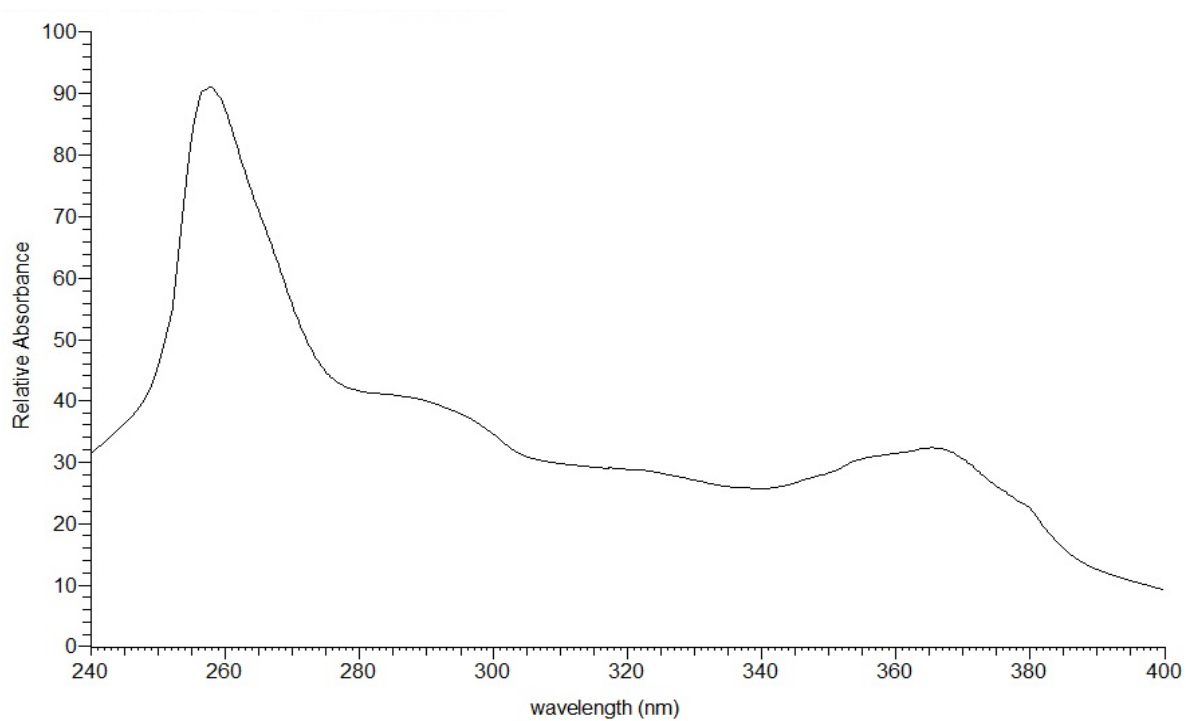


b)

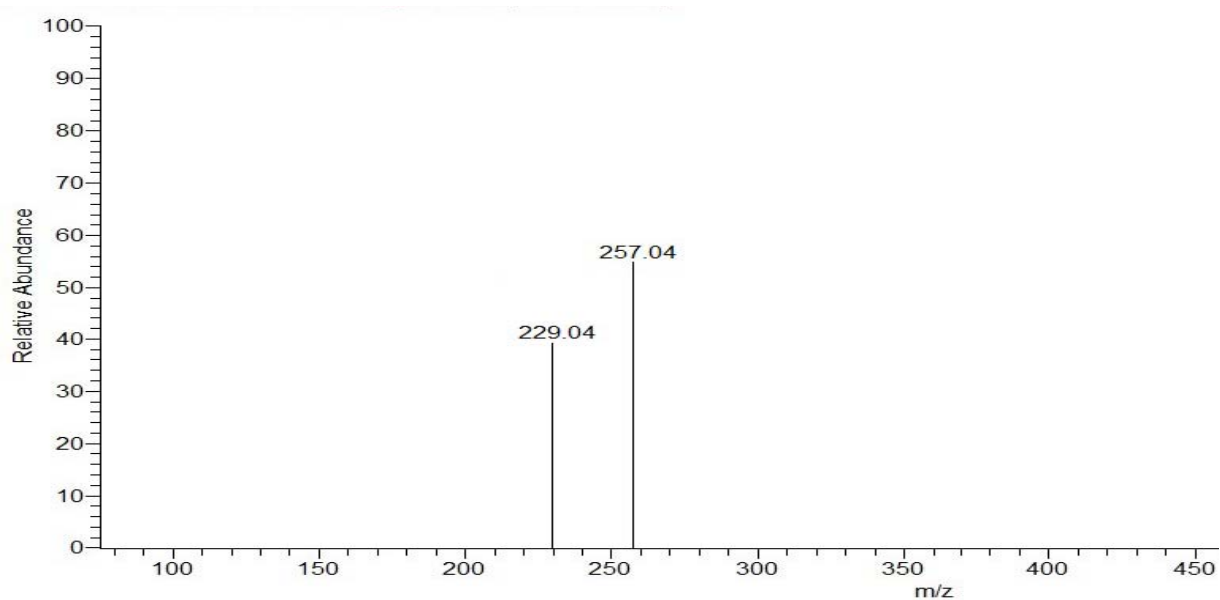
Slika 34 a) UV spektar ruzmarinske kiseline **b)** Maseni spektar ruzmarinske kiseline

Ruzmarinska kiselina ima dva apsorpciona maksimuma u UV spektru, primarni na 210 koji potiče od $n \rightarrow \pi$ prelaza karbonilne grupe i sekundarni na 330nm od $\pi \rightarrow \pi$ prelaza fenolnih struktura, prisutnih u ruzmarinskoj kiselini.

Pik 3 u UHPLC hromatogramu koji se javlja na retencionom vremenu 5,95 minuta identifikovan je kao likopsamin. On sadrži fragmentni jon na m/z 120 što je karakteristika retronecin grupe koja predstavlja osnovnu strukturu likopsamina. Masenom fragmentacijom likopsamina dobijena su dva karakteristična fragmentna jona na m/z 120 i 138 koji predstavljaju karakteristične fragmentne jone za retronecinski tip alkaloida kome pripada i likopsamin [Liu i sar., 2009]. 5-*O*-feruloil hinska kiselina identifikovana je kao pik 4 na retencionom vremenu 6,27 minuta. Prisustvo pseudomolekularnog jona $[M+H]^+$ u pozitivnom modu na m/z 369 i fragmentni joni na m/z 193 i 173 posle fragmentacije pokazuju prisustvo 5-*O*-feruloil hinske kiseline u vodenom ekstraktu gaveza [Plazonić i sar., 2009]. Pik 5 na retencionom vremenu 6,48 minuta sa pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ na m/z 273 je identifikovan kao pinobaksin. Nakon masene fragmentacije u MS spektru prisutna su tri fragmentna jona na m/z 255; 227 i 153 [Kečkeš i sar., 2013]. Na osnovu dobijenih rezultata iz MS fragmentacije može se zaključiti da je ovo jedinjenje pinobaksin. Pseudomolekularni jon $[M+H]^+$ u pozitivnom modu na m/z 291 i njegovi jonski fragmenti na m/z 245, 205 i 179 ukazuju da je pik 6 na retencionom vremenu 6,62 minuta epikatehin [Lopes-Lutz i sar., 2010]. Pikovi 7 i 8 su identifikovani kao *p*-kumaroil-heksozid-metil-glutarat i njegov derivat, respektivno. Posle MS fragmentacije, oba jedinjenja su pokazala iste fragmente na m/z 193 i 291, a jedinjenje kome odgovara pik 8 i dodatni jonski fragment na m/z 455. Piku 9 koji se javlja na retencionom vremenu 6,97 minuta odgovara kvercetin-3-metil etar. Na osnovu njegovog pseudomolekularnog jona $[M-H]^-$ u negativnom modu koji se javlja na 315 m/z i njegovog jonskog fragmenta na m/e 151 može se zaključiti da je kvercetin-3-metil etar prisutan u vodenom ekstraktu korena gaveza [Iwashina i Kokubugata, 2010]. Elaginska kiselina je identifikovana u vodenom ekstraktu korena gaveza i javlja se na retencionom vremenu 7,1 minut, i predstavlja pik označen brojem 10 u UHPLC hromatogramu. Elaginska kiselina i kvercetin imaju sličan pseudomolekularni jon $[M-H]^-$ u negativnom modu na m/e 301, ali je masena fragmentacija ovih pikova različita, što ukazuje da potiču od različitih polaznih struktura. Posle MS fragmentacije, na osnovu prisustva fragmentnih jona na m/e 257 i 229 može se zaključiti da je pik 10 elaginska kiselina [Mullen i sar., 2003; Fracassetti i sar., 2013]. Prisustvo elaginske kiseline u vodenom ekstraktu korena gaveza potvrđeno je i primenom standarda. UV spektar elaginske kiseline prikazan je na Slici 35 a. Na spektru postoje dva apsorpciona maksimuma na 255 nm i na 368 nm, koji potiču od $\pi \rightarrow \pi$ prelaza dvostrukih veza fenolnih aromatičnih prstenova.



a)



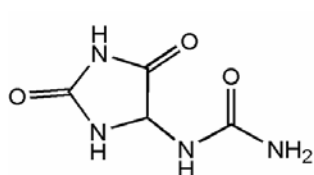
b)

Slika 35. a) UV spektar elaginske kiseline **b)** Maseni spektar elaginske kiseline

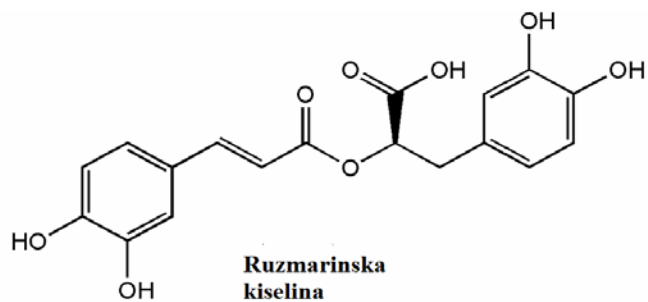
Maseni spektar elaginske kiseline prikazan je na Slici 35 b.

Miricetin se javlja na retencionom vremenu 7,21 minuta i njemu odgovara pik u hromatogramu pod rednim brojem 11. U pozitivnom modu njegovog pseudomolekularnog jona $[M+H]^+$ koji se javlja na m/z 319 i fragmentnih jona na m/z 279 i 149 potvrđeno je prisustvo miricetina u vodenom ekstraktu korena gaveza [Kečkeš i sar., 2013]. Lasiokarpinu odgovara pik 12 koji se javlja na retencionom vremenu 7,51 minut. Prisustvo pseudomolekularnog jona $[M+H]^+$ u pozitivnom modu na m/z 412 i fragmentni jon na m/z 120 ukazuje da je pik 12 u UHPLC hromatogramu lasiokarpin [Liu i sar., 2009]. Likopsamin i lasiokarpin pripadaju grupi pirolizidinskih alkaloida koji su od posebnog interesa za istraživanje zbog izazivanja toksičnih reakcija kod ljudi, pre svega veno-okluzivne bolesti jetre ako se unose preko hrane ili biljnih lekova.

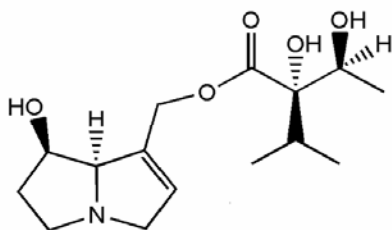
Strukture identifikovanih komponenti u vodenom ekstraktu korena gaveza prikazane su na Slici 36.



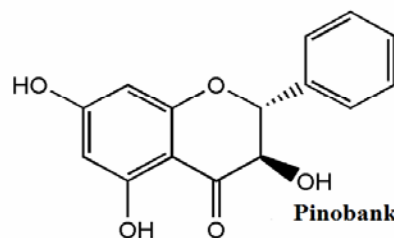
Alantoin



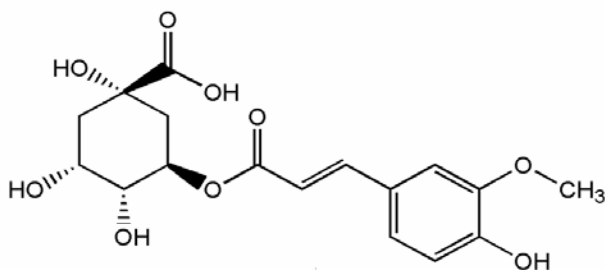
**Ruzmarinska
kiselina**



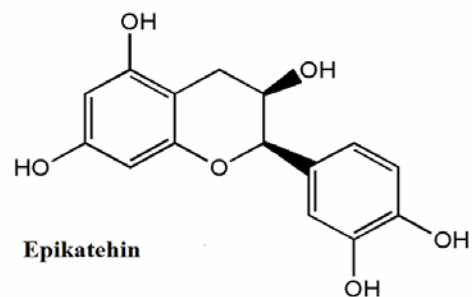
Likopsamin



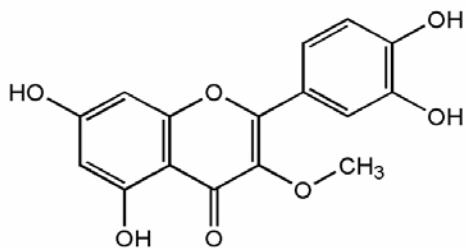
Pinobanksin



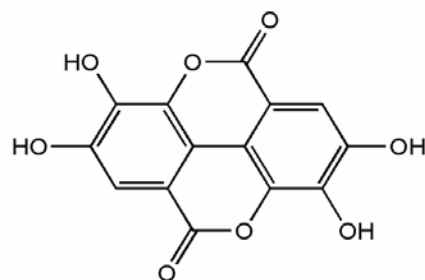
5-O-Feruloil hinska kiselina



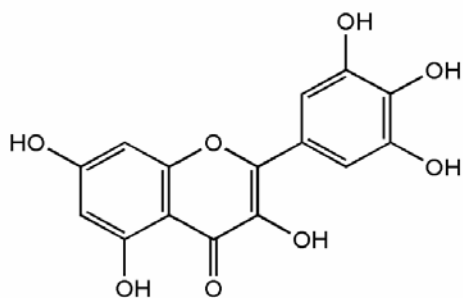
Epikatehin



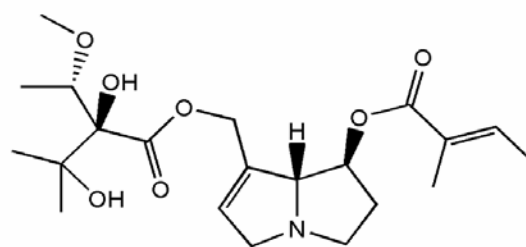
**Kvercetin-3- metil
etar**



Elaginska kiselina



Miricetin



Lasiokarpin

Slika 36. Strukturne formule detektovanih jedinjenja u vodenom ekstraktu korena gaveza.

Jedinjenja koja su u najvećim količinama prisutna u vodenom ekstraktu korena gaveza su ruzmarinska kiselina, alantoin i elaginska kiselina, što se vidi i na osnovu površine pikova u UHPLC hromatogramu (Slika 32). Ova jedinjenja imaju biološku aktivnost te je bilo potrebno njihovo kvantitativno određivanje u vodenom ekstraktu korena gaveza. U Tabeli 19 dati su rezultati kvantitativnog sadržaja alantoina, elaginske i ruzmarinske kiseline.

Tabela 19. Regresione jednačine, koeficijenti linearne korelacije i sadržaj alantoina, elaginske kiseline i ruzmarinske kiseline u vodenom ekstraktu korena gaveza računat u odnosu na suvi ekstrakt

Jedinjenje	Regresiona jednačina ¹	R ²	g/100 g s.e	Ukupne ekstraktivne materije (g/100 g b.m.)
Alantoin	$y=51,915x+37,8$	0,9969	8,91	
Elaginska kiselina	$y=368210x+110,15$	0,9969	7,4	6,20
Ruzmarinska kiselina	$y=8514,7x+1214,3$	0,9983	12,8	

¹ $y = ax+b$; gde je x koncentracija u mg/cm³, a y površina ispod pika na odabranim talasnim dužinama

Sadržaj ovih jedinjenja određen je UHPLC–DAD–HESI–MS metodom na osnovu konstruisanih kalbracionih krivi čije su jednačine date u Tabeli 17 za navedene biološki aktivne komponente na talasnoj dužini 360 nm. Alantoin je jedna od glavih komponenti koja je odgovorna za biološka svojstva gaveza. Iz literaturnih podataka poznato je da je alantoin prisutan u gavezu u koncentraciji od 0,6-4,7% [Dennis i sar., 1897]. Rezultati ovih istraživanja pokazuju da vodeni ekstrakt gaveza sadrži 8,91% alantoina [Savić i sar., 2012]. Na osnovu ovoga se može zaključiti da koren gaveza predstavlja važnu polaznu sirovinu za dobijanje alantoina i vodenih ekstrakata sa visokim sadržajem alantoina.

Literaturni podaci pokazuju da je elaginska kiselina prisutna u voću i to u jagodi (162 mg/100g suve materije) [Buendía i sar., 2010] i malini (415 mg/100g suve materije) [Bobimaité i sar., 2012]. U dobijenom vodenom ekstraktu korena gaveza sadržaj elaginske kiseline je 7,4 g/100 g suvog ekstrakta. Visok sadržaj elaginske kiseline, takođe može doprineti biološkoj aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza. Ruzmarinska kiselina je prisutna u lišću matičnjaka (*Melissa officinalis*, Lamiaceae) u koncentraciji od 3,91% [Toth i sar., 2003]. U ruzmarinu (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) ruzmarinska kiselina je otkrivena u listovima, cveću, stabljikama i korenu, a najveći sdržaj od 2,5% je detektovan u prvoj fazi rasta lista [Del Bano i

sar., 2003]. Sirovi ekstrakt borača *Borago officinalis* (Boraginaceae) sadrži 2,5% ruzmarinske kiseline [Wettasinghe i sar., 2002]. Ispitivanja u ovom radu pokazuju da je u vodenom ekstraktu korena gaveza sadržaj ruzmarinske kiseline 12,8% i prema našim saznanjima ovo je najveća koncentracija ruzmarinske kiseline u do sada ispitivanim vrstama [Savić i sar., 2014].

U prilogu P prikazani su maseni spektri identifikovanih komponenti koje su prisutne u manjim količinama u vodenom ekstraktu korena gaveza od alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline.

4.3.1.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza

Flavonoidi su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti biljaka [Ozyurt i sar., 2004]. Flavonoidi ispoljavaju veliki broj biološki značajnih aktivnosti kao što je antioksidativna aktivnost. Antioksidansi imaju zadatak da smanje oksidativna oštećenja kod ljudi izazvana slobodnim radikalima i reaktivnim kiseoničnim vrstama u uslovima „oksidativnog stresa” [Ozyurt i sar., 2004]. Ova jedinjenja čine najveću grupu biljnih polifenola, nalaze se u značajnim količinama u povrću i voću, kao i u biljnim prehrambenim proizvodima. Pokazuju širok spektar antioksidantnih svojstava *in vitro*. U poslednjih nekoliko godina flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla imaju važno mesto, posebno u oblasti farmacije i medicine, zbog njihovog potencijala da spreče veliki broj hroničnih i degenerativnih bolesti, uključujući maligna oboljenja i kardiovaskularne bolesti. Različite studije, *in vitro* i *in vivo* pokazale su da flavonoidi poseduju pored antioksidativne, antimutagene, antivirusne, antimikrobne, antiinflamatorne, antikancerogene i imuno-modulatorske efekte [Celik i sar., 2010].

Sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu korena gaveza dobijenom pod optimalnim uslovima ekstrakcije iznosi 473,16 mg GKE/g s.e. (mg galne kiseline ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta) i 18,90 mg RE/g s.e., respektivno (mg rutin ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta) [Stanojevic i sar., 2013; Savić i sar., 2012]. Farmakološke aktivnosti korena gaveza su verovatno posledica sinergističkog delovanja fitohemikalija među kojima istaknuto mesto imaju fenoli i flavonoidi.

4.3.1.4. Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodenom ekstraktu korena gaveza

Gavez je biljka čija je primena ograničena na lokalnu, usled prisustva toksičnih alkaloida. U metabolizmu kože važnu ulogu imaju joni makroelemenata kalcijuma, natrijuma i kalijuma koji su detektovani u vodenom ekstraktu korena gaveza u većoj koncentraciji. Natrijumov i kalijumov jon ulaze u sastav prirodnog vlažećeg faktora kože koji vezuje vodu i pomaže balansu vlažnosti [Isailović, 2006]. Rezultati analize vodenog ekstrakta korena gaveza na makro- i

mikroelemente su u skladu sa literaturnim podacima [Axterer i sar., 2006], i oni su prikazani u Tabeli 13.

Pri optimalnim parametrima instrumenta koji su dati u eksperimentalnom delu (3.2.2.5.), analizom razblaženih slabo kiselih vodenih rastvora ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom primenom ICP-OES dobijeni su rezultati ispitivanja prisustva na 23 elementa (Tabela 20).

Tabela 20. Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodenom ekstraktu korena gaveza (mg/dm³)

Detektovani element	mg/dm ³
Ag	0,00
Al	6,60
B	4,70
Ba	4,70
Bi	3,10
Ca	129,30
Cd	3,00
Co	0,00
Cr	0,00
Cu	3,80
Fe	8,00
Ga	0,20
In	2,00
K	560,40
Li	0,40
Mg	11,40
Mn	0,00
Na	28,70
Ni	0,00
Pb	17,20
Sr	0,60
Tl	0,20
Zn	4,80

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prisustvo srebra, kobalta, hroma, mangana i nikla, nije detektovano u ispitivanim ekstraktima gaveza, odnosno njihov sadržaj u ispitivanim uzorcima bio je ispod granice detekcije za dati element (Tabela 20). Aluminijum je detektovan u količini od $6,6 \text{ mg/dm}^3$ za koji je nađeno da ispoljava dejstvo na gljivicu *Candida albicans*. Bor, koji je takođe detektovan u ekstraktu smanjuje potrebe za kalcijumom, i usled nedostatka bora dolazi do deformacije tkiva. Prisustvo barijuma i bizmuta je zapaženo u manjim količinama u ispitivaniom ekstraktu korena gaveza. Kalcijum spada u grupu makroelemenata i u ekstraktu prisutan u velikim količinama ($129,30 \text{ mg/dm}^3$). Soli kalcijuma obezbeđuju čvrstinu skeletu, dok njegovi joni igraju važnu ulogu u mnogim metaboličkim procesima. Kalcijum dospeva u vanćelijsku tečnost iz gastrointestinalnog trakta procesom apsorpcije ili razgradnjom kostiju, odakle se uz pomoć gastrointestinalnog trakta, bubrega i kože ugrađuje u kosti prilikom njihovog formiranja. Takođe, duž cele ćelijske membrane postoji stalan protok ovog elementa. Mnoge neuromišićne i druge ćelijske funkcije zavise od održavanja koncentracije jona kalcijuma u vanćelijskoj tečnosti. Nedostatak kalcijuma ili njegov disbalans u organizmu dovodi do pojave osteoporoze, pri čemu treba napomeniti da pojava ove bolesti nije uvek vezana za manjak kalcijuma u ljudskom organizmu [Gibney i sar., 2009]. Kalcijum ima ulogu u diferencijaciji keratinocita pa je njegovo prisustvo u ekstraktu važno. Kadmijum je element koji je poznat kao jedan od najopasnijih zagađivača životne sredine. U vodenom ekstraktu korena gaveza prisutan je u malim količinama što je poželjno jer oko 6% unetog Cd u organizam se apsorbuje preko gastrointestinalnog trakta, vezuje za albumin i dolazi do krvi što može dovesti do neželjenih efekata [Carruthers i Smith, 1979]. Prisustvo bakra je takođe detektovano u ekstraktu ($3,80 \text{ mg/dm}^3$) što je važno jer zajedno sa vitaminom C i cinkom, pomaže razvoju elastina, vlakana koji podržavaju strukturu kože. Nedostatak ovog minerala nastaje veoma retko, a lekari upozoravaju da uzimanje u obliku suplemenata može biti i opasno. Bakar je esencijalni metal u organizmu čoveka, životinja i biljaka. Nedostatak bakra u organizmu dovodi do ozbiljnih poremećaja i anemije, jer je bakar esencijalan u stvaranju hemoglobina i neophodan je sastojak većeg broja enzima. Gvožđe je vrlo bitno za razvoj lišća kod biljaka i 80% gvožđa je smešteno uglavnom u hloroplastima. Usled nedostatka gvoždja lišće postaje gotovo bezbojno i izumire. Sadržaj gvožđa u ekstraktu je 8 mg/dm^3 . Kalijum ima važnu ulogu u prenosu nervnih impulsa i mišićne kontrakcije. Neophodan je za regulaciju krvnog pritiska i balansa vode u organizmu pa je nađeno prisustvo kalijuma u vodenom ekstraktu korena gaveza u količini od $560,4 \text{ mg/dm}^3$ važno

za održavanje vlažnosti kože kod topikalne primene ekstrakta. Postoje dokazi da ishrana bogata kalijumom može smanjiti rizik od povišenog krvnog pritiska i šloga. Detektovana količina kalijuma je najveća u odnosu na ostale elemente (560,40 mg/dm³). Litijum je takođe prisutan ali u znatno manjoj koncentraciji (0,4 mg/dm³).

ICP-OES analiza ekstrakata gaveza je pokazala da je magnezijum od ispitivanih makroelemenata bio najmanje zastupljen. Sadržaj magnezijuma u ekstraktu je 11,4 mg/dm³. Magnezijum deluje antikonvulzivno, antiinflamatorno i spazmolitično. U živim sistemima natrijum je deo bikarbonatnog puferskog sistema i utiče na distribuciju vode preko osmoze, kao i na kiselinsko-baznu ravnotežu krvi. Pored toga, neophodan je za neuromišićnu funkciju jer učestvuje u transportu glukoze i drugih nutrijenata. Dobijena vrednost za natrijum u vodenom ekstraktu gaveza je 28,70 mg/dm³. Olovo zajedno sa kadmijumom zbog visokog rizika po zdravlje ljudi nije poželjno jer se ovi elementi smatraju najvažnijim kontaminantima današnjice. Sadržaj olova u ispitivanim uzorcima ekstrakata gaveza dostiže čak i do 17,20 mg/1000cm³. Ova koncentracija toksičnog elementa ukazuje na verovatnu zagađenost životne sredine teškim metalima, jer oni najčešće apsorpcijom iz zemljišta dospevaju u biljkama. Pri uobičajenom sadržaju olova u vazduhu (0,02 do 0,04 mg/m³) čovek na dan udahne ukupno oko 0,2 do 0,3 mg olova.

U kopnenim vodama za piće nalazimo oko 0,01 mg/dm³ olova, a u morskoj vodi oko 0,003 mg/dm³ [Sparks, 2003]. Cink je sastojak insulina, zatim fermenta, karbohidraze, urikaze i fosfataze. Detektovana vrednost cinka u ekstraktima gaveza je 4,8 mg/dm³. U biološkom pogledu cink je vrlo značajan, jer spada u mikroelemente i neophodan je za epitelijsku diferencijaciju i normalan rast ćelija. Postoji u velikim količinama unutar kože, a posebno u epidermisu. Poznat je slučaj *acrodermatitis enteropatika*, gde su ozbiljne akne potpuno uklonjene primenom cinka u terapiji [Kaymak i sar., 2007], što predstavlja dokaz da je cink veoma važan mineral za izlečenje akne na koži. Takođe, u nekim slučajevima pojava akni na koži može biti simptom nedostatka cinka u organizmu. Uzet oralno ili u obliku kreme cink smanjuje produkciju masnoća, i može biti efikasan u kontroli stvaranja novih akni kao i lečenju postojećih. Cink deluje antiartritično, antiekcemično, antiinfektivno, antivirusno, adstrigentno, imunostimulativno i isceljujuće pa je stoga poželjan sastojak ekstrakta gaveza.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je koren gaveza u velikoj meri „bogat“ u pogledu sadržaja mikro- i makroelemenata. U ispitivanom ekstraktu detektovano je prisustvo 18 elemenata od 23 analiziranih.

Obzirom da je za normalno funkcionisanje kože neophodna kombinacija minerala na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja prisustva mikro- i makroelemenata može se zaključiti da se ekstrakt iz korena gaveza može uspešno koristiti za spoljašnju primenu i lečenje različitih promena na koži.

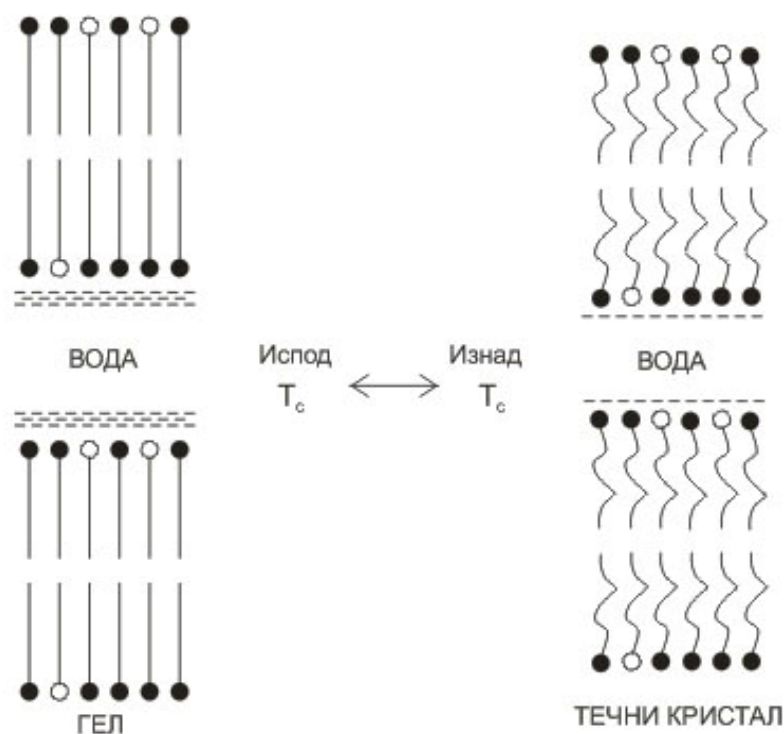
4.4. Karakterizacija polučvrstih formulacija- kremova

Kremovi su izrađeni standardnim postupkom emulgovanja. Tip emulzije je određen konduktometrijski i kreće se u opsegu od 56-58 μS što potvrđuje da su to emulzije tipa U/V.

Za izradu kremova korišćen je mešani emulgator odnosno emulgujući vosak koji se sastoji od masnih alkohola (cetil i stearyl) i nejonskog PAM (površinski aktivnog emulgatora, zaštićenog imena Emulgade SE[®]). Stabilizacija emulzionih sistema pomoću mešanih emulgatora [Barry i Rowe, 1989; Eccleston 1997, 2000, 2001, 2004; Junginger, 1997], korišćenih u izradi preparata (A₁, A₃ i A₅), objašnjava se teorijom gelske mreže. Utvrđeno je da je za stabilnost emulzija navedenim emulgatorima odgovorno formiranje specifičnih lamelarnih faza, (tečno kristalnih i gel), koje su u stanju da inkorporiraju velike količine vode.

Tečno-kristalne faze (TK) pokazuju karakteristike i tečnog i čvrstog agregatnog stanja i nazivaju se mezofaze. Zajedničko svojstvo sa tečnostima je manje ili više izražena sposobnost proticanja, a sa čvrstim telima uređeno, to jest kristalno stanje. Razlikuju se termotropni tečni kristali (koji nastaju zagrevanjem i topljenjem kristalnih supstanci i postoje samo u određenim temperaturnim opsezima) kao i liotropni tečni kristali koji nastaju u interakciji molekula amfifila i određenih rastvarača. Molekuli koji formiraju liotropne mezofaze nazivaju se mezogeni, a osnovni preduslov za njihovo formiranje je anizometrični oblik molekula. Masni alkoholi ispoljavaju izražen kristalni polimorfizam i pod određenim uslovima imaju tzv. α -kristalni oblik u kome su alkil lanci pakovani unutar dvosloja lamelarne faze. Kad dođe u kontakt sa vodom, ovaj polimorf stvara hidratizirani kristal u kome je određena količina vode inkorporirana između polarnih molekula amfifila u nizu. U prisustvu male količine jonske ili nejonske PAM dolazi do bubrenja hidrata i nastaje nabubrela α -kristalna gel faza (mezofaza), koja se karakteriše prisustvom lamelarnih dvoslojeva izgrađenih od komponanata emulgujućeg voska naizmenično

odvojenih dvoslojevima vode. Kapacitet bubrenja amfifila je nešto manji u prisustvu nejonskih PAM. Zagrevanjem, gel faza ima sposobnost da se na određenoj temperaturi (tzv. tranzicionoj tački tj. tranzicionoj temperaturi, T_c) transformiše u fazu sa alkil lancima u fluidnom tj. neuređenom stanju što se može videti na slici 37.



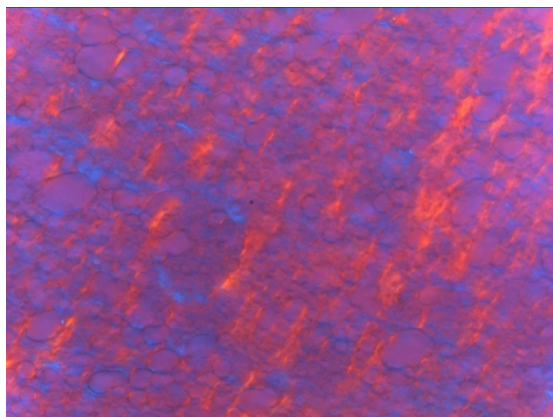
Slika 37. Transformacija gel faze u fazu tečnih kristala na tranzicionoj temperaturi, T_c

Tečno-kristalna faza ne bubri tako intenzivno kao niskotemperaturna gel-faza i naziva se lamelarna tečno-kristalna faza. Lamelarna tečno-kristalna faza (LTK) pokazuje svojstvo dvostrukog prelamanja polarizacije svetlosti. Posmatranjem ovih sistema pomoću polarizacionog mikroskopa sa postavljenom dodatnom λ -pločicom koja prelama svetlost, vide se teksture obojene u žutu, tirkiznu i ružičastu boju. Ova vrsta mikroskopije koristi se u svrhu vizuelizacije i karakterizacije faze tečnih kristala u emulzijama [Tasić-Kostov, 2013]. LTK ima izgled takozvanih uljanih pruga sa insertovanim malteškim krstovima koji nastaju kao posledica postojećih defekata prisutnih kod lamelarne faze odnosno koncentričnog postavljenja ravni slojeva. U ovim sistemima identifikuju se bar četiri faze, i to [Junginger 1997]: dispergovana uljana faza, kristalna gel faza sastavljena od dvoslojeva PAM i amfifila odvojenih debelim slojevima interlamelarno fiksirane vode, kristalni hidrati amfifila i džepovi (eng. *bulk*) slobodne

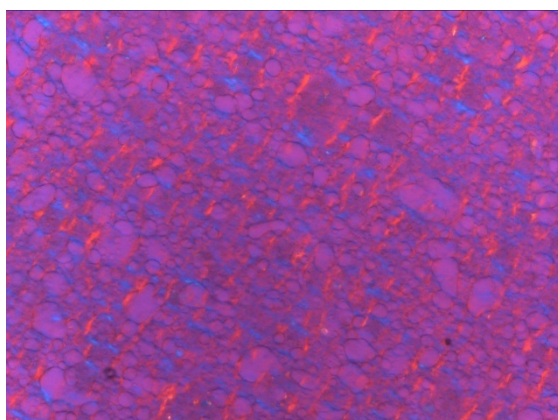
vode. Emulzije stabilisane fazom tečnih kristala koja je slična i kompatibilna strukturi lipida u SC, poseduju potencijal za inkorporiranje i hidrofilnih i lipofilnih supstanci [Makai i sar., 2003]. Ranije se smatralo da je LTK faza dominantna u većini U/V emulzija.

Međutim, teorija gelske mreže čije je osnove postavilo nekoliko istraživača, utvrđuje da struktura, kapacitet za formiranje i stabilnost emulzija tipa U/V stabilisanim mešanim emulgatorima zavisi od kapaciteta α -kristalne gel faze da interaguje sa kontinuiranom tj. vodenom fazom i bubri [Eccleston, 2010, Tasić-Kostov, 2013]. α -Kristalna gel faza se formira u višku mešanog emulgatora koji preostaje nakon formiranja monomolekularnog filma na granici kapi uljane faze. Gel faza (koja se na polarizacionim mikrografijama vidi u obliku pruga u spoljašnjoj fazi emulzije) je dominantna lamelarna faza u većini emulzija stabilizovanih mešanim emulgatorima [Eccleston 1997].

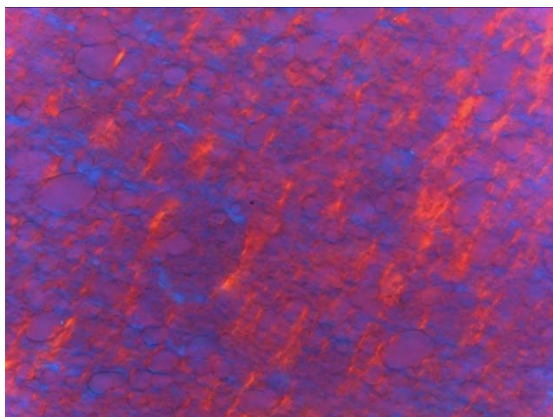
Na polarizacionim mikrografijama svih ispitivanih uzoraka U/V kremova uočava se prisustvo anizotropije različitog tipa i intenziteta, karakteristične za prisustvo mezofaza-LTK. Ranije se smatralo da je LTK faza (koja se na polarizacionom mikroskopu vizualizuje kao malteški krst ili "*onion ring*" oko kapi unutrašnje faze) dominantna u većini U/V emulzija. Međutim, utvrđuje da struktura i kapacitet za formiranje i stabilnost emulzija tipa U/V stabilisanih mešanim emulgatorima zavisi od kapaciteta α -kristalne gel faze da interaguje sa vodenom fazom i bubri [Eccleston, 2010]. α -Kristalna gel faza se formira u višku mešanog emulgatora koji preostaje nakon monomolekularnog filma na granici kapi uljane faze; upravo je pomenuta gel faza (koja se na polarizacionim mikrografijama vidi u obliku pruga u spoljašnjoj fazi emulzije) dominantna lamelarna faza u većini emulzija stabilizovanih mešanim emulgatorima [Eccleston, 1997]. Na polarizacionim mikrografijama ispitivanih uzoraka U/V kremova uočava se prisustvo dispergovanih kapi uljane faze kao i tirkizno i ružičasto obojene pruge, nepravilno raspoređene, za koje možemo da smatramo da se pojavljuju usled formiranja lamelarne tečno-kristalne faze odnosno α -kristalne gel faze koje obrazuju mešani emulgatori i stabilizuju izrađene kremove. Petpostavka je da relativno visok sadržaj masnih alkohola u kremovima (4%), sa takođe značajnim procentom prisutnog nejonskog emulgatora doprinosi formiranju ovih struktura [Eccleston 1997, 1988, 2010, Junginger, 1997]. Intenzitet obojenih pruga kod ispitivanih uzoraka A₁, A₃ i A₅ (slike 49-51, respektivno) se razlikuje što je uslovljeno prisustvom ili odsustvom alantoina i drugih komponenti ekstrakta gaveza.



Slika 38. Polarizaciona mikrografija uzorka A1



Slika 39. Polarizaciona mikrografija uzorka A3



Slika 40. Polarizaciona mikrografija uzorka A5

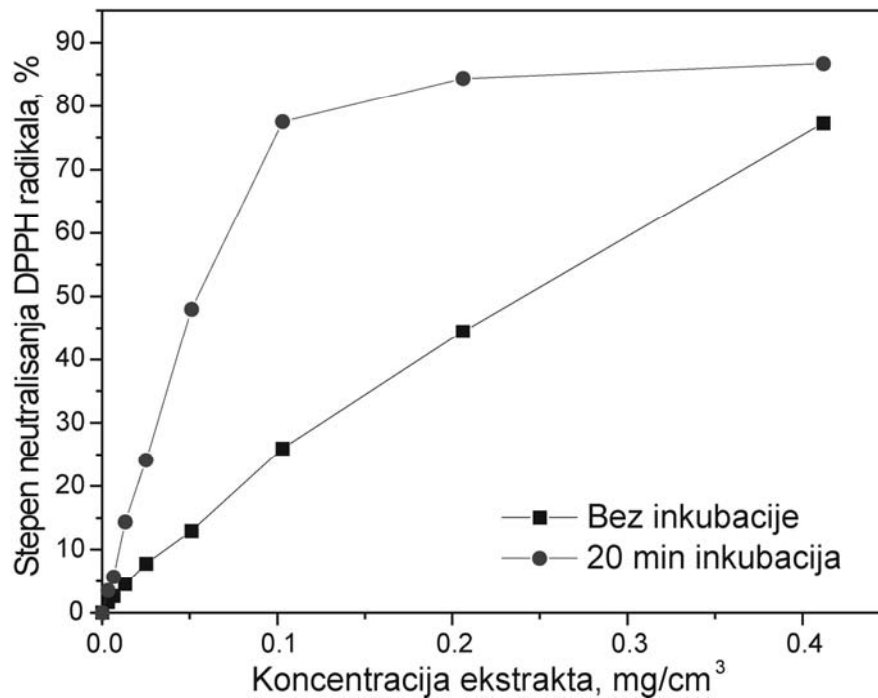
Placebo krem (Slika 38) sadrži u većoj meri kapi ulja dispergovane u spoljašnjoj vodenoj fazi, sa relativno slabo prisutnim obojenim prugama dok se u kremu sa disperzijom alantoina (Slika 39) uočava značajna pojava insertovanih, obojenih pruga čija brojnost ukazuje na intenzivnije formiranje lamelarne tečno-kristalne faze odnosno α -kristalne gel faze mešanog emulgatora. Ovo ukazuje na olakšanu hidrataciju prisutnih masnih alkohola (cetil i stearyl) i komponenata nejonskog emulgatora u prisustvu alantoina koji svojom hidrofilnošću verovatno doprinosi akumulaciji molekula vode oko polarnih delova pomenutih amfifilnih struktura mešanog emulgatora, olakšavajući stabilizaciju sistema.

Krem sa disperzijom suvog ekstrakta korena gaveza (Slika 40) pokazuje najintenzivnije prisustvo struktura koje ukazuju na stabilizaciju sistema formiranjem tečno kristalne i α -kristalne gel faze, što se ogleda u mnoštvu tirkiznih i žutih struktura na polarizacionim mikrografijama krema. Možemo pretpostaviti da prisustvo alantoina ali i drugih konstituenata ekstrakta korena gaveza koji za sebe vezuju vodu, utiče na formiranje debelih slojeva interlamelarno fiksirane vode između dvoslojeva PAM-a i amfifila obrazujući strukture koje dovode do stabilizacije sistema. U strukturi ovog krema, takođe, uočavaju se džepovi vode i dispergovane kapi unutrašnje, masne faze. Uočeno, je najintenzivnije prisustvo stabilizacionih struktura u kremu sa ekstraktom gaveza u odnosu na krem sa alantoinom što ukazuje na značaj supstanci prisutnih u ekstraktu koji zajedno sa alantoinom dodatno stabilizuju strukturu izrađenog U/V krema. Krem sa ekstraktom korena gaveza zbog toga treba da predstavlja sistem koji ima dobru stabilnost, a takođe i dobar potencijal za vlaženje kože.

4.5. Farmakološke aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza i formulacija za topikalnu primenu

4.5.1. Antioksidativna aktivnost

Supstance detektovane i kvantifikovane u vodenom ekstraktu korena gaveza potencijalni su antioksidansi. DPPH test se zasniva na reakciji razmene atoma vodonika između antioksidansa i stabilnog DPPH radikala [Choi i sar. , 2002, Aquino i sar. , 2002, Sanchez-Moreno 2002]. Na Slici 41 prikazan je stepen neutralisanja DPPH radikala vodenim ekstraktom korena gaveza.



Slika 41. Antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza (hidromodul 1:10 m/v; vreme ekstrakcije 240 min)

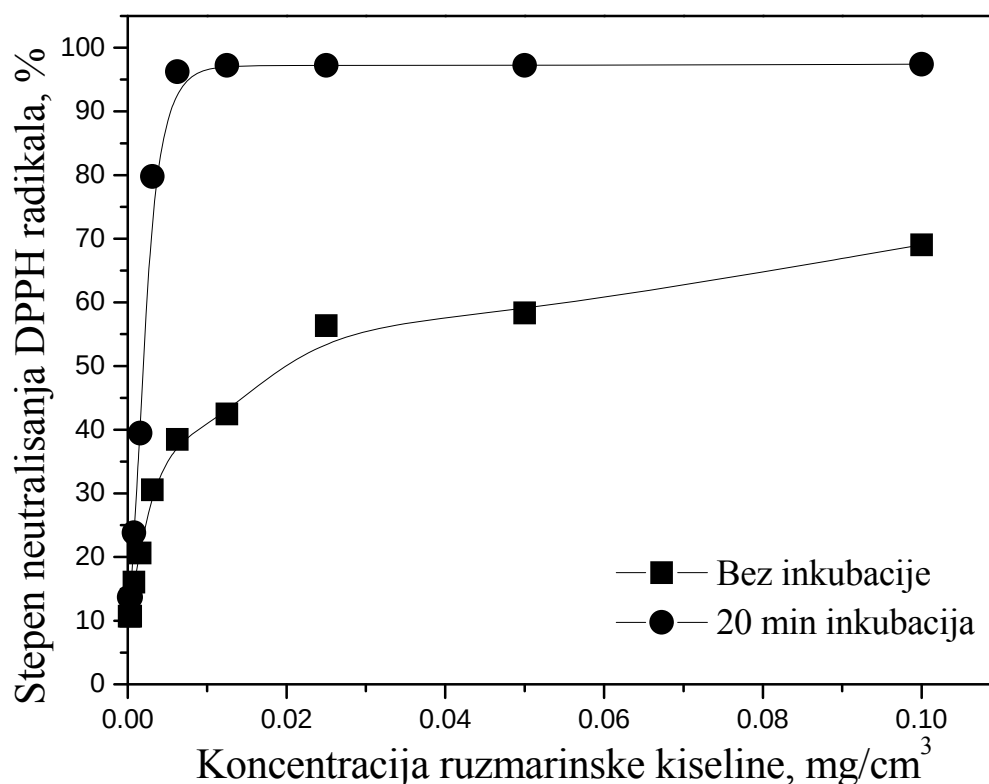
Sa Slike 41 se vidi da se sa koncentracijom ekstrakta od 0,15 mg/cm³ koji je inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi postiže stepen neutralisanja DPPH radikala preko 80%, i neznatno se povećeva sa daljim povećanjem koncentracije ekstrakta. U slučaju neinkubiranog uzorka stepen neutralisanja DPPH radikala povećava se sa povećanjem koncentracije ekstrakta. Najveći stepen neutralisanja DPPH radikala od 77,3% postignut je sa koncentracijom neinkubiranog vodenog ekstrakta korena gaveza od oko 0,4 mg/cm³.

Uporedo je ispitivana antioksidativna aktivnost alantoina, kao standardne komponente. Alantoin u koncentracijama do 0,15 mg/cm³ ne pokazuje antioksidativnu aktivnost prema DPPH radikalu.

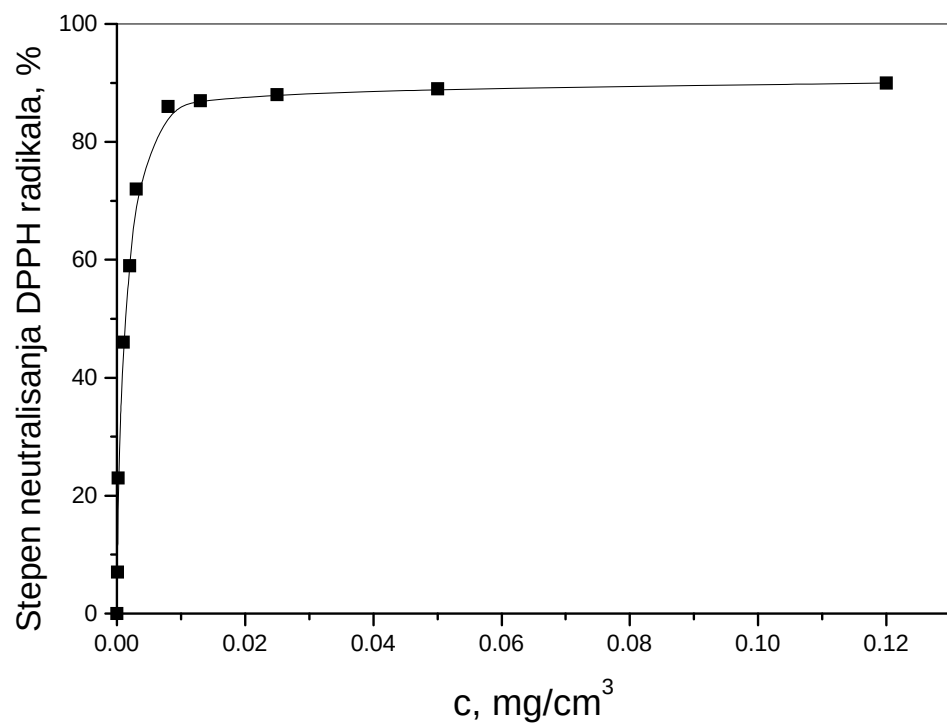
Na osnovu prikazanih rezultata dolazimo do zaključka da antioksidativno dejstvo ekstrakta gaveza ne potiče od alantoina, već je verovatno posledica sinergističkog dejstva drugih komponenti prisutnih u biljnom materijalu, pre svega visokog sadržaja ukupnih fenola i flavonoida koji su poznati prirodni antioksidansi.

Zbog visokog sadržaja ruzmarinske i elaginske kiseline u ekstraktu urađeno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti standarda. Upoređena je njihova antioksidativna aktivnost sa sintetskim antioksidansom butil hidroksi toluolom (BHT).

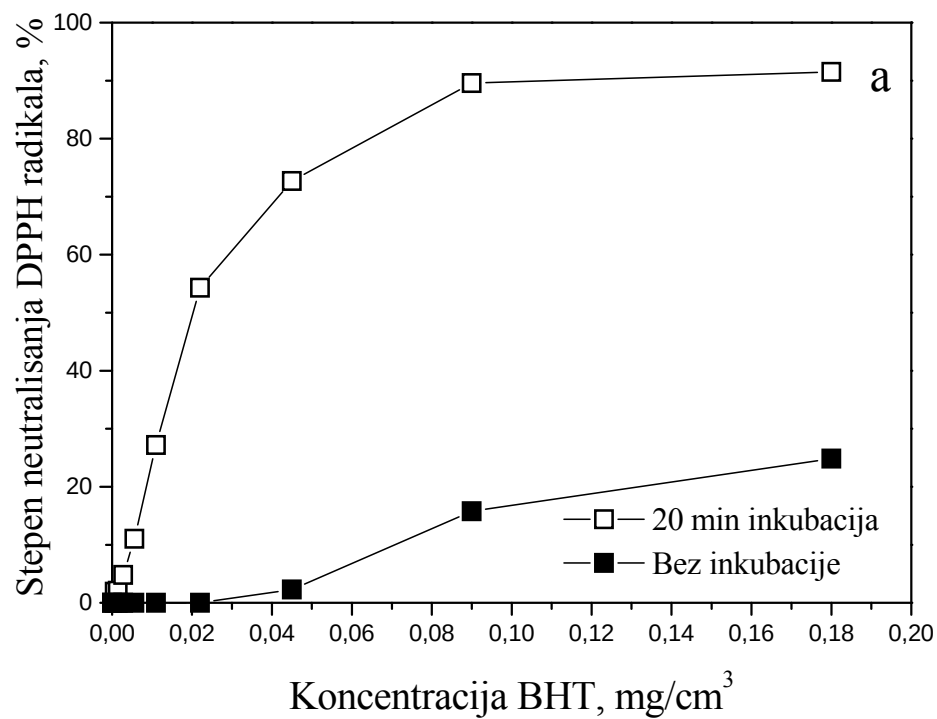
Na slikama 42, 43 i 44 prikazana je antioksidativna aktivnost ruzmarinske kiseline, elaginske kiseline i sintetskog antioksidansa BHT-a, respektivno, a u Tabeli 21 date su EC_{50} vrednosti svih ispitivanih uzoraka.



Slika 42. Antioksidativna aktivnost ruzmarinske kiseline



Slika 43. Antioksidativna aktivnost elaginske kiseline



Slika 44. Antioksidativna aktivnost sintetskog antioksidansa butil hidroksi toluola

Tabela 21. EC₅₀ vrednosti vodenog ekstrakta gaveza, standardnih komponenti i sintetskog antioksidansa BHT (DPPH test, uzorci inkubirani 20 min)

Komponenta	EC ₅₀ , µg/cm ³
Ruzmarinska kiselina	1,76
Elaginska kiselina	0,987
BHT	21,00
Vodeni ekstrakt korena gaveza	48,00

EC₅₀- koncentracija ispitivanog uzorka potrebna za neutralisanje 50% početne koncentracije DPPH radikala.

Iz Tabele 21, kao i sa slika (slike 41-44) vidi se da su elaginska i ruzmarinska kiselina mnogo jači antioksidansi od BHT-a, sintetskog antioksidansa, koji se koristi kao antioksidans u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima. Sintetski antioksidansi pokazuju niz štetnih efekata na ljudski organizam što upućuje na mogućnost njihove zamene sa prirodnim. Visok sadržaj ukupnih fenola, ruzmarinske i elaginske kiseline u vodenom ekstraktu korena gaveza upućuje da vodeni ekstrakt korena gaveza može biti uspešna zamena za sintetske antioksidanse. Ograničavajući faktor je to da je upotreba gaveza ograničena na topikalne preparate [EMEA/HMPC/246736/2005].

Na osnovu prikazanih EC₅₀ vrednosti za ispitivane uzorke može se zaključiti da antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza najviše potiče od elaginske i ruzmarinske kiseline kao i od drugih prisutnih polifenolnih jedinjenja.

4.5.2. Antimikrobna aktivnost

U cilju ispitivanja farmakoloških aktivnosti vodenog ekstrakta korena gaveza određena je njegova antimikrobna aktivnost i aktivnost supstanci detektovanih i kvantifikovanih u većim količinama u ekstraktu, alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline.

Potvrđeno je da antimikrobnu aktivnost poseduju brojni polifenolni sastojci biljaka (jednostavni polifenoli, fenolne kiseline, lignani, hinoni, flavonoidi, tanini, kumarini), terpenoidi i etarska ulja, alkalodi, lektini, polipeptidi, poliacetileni, masne kiseline pa čak i neki jednostavni šećeri i organske kiseline [Hammer i sar., 1999].

Prema klasifikaciji antimikrobnog potencijala, zasnovanog na MIC vrednostima biljnih izolata, postoje tri nivoa aktivnosti: jaki inhibitori (MIC manje od 0,5 mg/cm³), umereni inhibitori (MIC u opsegu 0,6-1,5 mg/cm³) i slabi inhibitori (MIC veće od 1,6 mg/cm³) [Aligiannis i sar., 2001].

Minimalna inhibitorna koncentracija i minimalna baktericidna i fungicidna koncentracija vodenog ekstrakta korena gaveza i alantoina dati su u Tabeli 22.

Tabela 22. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, mg/cm³) i minimalna baktericidna i fungicidna koncentracija (MBC/MFC, mg/cm³) alantoina i vodenog ekstrakta korena gaveza

Bakterije	Testirani uzorci				Pozitivna kontrola				Negativna kontrola	
	Alantoin (C ₀ =10mg/cm ³)		Vodeni ekstrakt korena gaveza (C ₀ =40 mg/cm ³)		Doksiciklin (µg/cm ³)		Nistatin (µg/cm ³)		Sterilna voda	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MBC/MFC
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	–	–	–	–	1,56	1,56	nt ¹	nt ¹	na ²	na ²
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	–	–	10	40	0,78	0,78	nt ¹	nt ¹	na ²	na ²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27857)	–	–	–	–	12,5	12,5	nt ¹	nt ¹	na ²	na ²
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	–	–	10	20	6,25	<50,0	nt ¹	nt ¹	na ²	na ²
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	–	–	–	–	6,25	0,78	nt ¹	nt ¹	na ²	na ²
Gljivice										
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	–	–	–	–	nt ¹	nt ¹	0.78	0.78	na ²	na ²
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	–	–	–	–	nt ¹	nt ¹	6.25	6.25	na ²	na ²

nt¹-testiranje uzoraka/standarda nije izvršeno; na²-ispitivana supstanca ne pokazuje aktivnost
c₀- početna koncentracija ispitivanih uzoraka

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti su pokazali da su gram-negativne bakterije *Escherichia coli* ATCC8739 i *Salmonella typhimurium* ATCC6538 osjetljive na vodeni ekstrakt korena gaveza [Savić i sar., 2014]. Međutim, s druge strane vodeni ekstrakt korena gaveza nije pokazao antimikrobnu aktivnost na ispitivane sojeve gljivica.

Za razliku od vodenog ekstrakta korena gaveza alantoin, ne pokazuje antimikrobnu aktivnost na *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, kao i na ostale ispitivane sojeve mikroorganizama. S obzirom da antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza ne potiče od alantoina, dalje je ispitivana osjetljivost istih mikroorganizama na ruzmarinsku i elaginsku kiselinu koje su također važni farmakološki agensi detektovani u većim količinama u vodenom ekstraktu korena gaveza.

U Tabeli 23 dati su rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ruzmarinske i elaginske kiseline na iste sojeve mikroorganizama na koje su testirani i vodeni ekstrakt korena gaveza i alantoin.

Tabela 23. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, mg/cm³) i minimalna baktericidna i fungicidna koncentracija (MBC/MFC, mg/cm³) ruzmarinske i elaginske kiseline

Mikroorganizmi	Ruzmarinska kiselina (mg/cm ³)		Elaginska kiselina (mg/cm ³)		Doksiciklin/ Nistatin (mg/cm ³)		DMSO (10%)
	MIC	MBC/ MFC	MIC	MBC/ MFC	MIC	MBC/ MFC	
Bakterije							
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	0,63	>5,00	0,63	>2,50	1,56	1,56	n.a.
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0,04	0,16	0,63	>2,50	0,78	6,25	n.a.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	1,25	1,25	1,25	2,50	0,78	0,78	n.a.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0,63	1,25	1,25	2,50	12,50	12,50	n.a.
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	0,63	>5,00	2,50	>2,50	6,25	>50,00	n.a.

Nastavak Tabele 23.

Gljivice							
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2,50	>5,00	1,25	>2,50	6,25	6,25	n.a.
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	2,50	5,00	1,25	2,50	0,78	0,78	n.a.
n.a. – neaktivan							

Početna koncentracija pri ispitivanju mikrobiološke aktivnosti ruzmarinske kiseline je $c=10\text{mg}/\text{cm}^3$, a elaginske kiseline, $c=5\text{mg}/\text{cm}^3$

Ruzmarinska i elaginska kiselina su pokazale antimikrobnu aktivnost na sve uzorke gram negativnih i gram pozitivnih bakterija, kao i na gljivice.

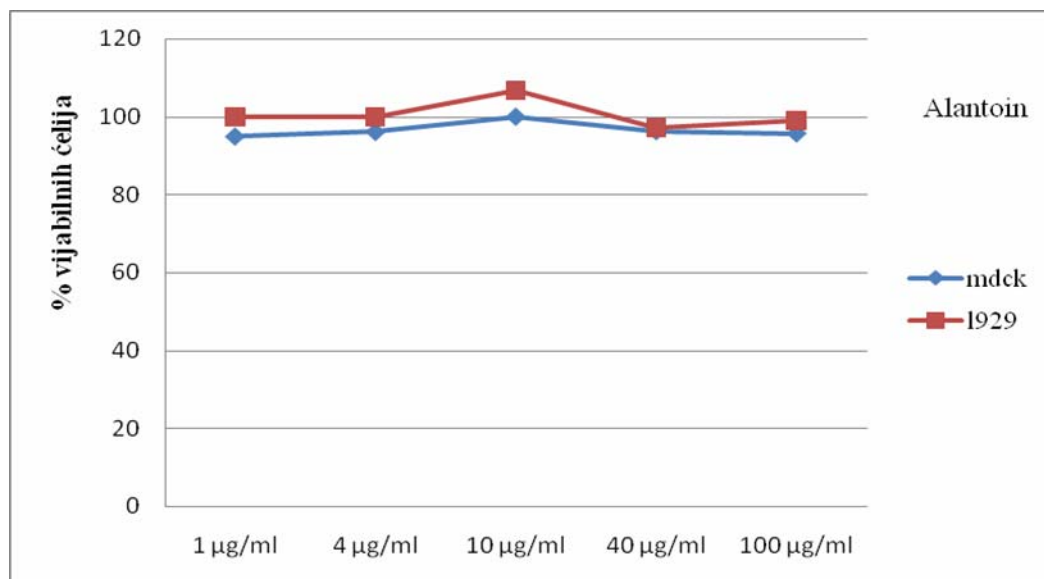
S obzirom da su ruzmarinska i elaginska kiselina sadržane u vodenom ekstraktu korena gaveza (7,4, 12,8g/100g s.e., respektivno), antimikrobna aktivnost na gram-negativne bakterije vodenog ekstrakta korena gaveza najverovatnije jednim delom potiče od ovih kiselina. U literaturi je zabeleženo da fenolne kiseline bolje deluju na gram-pozitivne bakterije, pa se može pretpostaviti da neke druge komponente prisutne u vodenom ekstraktu korena gaveza modifikuju delovanje ovih kiselina.

4.5.3. Vijabilnost i proliferacija ćelijskih linija MDCK i L929 u *in vitro* uslovima

U proceni antiirritacionog potencijala dermatoloških lekova i dermatokozmetičkih proizvoda koriste se alternativne *in vitro* metode, kao što su testovi citotoksičnosti i vijabilnosti na kulturama epitelnih ćelija i fibroblasta. Izvođenje testova citotoksičnosti na određenim ćelijskim linijama dobra je alternativa skupim i etički neopravdanim testovima na životinjama.

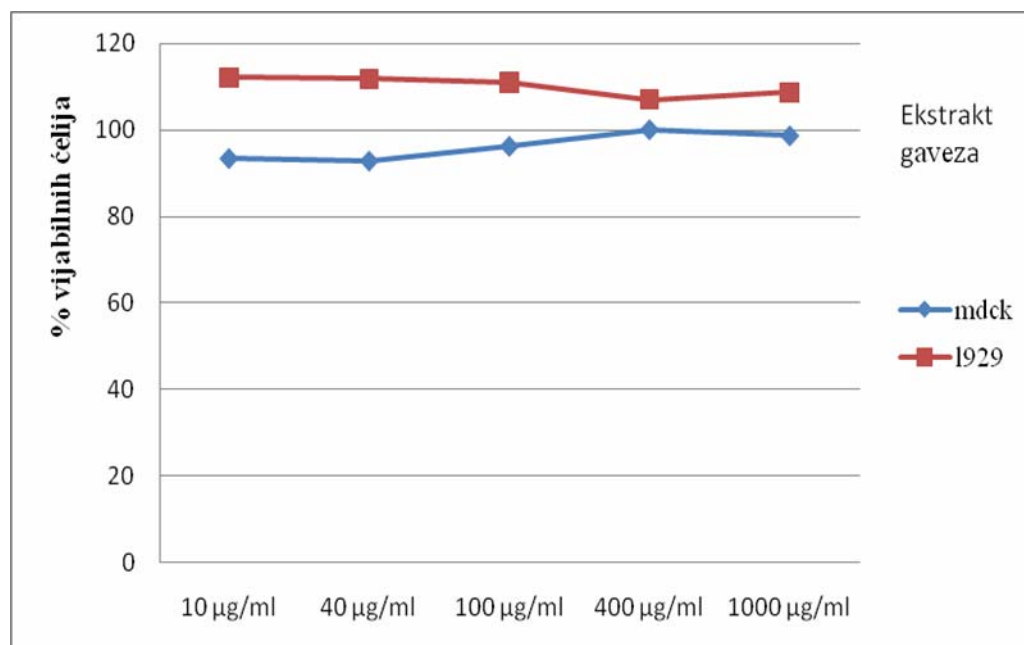
Testovi vijabilnosti

U svim ispitivanim koncentracijama standarda alantoina, nije bilo promena u vijabilnosti obe ćelijske kulture (MDCK i L929) kao ni ćelija u odnosu na kontrolnu kulturu što je prikazano na Slici 45.



Slika 45. Efekat standrda alantoina na vijabilnost ćelija MDCK i L929

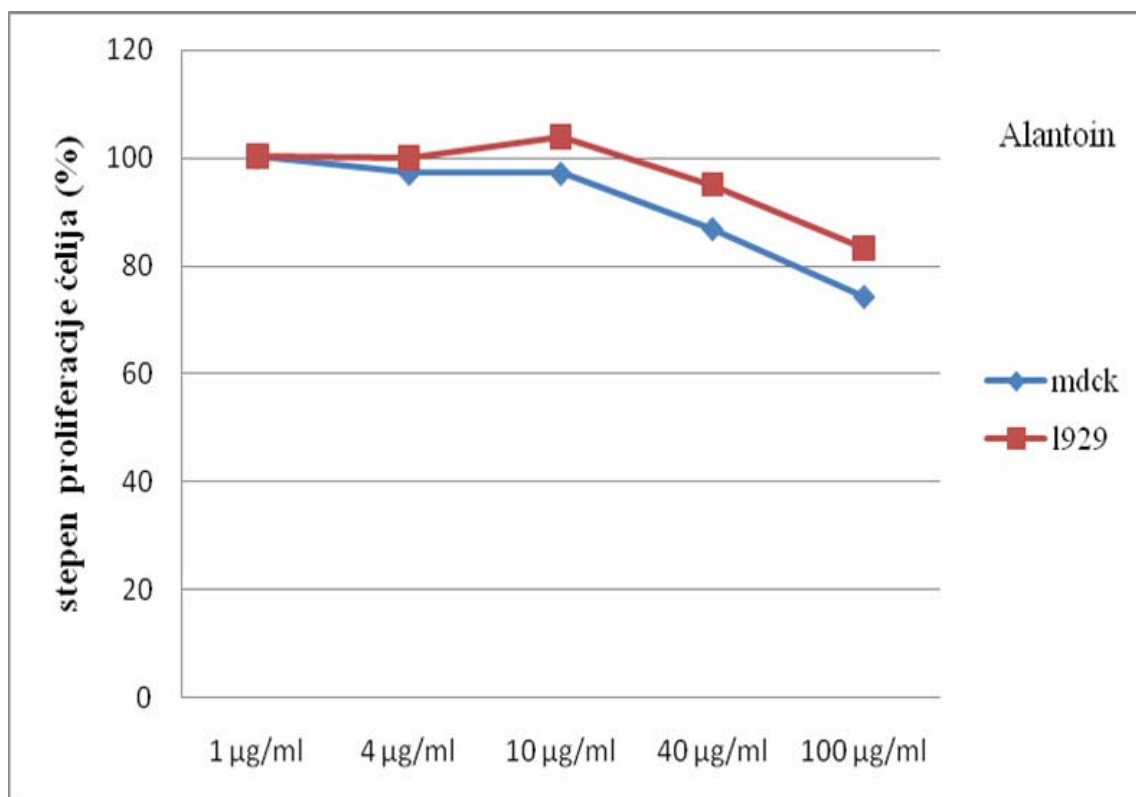
Ekstrakt gaveza je u svim ispitivanim koncentracijama pokazao blago stimulatorni efekat na vijabilnost L929 ćelija. Nije bilo promena u vijabilnosti MDCK ćelija koje su tretirane istim koncentracijama ekstrakta gaveza tj. vrednosti apsorbance za sve ispitivane koncentracije bile su u nivou vrednosti apsorbance kontrolne kulture što je prikazano na Slici 46.



Slika 46. Efekat ekstrakta gaveza na vijabilnost ćelija MDCK i L929

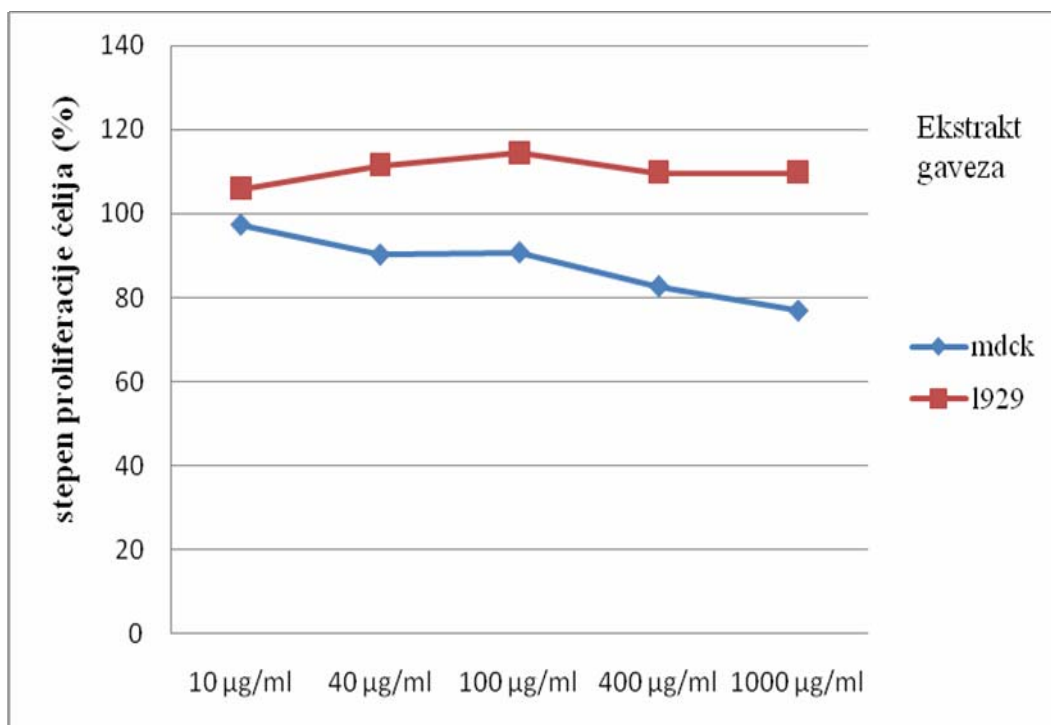
Testovi proliferacije

Najveća koncentracija alantoina ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) delovala je blago inhibitorno na rast ćelija obe ćelijske linije sa nešto jače izraženom inhibicijom rasta MDCK ćelija. Ostale ispitivane koncentracije alantoina nisu delovale inhibitorno na rast obe ćelijske kulture MDCK i L929 (Slika 47).



Slika 47. Efekat standarda alantoina na proliferaciju ćelija MDCK i L929

Sve ispitivane koncentracije ekstrakta gaveza delovale su blago stimulatorno na rast L929 ćelija. U koncentracijama od $1 \text{mg}/\text{cm}^3$ i $0,4 \text{mg}/\text{cm}^3$ ekstrakt gaveza pokazao je blag inhibitorni efekat na rast MDCK ćelija pri čemu je vrednost apsorbancije bila oko 80% od vrednosti apsorbancije kontrole. Ostale ispitivane koncentracije ekstrakta gaveza samo su blago smanjivale vrednost apsorbancije pri čemu to smanjenje nije statistički značajno (Slika 48).



Slika 48. Efekat ekstrakta korena gaveza na proliferaciju ćelija MDCK i L929 u kulturi.

Vrednosti koeficijenta varijacije za sve ispitivane supstance i njihove koncentracije na obe ćelijske linije u oba ispitivanja bili su ispod 10%.

Dve ćelijske linije na kojima su vršena ispitivanja se razlikuju u karakteristikama rasta tokom 72 sata pod delovanjem i alantoina i vodenog ekstrakta gaveza i to se po pravilu vidi na većim ispitivanim koncentracijama. Tako u prisustvu ekstrakta gaveza L929 je blago stimulisan u rastu, a MDCK ćelije su blago inhibirane. Sa druge strane, alantoin na višim ispitivanim koncentracijama inhibira rast kultura obe ćelijske linije, ali više MDCK ćelije. U postavci ove *in vitro* studije smo paralelno koristili ćelijske linije epitelne i fibroblastne karakteristika da bi se na celularnom nivou sagledali i procenili efekte ispitivanih supstanci na kožu. Pošto je iritacioni efekat obično povezan sa povećanim proliferativnim odgovorom epiderma [Ehrhardt Proksch i sar., 2006], rezultati antiproliferativnog delovanja ekstrakta gaveza na kulturi epitelne ćelije ukazuju da to može biti jedan od celularnih mehanizama njegovog antiiritacionog delovanja.

Iritacija je stanje inflamacije koja se nastavlja kroz faze zaceljenja u koju je uključena aktivnost fibroblasta [Araújo i sar 2012], kao što je njihova proliferacija i kolagenosinteza. Imajući navedene činjenice u vidu, dobijeni stimulatorni efekat na rast fibroblasta je važan celularni pokazatelj povoljne evolucije iritacionog stanja pod delovanjem ekstrakta gaveza.

Alantoin i ekstrakt gaveza deluju različito na ćelije u kulturi, pa iako je alantoin značajno zastupljena komponenta u ekstraktu korena gaveza, očigledno nije moguće pripisati alantoinu nađene efekte ekstrakta na ispitivane ćelijske kulture. Opisani efekti alantoina i ekstrakta gaveza na MDCK i L929 ćelije upućuju takođe na povoljniji efekat ekstrakta gaveza nego samog alantoina, što znači da ekstrakt korena gaveza ima veću biološku aktivnost nego čist alantoin..

Rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima testiranja vodenog ekstrakta korena gaveza pokazuju da on ima blag stimulatorni efekat na vijabilnost i proliferaciju fibroblasta linije L929.

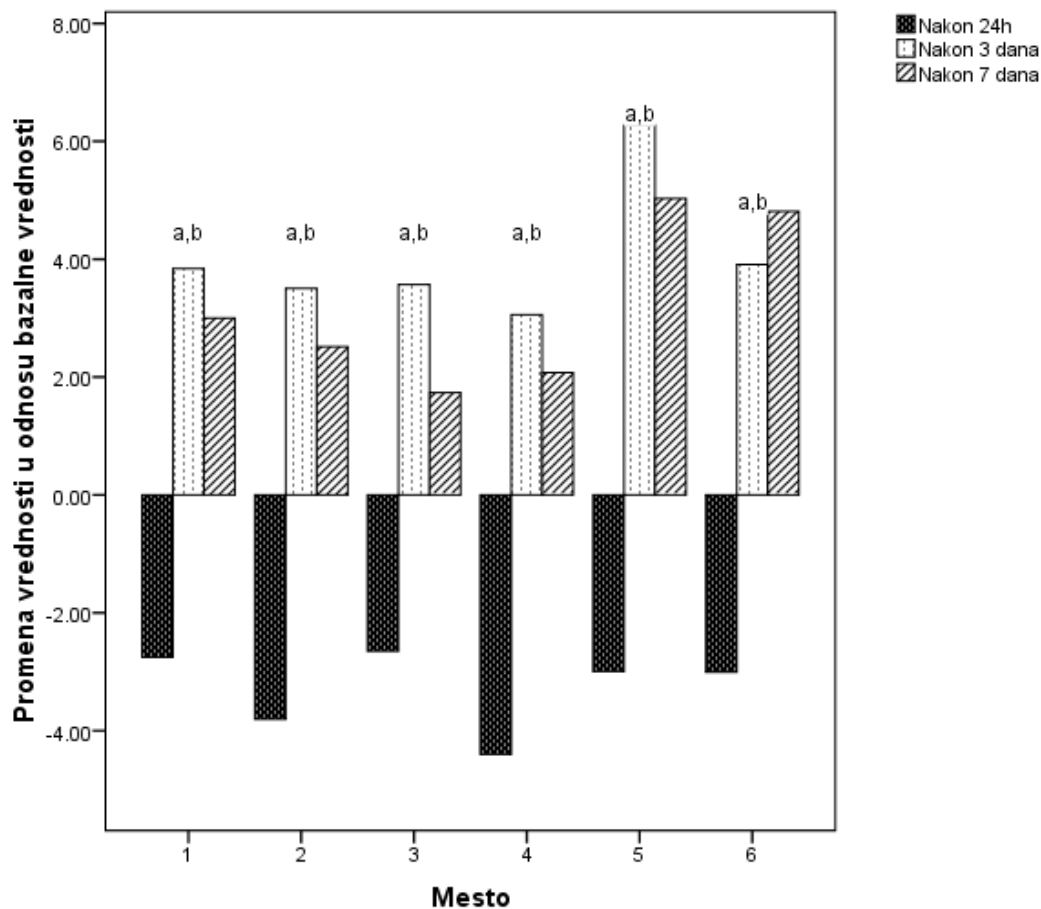
4.5.4. *In vivo* ispitivanja antiirritacionog potencijala

Istraživanje *in vitro* uticaja ekstrakta na proliferaciju i vijabilnost ćelijskih linija ukazao je da dalja ispitivanja treba vršiti u *in vivo* uslovima. U *in vivo* uslovima ispitan je uticaj kremova i gela sa vodenim ekstraktom korena gaveza i alantoinom na obnavljanje narušene kožne barijere.

Iritacija kože je kompleksni biološki proces, obično opisan kliničkom manifestacijom i hemijskim i fizičkim izazivačima. Reakcija može nastati nakon jednog ili ponovljenog izlaganja dejstvu izazivača. Kao posledica može nastati dezorganizacija *stratum corneum*, eritem, narušavanje kožne barijere sa kasnijim porastom gubitka transdermalne vode, povećanjem pH i stimulacijom produkcije citokina [Jolly Mariam i sar., 2011, Arsić i sar., 2012].

Efekat tretmana antiiritantnim agensima se procenjuje korišćenjem kliničkog bodovanja (subjektivnom evaluacijom) i merenjem biofizičkih parametara kože: električne kapacitivnosti (EC), eritema indeksa (EI) i transepidermalnog gubitka vlage (TEWL) pre i posle aplikacije u određenim vremenskim intervalima na zdravim dobrovoljcima na eksperimentalno izazvanoj akutnoj iritaciji [Andersen Flemming i sar., 2006, Savić i sar., 2011]. *In vivo* ispitivanje antiirritacionog potencijala kremova i gela sa ekstraktom korena gaveza i alantoinom na ispitanicima dobrovoljcima praćeno je preko promena biofizičkih parametara (EC, EI i TEWL) na koži.

Na Slici 49 prikazana je promena vrednosti parametara EC u odnosu na bazalne vrednosti na mestima aplikacije uzoraka (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A_5 i A_6).



I mesto: a: $p=0,001$, b: $p=0,019$,

II mesto: a: $p=0,002$, b: $p=0,001$,

III mesto: a: $p=0,005$, b: $p=0,005$,

IV mesto: a: $p=0,004$, b: $p=0,001$,

V mesto: a: $p=0,002$, b: $p=0,001$,

VI mesto: a: $p=0,008$, b: $p=0,002$

Slika 49. Promena vrednosti EC u odnosu na bazalne vrednosti po mestima ispitivanja

Poremećaj *stratum corneum* barijere koji izazivaju surfaktanti, posebno NaLS, uključuje lipidni dvosloj [Hachem i sar., 2003]. Okluzija sa 12% rastvorom NaLS u provokativnom testu iritacije značajno snižava nivo hidratacije kože 24 sata nakon iritacije u odnosu na bazalne vrednosti na svim test mestima. Bazalne vrednosti ispitanika kreću se u opsegu 22, 62-24, 87 što se vidi iz Tabele 24.

Tabela 24. Promena EC nakon više merenja

Ispitivano mesto	Bazalne vrednosti	Nakon iritacije	Nakon 3 dana aplikacije	Nakon 7 dana aplikacije	Statistička značajnost, p
1	24,57±6,31	21,81±7,43	28,41±6,21	27,57±7,10	0,002
2	23,79±4,67	19,98±6,36	27,29±6,78	26,30±4,79	<0,001
3	22,98±4,58	20,32±6,13	26,54±5,13	24,71±4,25	0,001
4	24,87±3,94	20,47±4,64	27,93±6,02	26,94±6,26	0,001
5	23,69±4,81	20,69±5,26	29,96±6,21	28,72±6,29	<0,001
6	22,62±5,97	19,62±5,61	26,53±5,18	27,43±5,12	<0,001

Na svih šest mesta došlo je do statistički značajne promene u vrednostima EC u periodu od iritacije do sedmog dana. Promena faktora po mestima ispitivanja je sledeća: mesto 1: Greenhouse-Geisser $F=7,917$, $p=0,002$; mesto 2: Greenhouse-Geisser $F=10,866$, $p<0,001$, mesto 3: Greenhouse-Geisser $F=8,113$, $p=0,001$, mesto 4: Greenhouse-Geisser $F=8,129$, $p=0,001$, mesto 5: Greenhouse-Geisser $F=13,473$ $p<0,001$ i mesto 6: Greenhouse-Geisser $F=9,549$, $p<0,001$. Ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima EC na mestima 1, 3 i 5 u ponovljenim merenjima (Greenhouse-Geisser $F=838$, $p=0,541$). Pokazano je da na mestima 2, 4 i 6 ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima EC u ponovljenim merenjima (Greenhouse-Geisser $F=0,323$, $p=0,908$).

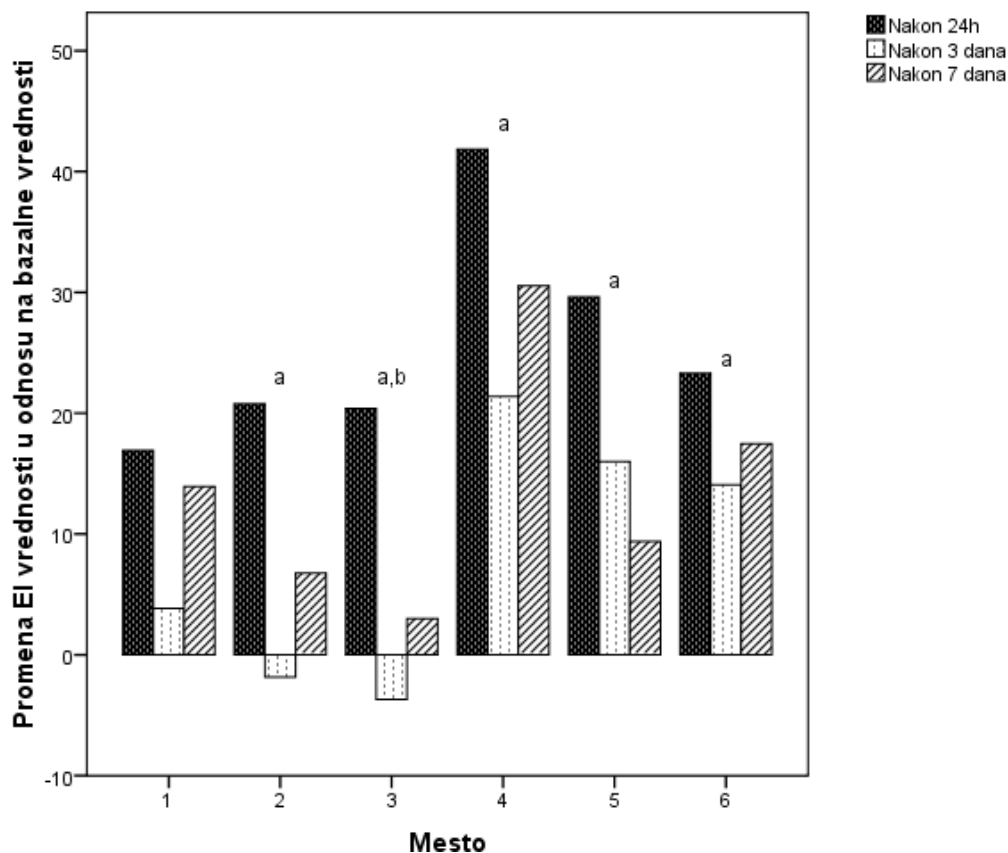
Posle testa iritacije (24 h nakon iritacije) sa 12% rastvorom NaLS značajno je snižen nivo hidratacije kože u odnosu na bazalne vrednosti, na svim mernim mestima, što pokazuje opseg vrednosti parametara EC (19, 62-21, 81) (Tabela 24). Ove vrednosti ukazuju na povećanje suvoće kože koja je prateća manifestacija iritacije [Held i sar., 2001]. Nakon trodnevne aplikacije uzoraka A1-A6 dolazi do statistički značajnog porasta vrednosti EC kod svih šest mesta aplikacije. Oporavak hidratacije kože je zapažen i kod aplikacije kremova (A_3 , A_5), i gelova (A_4 , A_6) sa aktivnim sastojcima kao i kod placebo uzoraka (A_1 , A_2) ali različitim intenzitetom. Efikasniji uticaj kremova i gelova sa alantoinom i ekstraktom u odnosu na placebo uzorke posledica je prisustva aktivnih agenasa (alantoina i ekstrakta), što je i očekivano s obzirom na dosadašnje podatke iz literature [Araujo i sar.,2012]. Odgovarajući kremovi pokazuju bolju hidrataciju u odnosu na gelove (placebo krem u odnosu na placebo gel, krem sa alantoinom u

odnosu na gel sa alantoinom kao i krem sa ekstraktom u odnosu na gel sa ekstraktom). Bolja hidratacija kremova u odnosu na gelove posledica je verovatno brzog oslobađanja vode iz spoljašnje faze krema u toku aplikacije kremova i „rušenja“ njihove strukture udruženog sa okluzivnim efektom masnih komponenti kremova. Faza lipidizacije površine iritirane kože izostaje nakon primene gelova koji ne sadrže emolijentne lipofilne supstance, pa otuda i njihov slabiji uticaj na vlažnost kože.

Najbolji uticaj na parametar EC posle tri dana aplikacije imao je uzorak A₅-ekstrakt gaveza inkorporiran u krem (Slika 49, Tabela 24) . Ovo ukazuje na činjenicu da i drugi sastojci iz ekstrakta utiču na hidrataciju kože pa ekstrakt zbirno ostvaruje bolji efekat na vlažnost kože u odnosu na čist alantoin. Obzirom da je vodeni ekstrakt korena gaveza dobijen kao neviskozni rastvor Soxhlet ekstrakcijom gde je čaura od filter papira bila barijera za prelaz polimernih molekula u ekstrakt, koji su prema literaturi vlažeći agensi, a kojih u ekstraktu skoro da nema, možemo pretpostaviti da su i bioaktivni molekuli manje molekulske mase detektovani u ekstraktu odgovorni za vlažeće efekte na koži.

Posle sedam dana aplikacije svih ispitivanih uzoraka, vlažnost kože na mernim mestima je nešto niža u odnosu na period posle tri dana aplikacije ali još uvek viša u odnosu na bazalne vrednosti mada razlika u odnosu na bazalne vrednosti nema statističku značajnost (najveća vrednost za p je 0,002). Ovo ukazuje na značajan potencijal vlaženja kože ispitivanih uzoraka. Najefikasniju hidrataciju pružaju krem i gel sa ekstraktom u odnosu na krem i gel sa alantoinom, a takođe je zadržan efikasniji uticaj kremova na vlažnost kože u odnosu na gel sisteme.

Rezultati ispitivanja promene EI za sva šest mesta na koži ispitanika prikazani su na Slici 50.



I mesto: a –nakon 24 vs nakon 3 dana, b –nakon 24h vs nakon 7 dana, c –3 dana vs 7 dana

II mesto (a: $p=0,006$);

III mesto (a : $p=0,002$, b: $p=0,039$);

IV mesto (a: $p=0,002$);

V mesto(a: $p=0,023$);

VI mesto (a: $p=0,014$)).

Slika 50. Promena vrednosti EI u odnosu na bazalne vrednosti po mestima ispitivanja

Kao što je i očekivano, vrednost parametra EI, koji je mera eritema kože je značajno porasla nakon iritacije (opseg 196, 62-229, 92) na svim testiranim mestima u odnosu na bazalne vrednosti (opseg 173, 31-195, 65) (Tabela 25).

Tabela 25. Promena EI nakon više merenja

Ispitivano mesto	Bazalne vrednosti	Nakon iritacije	Nakon 3 dana aplikacije	Nakon 7 dana aplikacije	Statistička značajnost, p
1	195,69±44,03	212,62±45,57	199,54±58,05	209,62±53,45	0,252
2	179,23±41,71	200,00±45,34	177,38±42,07	186,00±39,81	0,012
3	179,31±44,79	199,69±45,31	175,62±45,64	182,31±51,04	0,024
4	188,08±46,74	229,92±67,11	209,46±62,14	218,62±58,96	0,074
5	177,38±44,91	207,00±56,81	193,38±68,07	186,77±46,36	0,166
6	173,31±38,68	196,62±50,69	187,38±49,99	190,77±47,50	0,038

Na drugom mestu ispitivanja kod ispitanika došlo je do statistički značajne promene u vrednostima EI u periodu od iritacije do sedmog dana (Greenhouse-Geisser $F=5,057$, $p=0,012$). Na trećem mestu je došlo do statistički značajne promene u vrednostima EI tokom ispitivanog perioda (Greenhouse-Geisser $F=4,595$, $p=0,024$). Na šestom mestu došlo je do statistički značajne promene u vrednostima EI tokom praćenog perioda (Greenhouse-Geisser $F=3,886$, $p=0,038$). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima EI na 1, 3 i 5. mestu u odnosu na ponovljena merenja (Greenhouse-Geisser $F=0,637$, $p=0,641$). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima EI na 2, 4 i 6. mestu u ponovljenim merenjima (Greenhouse-Geisser $F=0,836$, $p=0,504$).

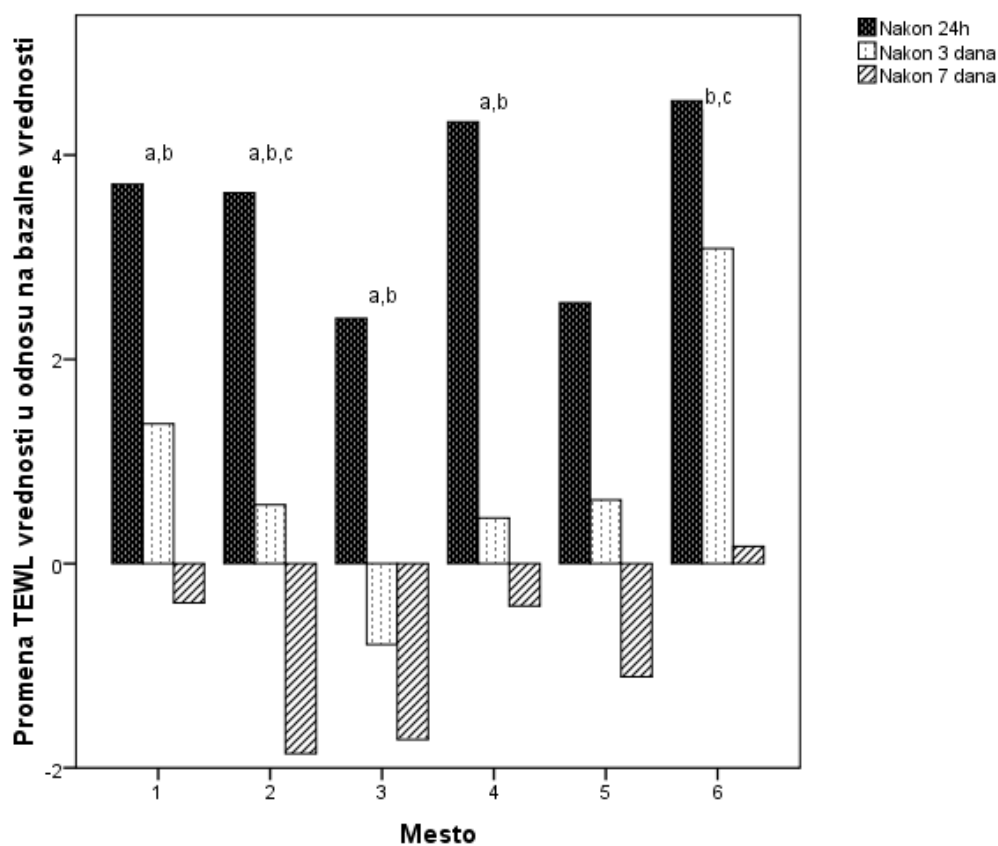
Svi testirani uzorci su uticali na smanjenje eritema u toku sedmodnevne studije. Statistička značajnost nije zabeležena jedino kod aplikacije uzorka A₁-placebo krema (Slika 50). Aplikacija kremova sa aktivnim materijama pokazala je bolji efekat u odnosu na gelove: krem sa alantoinom jedini je imao statistički značajan pad EI nakon tri i sedam dana aplikacije u odnosu na bazalnu vrednost, dok je krem sa ekstraktom gaveza delovao tako što je postepeno smanjivao eritem i posle sedam dana aplikacije vrednosti EI približio bazalnim.

Kremovi u odnosu na gelove smanjuju EI efikasnije verovatno zbog toga što bolja hidratacija do koje dovode (Slika 50) omogućava korneocitima da se „efikasnije brane od iritacije“. Poznato je da efikasna hidratacija čini kožu manje osetljivom na iritaciju i ubrzava oporavak poremećene kožne barijere [Johnson, 2005]. Krem sa ekstraktom ostvaruje efikasnije antieritematozno delovanje u odnosu na krem sa alantoinom zbog uticaja i drugih biološki aktivnih komponenti prisutnih u ekstraktu pored alantoina (materije koje ostvaruju antioksidativno delovanje). Svaka povreda kože indukuje kompleksnu reakciju koja uključuje i ranu inflamaciju uz oslobađanje reaktivnih kiseonikovih radikala (RKV) koji u visokim koncentracijama mogu

ozbiljno oštetiti tkivo [Korkina i sar., 2007]. Obzirom da je oksidativni stres uključen u hemijski-indukovane reakcije kože (kao što je akutni iritantni kontaktni dermatitis), topikalna primena antioksidanata može zaštititi povređeno tkivo od toksičnih efekata RKV, odnosno ublažiti inflamaciju i poboljšati stanje kože [Mambro i sar., 2005, Willis i sar., 1998].

Biljni ekstrakti i supstance biljnog porekla na različit način mogu ostvariti antiiritantno delovanje. Antioksidansi iz biljnog materijala inhibiraju enzime koji učestvuju u procesima oksidacije, antiinflamatorno povećavaju energetske nivo u ćelijama epiderma i na taj način ispoljavaju antiiracioni potencijal [Miguel i sar., 2012, Savić i sar., 2011, Almeida i sar., 2008, Savić i sar., 2012].

Na Slici 51 prikazani su rezultati merenja promena vrednosti TEWL u odnosu na bazalne vrednosti po mestima ispitivanja na koži ispitanika.



I mesto (a: $p=0,005$, b: $p=0,005$);
II mesto (a: $p=0,019$, b: $p=0,001$, c: $p=0,006$);
III mesto (a: $p=0,021$, b: $p=0,010$);
IV mesto (a: $p=0,002$, b: $p=0,013$);
VI mesto (b: $p=0,013$, c: $p=0,005$)).

Slika 51. Promena vrednosti TEWL u odnosu na bazalne vrednosti po mestima ispitivanja

Merenje TEWL je važan parametar koji se vrlo često koristi za procenu promena u barijernoj funkciji kože. Istraživanja su pokazala da postoji veza između stepena iritacije i vrednosti TEWL posle primene preparata koji iritiraju kožu [Byrne i sar., 2010]. Sa aplikacijom agenasa koji izazivaju oštećenja površinskih slojeva kože, vrednosti parametra TEWL se povećavaju, a obnavljanje kože dovodi do smanjenja TEWL. Izmerene bazalne vrednosti TEWL u našim ispitivanjima na definisanim mestima su u rasponu od 9, 91 do 13, 38, a nakon iritacije rastu i dostižu vrednosti od 14, 44 do 17, 1 (Tabela 26).

Tabela 26. Promene TEWL nakon više merenja

Ispitivano mesto	Bazalne vrednosti	Nakon iritacije	Nakon 3 dana aplikacije	Nakon 7 dana	Statistička značajnost, p
1	13,38±4,40	17,10±4,06	14,75±4,12	13,00±2,78	0,034
2	12,60±4,35	16,23±4,83	13,18±3,55	10,74±2,66	0,004
3	12,12±3,23	14,52±4,26	11,33±2,06	10,40±2,58	0,014
4	13,00±2,70	17,32±5,35	13,45±4,28	12,75±2,48	0,005
5	12,15±2,36	14,70±4,56	12,77±3,74	10,54±2,68	0,009
6	9,91±1,68	14,44±4,28	12,99±3,29	10,42±1,77	0,001

Na svih šest mesta došlo je do statistički značajne promene u vrednostima TEWL u periodu od iritacije do sedmog dana. Promena faktora po mestima ispitivanja je sledeća: mesto 1: Greenhouse-Geisser F=3,943, p=0,034, mesto 2: Greenhouse-Geisser F=6,572, p=0,004, mesto 3: Greenhouse-Geisser F=4,696, p=0,014, mesto 4: Greenhouse-Geisser F=6,415, p=0,005, mesto 5: Greenhouse-Geisser F=5,278, p=0,009, i mesto 6: Greenhouse-Geisser F=9,661, p=0,001. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima TEWL na 1, 3 i 5. mestu u ponovljenim merenjima (Greenhouse-Geisser F=0,372, p=0,0,867). Na mestima 2, 4 i 6 ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima TEWL u ponovljenim merenjima (Greenhouse-Geisser F=889, p=0,490).

Ovo ukazuje na oštećenu kožnu barijeru posle iritacije. Rezultati primene uzoraka A₁-A₆ ukazuju da svi uzorci pokazuju statistički značajno smanjenje TEWL nakon 3 i 7 dana primene u odnosu na vrednosti neposredno po iritaciji i približavanje bazalnim vrednostima, osim kod krema sa ekstraktom korena gaveza (uzorak A₅).

Bolji efekat (efikasnije smanjenje TEWL) registrovano je kod gelova u odnosu na odgovarajuće kremove, što upućuje na zaključak da gelovi ostvaruju efikasnije vezivanje vode sprečavajući njeno isparavanje sa površine kože uz dobru okluziju. Na ovaj način gelovi efikasnije sprečavaju odavanje vode iz površinskih slojeva kože u odnosu na kremove. Najefikasnije smanjenje TEWL zabeleženo je posle sedam dana aplikacije uzorka A₆-gela sa ekstraktom gaveza. Kao i kod predhodno ispitivanih biofizičkih parametara kože (EC i EI) i kod promene TEWL zaključujemo da ekstrakt korena gaveza ispoljava bolje delovanje u odnosu na čist alantoin što je najverovatnije posledica uticaja drugih prisutnih sastojaka u ekstraktu. Bioaktivni sastojci ekstrakta ostvaruju interakciju sa podlogom pri čemu dolazi do stvaranja mreže koja efikasnije sprečava gubitak vode iz površinskih slojeva kože [Savić i sar., 2013].

Uzorci gela i krema sa ekstraktima pokazuju efikasniji uticaj na smanjenje TEWL (povećanog usled veštački izazvane iritacije) u poređenju sa uzorcima gela i krema sa alantoinom, potvrđujući već sagledanu činjenicu da i drugi bioaktivni agensi ekstrakta korena gaveza, pored alantoina, učestvuju u reparaciji površine kože oštećene delovanjem rastvora natrijum lauril sulfata.

Rezultati dobijeni na *in vitro* modelu sa paralelnom analizom epitelne i fibroblastne ćelijske linije su u korelaciji sa kliničkim nalazima antiiritantnog efekta ekstrakta gaveza inkorporiranog u kremovima i gelovima.

ZAKLJUČAK

1. Definisani su optimalni uslovi ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina iz korena gaveza metodom ekstrakcije po Soxhlet-u. Voda je izabrana kao ekstragens za ekstrakciju alantoina na temperaturi ključanja na osnovu dobre rastvorljivosti i stabilnosti alantoina u ovom rastvaraču. Rezultati pokazuju da je optimalni hidromodul za ekstrakciju alantoina i ekstraktivnih materija 1:10m/v, a vreme ekstrakcije 240 minuta. Vodenom ekstraktu korena gaveza dobijenom pri optimalnim uslovima ispitan je hemijski sastav i farmakološka dejstva.
2. Ispitana je kinetika izolacije ukupnih ekstraktivnih materija i alantoina i određeni su optimalni kinetički parametri.
3. U vodenom ekstraktu korena gaveza dobijenom pod optimalnim uslovima ekstrakcije određen je sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida i njihov sadržaj iznosi 473,16mg GKE/g s.e. (mg galne kiseline ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta) i 18,90mg RE/g s.e., respektivno (mg rutin ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta) .
4. Optimizirane su i validirane analitičke metode, HPLC i UHPLC–DAD–HESI–MS, za kvalitativnu i kvantitativnu analizu bioaktivnih komponenata u vodenom ekstraktu korena gaveza. HPLC metodom je detektovan i kvantifikovan sadržaj alantoina na osnovu konstruisane kalibracione krive kojoj odgovara jednačina $P \text{ (mAU}\times\text{s)} = 12,87 + 12298,88 \times c$, sa koeficijentom korelacije $R^2=0,9992$. Sadržaj alantoina u ukupnom ekstraktu za vreme ekstrakcije 240 minuta iznosi 8,91g/100 g suvog ekstrakta. UHPLC hromatografskom metodom u vodenom ekstraktu korena gaveza razdvojeno je ukupno 15 komponenata od kojih je identifikovano 12. Sadržaj alantoina je siti kao što je određen i metodom tečne hromatografije. UHPLC hromatografskom metodom, a na osnovu odgovarajućih standarda i kalibracionih krivi u vodenom ekstraktu korena gaveza određen je sadržaj elaginske kiseline (7,4g/100g suvog ekstrakta) i ružmarinske kiseline (12,8g/100 g suvog ekstrakta). Prema

dobijenim rezultatima ovo je najveći sadržaj ruzmarinske kiseline u do sada ispitivanim vrstama.

5. Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodenom ekstraktu korena gaveza dobijenom pri optimalnim uslovima ekstrakcije određen je primenom ICP-OES metode. Rezultati pokazuju da je u ekstraktu prisutan visok sadržaj K ($560,4\text{mg/dm}^3$) i Ca ($129,3\text{mg/dm}^3$), a da su ostali mikroelementi prisutni u manjim količinama prema opadajućim vrednostima Na, Pb, Mg, Fe, Al, Zn, B, Ba, Cu. Obzirom da je za normalno funkcionisanje kože neophodna kombinacija minerala dobijeni rezultati ispitivanja o prisustvu mikro- i makroelemenata su od značaja za primenu vodenog ekstrakta korena gaveza u preparatima za spoljašnju primenu i lečenje različitih promena na koži.
6. Ispitana je antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda, alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline. Na osnovu prikazanih EC_{50} vrednosti za ispitivane uzorke može se zaključiti da antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza najviše potiče od elaginske i ruzmarinske kiseline kao i od drugih prisutnih polifenolnih jedinjenja, dok je uticaj alantoina znatno manji.
7. Ispitana je antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda alantoina, ruzmarinske i elaginske kiseline. Alantoin ne pokazuje antimikrobnu aktivnost na ispitivane sojeve mikroorganizama, dok ruzmarinska i elaginska kiselina deluju na sve ispitivane sojeve mikroba. Vodeni ekstrakt korena gaveza pokazuje antimikrobnu aktivnost na gram-negativne bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, dok na ispitivane gram-pozitivne bakterije i gljivice nije zapažena aktivnost.
8. Ispitano je u *in vitro* uslovima delovanje vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda alantoina na vijabilnost i proliferaciju odabranih ćelijskih linija sisara MDCK i L929. Rezultati ispitivanja ukazuju da vodeni ekstrakt korena gaveza ima veću biološku aktivnost od čistog alantoina. Alantoin nije imao uticaja na ćelijsku vijabilnost obe ćelijske linije, ali ispoljava blago inhibitorni efekat na njihov rast pri višim koncentracijama ($40\text{ }\mu\text{g/cm}^3$ i $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$) sa više izraženim efektom na MDCK ćelijske linije. Vodeni ekstrakt korena gaveza nije statistički značajno delovao na vijabilnost ispitivanih ćelijskih linija dok je značajno

stimulisao proliferaciju fibroblasta u koncentracijama većim od 40 mg/cm³ i delovao inhibitorno na proliferaciju epitelnih ćelija.

9. Izrađeni su polučvrsti hidrofilni preparati hidrogeli i emulzije tipa U/V sa emulgatorima novije generacije za topikalnu primenu sa inkorporiranim vodenim ekstraktom korena gaveza i alantoinom standardnim postupcima.
10. Ispitana je stabilnost i kompatibilnost hidrofilnih nosača i bioaktivnih supstanci, vodenog ekstrakta korena gaveza i standarda alantoina. Uočeno je najintenzivnije prisustvo stabilizacionih struktura u kremu sa ekstraktom gaveza u odnosu na krem sa alantoinom što ukazuje na značaj supstanci prisutnih u ekstraktu koji zajedno sa alantoinom dodatno stabilizuju strukturu izrađenog U/V krema. Krem sa ekstraktom korena gaveza zbog toga predstavlja sistem koji ima dobru stabilnost.
11. Izvršeno je uporedno ispitivanje antiiritantnog delovanja preparata sa vodenim ekstraktom korena gaveza i standardom alantoina u *in vivo* uslovima merenjem biofizičkih parametara kože ispitanika. Promene u ispitivanim biofizičkim parametarima iritirane kože zdravih dobrovoljaca nakon sedam dana primene različitih uzoraka zavise od vrste farmaceutskog preparata (krem ili gel) kao i od prisustva biološki aktivnih jedinjenja. Kreme dovode do efikasnije povećanje hidratacije kože i efikasnije smanjuju EI, dok gelovi značajno smanjuju TEWL. Uzorci krema i gelova koji sadrže vodeni ekstrakt korena gaveza generalno pokazuju efikasniju antiiritirajuću aktivnost u poređenju sa uzorcima koji sadrže čist alantoin. Ispitivanje na zdravim dobrovoljcima pokazalo je da vodeni ekstrakt korena gaveza inkorporiran u krem i primenjen na veštački iritiranu kožu dovodi do efikasnije antiiritacione aktivnosti u odnosu na krem sa čistim alantoinom.
12. Ukupni rezultati sprovedenih ispitivanja pokazuju da se biološka aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza ne potiče od čistog alantoina, kao važnog konstituenta korena gaveza, već da je aktivnost rezultat interakcije različitih aktivnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu pre svega ruzmarinske i elaginske kiseline. Topikalni preparati koji sadrže vodeni ekstrakt gaveza kao aktivnu supstancu mogu imati veliku primenu u tretmanu iritirane kože.

LITERATURA

Abdulsalam Ertas, Mehmet Boga, Mustafa Abdullah Yilmaz, Yeter Yesil, Gulsen Tel, Hamdi Temel, Nesrin Hasimi, Isil Gazioglu, Mehmet Ozturk, Pelin Ugurlu, A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymusnummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid, Industrial Crops and Products 67 (2015) 336–345.

Adviye A. Tolun, Haoyue Zhang, Dora Il'yasova, Judit Sztáray, Sarah P. Young, David S. Millington, Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Analytical Biochemistry 402 (2010) 191–193.

Aftab K, Shaheen F, Mohammad FV, Noorwala M, Ahmad VU. Phyto-pharmacology of saponins from *Symphytum officinale* L. *Adv Exp Med Biol* 404(1996) 429–42.

Aliyiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. *J Agric Food Chem* 49 (2001) 4168-4170.

Allantoin brochure. International specialty products. Available from: www.aloesense.com/.../Allantoin%20Brochure.pdf.

Almeida IF, Valenta P, Andrade PB, Seabra RM, Pereira TM, Amaral MH, Costa PC, Bahia MF. *In vivo* Skin Irritation Potential of a *Castanea sativa* (Chestnut) Leaf Extract, a Putative Natural Antioxidant for Topical Application. *Basic & Clinical Pharm & Tox* 103 (2008) 461-467.

Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits, *J. Chromatog* 896 (2000) 87-93.

Andersen F, Hedegard K, Petersen KT, Bindslev JC, Fullerton A and Andersen EK. Anti-irritants I:dose-response in acute irritation. *Cont Derm* 55 (2006) 148-154.

Andersen F, Hedegard K, Petersen KT, Bindslev JC, Fullerton A and Andersen EK. Anti-irritants II:efficacy against cumulative irritation. *Cont Derm* 55 (2006) 155-159.

Andersen F, Hedegard K, Petersen KT, Bindslev JC, Fullerton A and Andersen EK. The hairless guinea-pig as a model for treatment of cumulative irritation in humans. *Skin Res Techn* 12 (2006) 60-67.

Andres P, Brenneisen R, Clerc JT. Relating antiphlogistic efficacy of dermatics containing extracts of *Symphytum officinale* to chemical profiles *Planta Med* 55 (1989) 66–67.

Anusuya C, Manoharan S, Environ J. Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Pathol Toxicol Oncol* 3 (2011) 199-211.

Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, Puglija C, Ventura D, Bonina F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H. B. K. Leaves and their major flavonoids. *J Ethnopharm* 79 (2002) 183-191.

Aramaki J, Effend I, Happel R, Kawana S, Löffler C and Löffler H. Which bioengineering assay is appropriate for irritant patch testing with sodium lauryl sulfate? *Cont Derm* 45(2001) 286–290.

Araujo LU, Reis PG, Barbosa LCO. *In vivo* wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. *Pharm* 67 (2012) 355-360.

Arsić I, Žugić A, Tadić, Tasić-Kostov M, Mišić D, Primorac M, Runjaić-Antić D. Estimation of Dermatological Application of Creams with St John's Wort Oil Extracts. *Mol* 17 (2012) 275-294.

Arsić I, Homšek I, Bulatović V. The effect of comfrey (*Symphytum officinale* L. *Boraginaceae*) extract encapsulated in o/w cream and hydrogel on the skin pH and moisture content. *Farm Vest* 54 (2003) 471-472.

Arsić I. Primena nekih biljnih sirovina u preparatima za negu kože izložene UV zračenju. *Arh farm* 6 (2006) 1043-1050.

Axterer M, Müller C, Dweck C. Anthony, Natural anti-irritant plants, Symrise GmbH & Co KG. *Dwec* 2006.

- Aziz NH, Farag SE, Mousa LAA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93(374) (1998) 43-54.
- Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Ravi Kumar MNV. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharmaceut Biomed* 40 (2006) 206–210.
- Barry MD, Rowe RC. The characterization by small-angle X-ray scattering of a pharmaceutical gel with a lamellar structure. *Int J Pharm* 53(1989) 138-143.
- Baumann LS. Cosmeutical critique:allantoin. *Skin&Allergy News* 2003;34:10.
- Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer-a mini review. *J Pharm Pharmacol* 60 (2008) 139-144.
- Benevente-García O, Catillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA. Uses and properties of Citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 45(12) (1997) 4505-4515 .
- Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Phys A* 136(1) (2003) 113-126.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV, Antioxidants. Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann Bo* 91 (2003) 179-194.
- Bouwstra J, Pilgram G, Gooris G, Koerten H, Ponc. New aspect of the skin barrier organization. *Skin Pharm App Skin Phys* 14 (2001) 52-62.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nu. Rev* 56 (1998) 317-333.
- Brooks G, Butel J, Morse S, Jawetz, Melnick, & Adelberg's. Medical microbiology, 23th ed. The McGraw- Hill Companies: London, (2004) 223.
- Brown, J.P.A., A review of the genetic affects of naturally occurring flavonoids, anthroquinones and related compounds, *Mut. Res.*, 75 (1980) 243-277.
- Byrne JA. Bioengineering and subjective approaches to the clinical evaluation of dry skin. *Inter J Cosm Sci* 32 (2010) 410-421.

Celik H, Arinc E. Evaluation of the Protective Effects of Quercetin, Rutin, Resveratrol, Naringenin and Trolox Against Idarubicin-Induced DNA Damage. *J Pharm and Pharm Sci* 13(2) (2010) 231-241.

Chew A, Howard I. *In Vitro* Methods to Predict Skin Irritation. *Irrit Derm*: Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, (2006) 502-507.

Choi WC, Kim CS, Hwang SS, Choi KB, Ahn JH, Lee YM, Park HS, Kim KS. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163(2002) 1161-1168.

Covey TR, Lee ED, Bruins AP, Heninon JD. Liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 58(14) (1986) 1451A-1461A.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microb Rev* 12(4) (1999) 564-82.

Cvetković D and Marković D. UV-effects on antioxidant activity of selected carotenoids in the presence of lecithin estimated by DPPH test. *J Serb Chem Soc* 73(11) (2008) 1051-1061.

Daise Lopes-Lutz, Judith Dettmann, Chamila Nimalaratne and Andreas Schieber, Characterization and Quantification of Polyphenols in Amazon Grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius), *Molecules* 15 (2010) 8543-8552.

Daniela Fracassetti, Carlos Costa, Leila Moulay, Francisco A. Tomás-Barberán, Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*), *Food Chemistry* 139 (2013) 578-588.

Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Río JA, Ortuño A, Quirin KW, Gerard D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*: antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 51 (2003) 4247-4253.

Dennis R, Dezelak C, Grime J. Studies on *Symphytum* species – HPLC determination of allantoin. *Acta Pharm Hung* 57 (1987) 267-274.

Dent M. Utjecaj postupka ekstrakcije na sastav i količinu fenolnih spojeva kadulje (doktorska disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet (2013).

Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons: New York: NY USA; (2002).

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J App Microb* 88 (2000) 300-316.

Draelos ZD. Botanicals as Topical Agents. *Clin Dermatol* 19 (2001) 474-477.

Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 13 (2000) 79-106.

Eccleston GM, Beattie L. Microstructural changes during the storage of systems containing cetostearyl alcohol: polyoxyethylene alkyl ether surfactants. *Drug Dev Ind Pharm* 14 (1988) 2499-2518.

Eccleston GM. Formulating cosmetic emulsions. *Cosm Toil* 112 (1997) 65-71.

Eccleston GM. The importance of mesomorphic (lamellar) phases in emulsion stability. *J Cosm Sci* 52 (2001) 142-143.

Eccleston GM. The microstructure and properties of fluid and semisolid lotions and creams, *IFSCC Magazine* 3 (4) (2010) 167-174.

Elston DM. Epidemiology and prevention of skin and soft tissue infections. *Cutis* 73(5) (2004) 3-7.

Feng Liu, Sow Yin Wan, Zhangjian Jiang, Sam Fong Yau Li, Eng Shi Ong, Jhon Carlos Castaño Osorio, Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Talanta* 80 (2009) 916-923.

Fonsêca Castro AH, Marx Young MC, Alves de Alvarenga A, Donizeti Alves J. Influence of photoperiod on the accumulation of Allantoin in comfrey plants. *R Bras Fisiol Veg* 13(1) (2001) 49-54.

Fujiwara S; Noguchi T. Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals. *T Biochem J* 312(1995) 315-318.

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds *J Agric Food Chem* 48 (2000) 3597-3604.

Gehrig KA, Warshaw EM. Allergic contact dermatitis to topical antibiotics: Epidemiology, responsible allergens, and management. *J Amer Acad Derm* 58(1) (2008) 1-21.

Gisby J, Bryant J. Efficacy of a New Cream Formulation of Mupirocin: Comparison with Oral and Topical Agents in Experimental Skin Infections. *Antimic Ag Chemo* 44(2) (2000) 255-260.

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

Glogovac T, Milić J, Vuleta G, Petrović S. Kozmetički aktivne komponente sa antiiritantnim delovanjem prirodnog porekla, XXV Savetovanje o lekovitim i aromatičnim biljkama. Bajna Bašta (2002) 134-136.

Gottschalck T, Bailey J. International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook. Thirteenth ed. Volume 1. Washington DC: Personal Care Products Council (2010).

Grabias B, Swiatek L. Phenolic acids in *Symphytum officinale* L. *Pharm Pharmacol Lett* 8 (1998) 81-83.

Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res* 428 (1999) 17-22.

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med* 83(1990) 159-160.

Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. 3rd ed. New York: Thomson PDR, Montvale (2004).

Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J Invest Dermatol* 121(2) (2003) 345-353.

Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Heinonen IM, Törrönen AR. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur Food Res Technol* 212 (2000) 75-80.

Hamideh GA, Seyed MG, Gholam H et al. Antiproliferative activity of chloroformic extract of Persian Shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines. *Cytotech* 56 (2008) 179-185.

Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32 (1983) 1141-1148.

Held E and Agner T. Effect of moisturizers on skin susceptibility to irritants. *Acta Derm Venereol* 81 (2001) 104-107.

Hermanns JF, Pierard-Franchimont C and Pierard GE, Skin colour assessment in safety testing cosmetics. *Inter J Cosmet Sci* 22 (2000) 67-71.

Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28 (1989) 315-347.

Hertog MGI, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases. The Zutphen elderly study. *Lancet* 342 (1993) 1007-1011.

Hiermann A, Witzel M: Antiphlogistic glycopeptide from the roots *Symphytum officinale*. *Pharm Pharmacol Lett* 8 (1998) 154-157.

Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 126 (2011) 1821-1835.

Isailovic G. Fiziologija kože sa starenjem. Udžbenik, Beograd: Medicinski fakultet (2006).

Johnson WA. Cosmeceuticals: Function and the Skin Barrier. In: Draelos ZD.ed. New York: Elsevier Saunders (2005).

Jolly Mariam JM, Kulandhaivel M, Palaniswamy RJ. Evaluation and *In vitro* CellLine Studies of Phyto-Cosmeceutic Gel Based Hand Wash Formulation Using *Camellia sinensis* (Green Tea) and *Myristica fragrans* (Nutmeg). *Intern J Pharm l & Biolog Arch* 2(4) (2011) 1218-1223.

Jones GA, McAllister TA, Muir AD, Cheng KJ. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60 (1994) 1374-1378.

Jongsung L, Eunsun J, Jassook K, Yeong Shik K, Deokhoon P. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *Jor Derm* 35 (2008) 768-771.

Junginger HE. Multiphase emulsions. In: Riegr M.M, Rhein L.D. (Ed.) Surfactants in Cosmetics. New York: *Marcel Dekker* (1997)155-182.

Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutr Res* 30(2010) 650-659.

Kazazić PS. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh hig i toks* 55 (2004) 279-290.

Kečkeš S, Gašić U, Ćirković-Veličković T, Milojković-Opsenica D, Natić M, Tešić M. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem* 138(2013) 32-40.

Koehler H, Franz G. *Symphytum officinale* – Beinwell. *Ztsch Phytother* 8 (1987) 166-168.

Korkina LG, Mikhalechik EV, Suprun MV, Pastore S, Dal Toso R. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. *Cell Mol Biol* 53(5) (2007) 78-83.

Kovačević N. Osnovi farmakognozijske. Beograd: Srpska školska knjiga (2004) 236-239.

- Kovačević N, Kundaković T. Antimikrobna aktivnost sastojaka biljaka. *Arh farm* 57 (2007) 277-287.
- Lamien-Meda A, Nell M, Lohwasser U, Börner A, Franz C, Novak J. Investigation of Antioxidant and Rosmarinic Acid Variation in the Sage Collection of the Genebank in Gatersleben. *J Agric Food Chem* 58 (2010) 3813-3819.
- Lewis K, Ausubel FM. Prospect for plant-derived antibacterials. *Natu biotech* 24 (2006) 1504-1507.
- Lippard SJ. Bioinorganic chemistry: a maturing frontier. *Science (New York NY)* 261(5122) (1993) 699.
- Liu F, Wan SY, Jiang Z, Li SFY, Ong ES, Osorio JCC. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 80 (2009) 916-923.
- Lodén M. The clinical benefit of moisturizers. *JEADV* (2005) 672-688.
- Loden M, Maibach IH. Dry skin and moisturizers chemistry and function. CRS Press (2000).
- Lods LM, Dres C, Johnson C, Scholz DB, Brooks GJ. The future of enzymes in cosmetics. *Int J Cos Sc* 22 (2000) 85-94.
- Makai M, Csanyi E, Nemeth Z, Palinkas J, Erős I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 256 (2003) 95-107.
- Mambro VM, Fonseca MJV. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharmaceut Biomed* 37 (2005) 287-295.
- Markham KR. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press (1989).
- Mattila P, Kumpulainen JJ. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. *J Agric Food Chem* 50(13) (2002) 3660-3667.
- McCord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med* 108 (2000) 652-659.

Milić B, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, Sakač M. Biljni polifenoli. Novi Sad: Tehnološki fakultet (2000).

Mroczek T, Ndjoko-Ioet K, Głowniak K, Miętkiewicz-Capała A, Hostettmann K. Investigation of *Symphytum cordatum* alkaloids by liquid–liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 566 (2006) 157-166.

Mullen W, Yokota T, Lean MEJ, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSⁿ, *Phytochemistry* 64 (2) (2003) 617-641.

Murković M., Phenolic compounds. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Oxford, UK: Academic press (2003) 4507-4513.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz Jour Microb* 31 (2000) 247-256.

Natsh A and Wasesha M. Fragrance raw materials and essential oils can reduce prostaglandin E2 formation keratinocytes and reconstituted human epidermis. *Inter Jour Cosm Sci* 29 (2007) 369-376.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement*, M100-S11. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standard (2003).

Nikolić V. Bioaktivni organski proizvodi iz lukovice belog luka (*Allium sativum* L.) (magistarska teza). Tehnološki fakultet Leskovac, Univerzitet Niš (1997).

Nikolić V. Sinteza i karakterizacija alicina, njegovih derivata i inkluzionih kompleksa (doktorska disertacija). Tehnološki fakultet Leskovac, Univerzitet Niš (2003).

Nowak R. Determination of ellagic acid in pseudofruits of some species of roses. *Acta Pol Pharm* 63 (2006) 289-292.

Oberlies NH, Kim NC, Brine DR, Collins BJ, Handy RW, Sparacino CM, Wani MC, Wall ME. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-

oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutr* 7 (2004) 919-924.

Ojeda-Sana AM, Van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 31 (2013) 189-195.

Pavlović D. Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae) (doktorska disertacija). Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu (2013).

Pereira D.M, Valentão P, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Mol* 14 (2009) 2202-2211.

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

Pharmacopoeia Yugoslavica (Ph. Yug.IV). Belgrade: Federal Institute of Public Health & Contemporary Administration (1984).

Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 63 (2000) 1035-1042.

Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nuñez MJ. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catehin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol* 221(3) (2005) 284-290.

Plazonić A, Bucar F, Maleš Ž, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* 14 (2009) 2466–2490.

Polyakov EN, Leshina VT, Konovalova AT, Kispert DL. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants?, *Free Rad Bio Med* 31(3) (2001) 398-404.

Popović A, Petrović M. Fiziologija kože. Beograd: Farmaceutski fakultet, Zavod za fiziologiju (1991).

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric F Chem* 53 (2005) 4290-4302.

Proksch E, Fölster HR, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Derm Sci* 43 (2006) 159-169.

Puertas-Mejía MA, Zuleta-Montoya JF, Félix Rivera-Echeverry F. *In vitro* antioxidant capacity of comfrey (*Symphytum officinale* L.). *Rev Cub Pl Med* 17(1) (2012) 30-36.

Radojković M. Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Moraceae*), sastav, delovanje i primena (doktorska disertacija). Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu (2012).

Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 20 (2002) 522.

Ristić M, Soković M, Grubišić D, Kovačević N. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Achillea atrata* L. *The Journal of Essential Oil Research* 16 (2004) 75-78.

Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* 51(10) (2003) 2866-2867.

Rougier A, Lotte C, Bronaugh RL, Maibach HI. *In vivo* relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss. ed. *Top abs derm prod*, New York: Marcel Dekker, (2002) 114-127.

Samee W, Sae-Lee N, Ungwitayatorn J. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of the Synthesized Chromone Derivatives. *SWU J Pharm Sci* 9(1) (2004) 36-42.

Sanchez-Moreno C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *F Sci tehn Inter* 8(3) (2002) 121-123.

Savić S. Biološka raspoloživost i bezbednost primene dermatoloških lekova i dermokozmetičkih proizvoda: Metode za *in vitro* i *in vivo* procenu. *Arh Farm* 5 (2010) 712.

Savić V, Savić S, Nikolić V, Nikolić Lj, Najman S, Lazarević J, Đorđević A. The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity, *Hemijska industrija* 69(1) (2015) 1-9.

Savić V, Nikolić V, Stanojević Lj, Ilić D, Stanković B, Cakić M. Kinetika ekstrakcije i antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta iz korena gaveza (*Symphytum officinale* L.). *Savr Tehn* 1 (2012) 41-47.

Savić V, Ilić D, Nikolić V, Nikolić Lj, Stanković M, Stanojević Lj, Tasić-Kostov M. Topical preparations of Allicin and Allicin transformers: antimicrobial and anti-irritating effects *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 57 (2011) 262.

Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30 (1991) 3875-3883.

Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, McPhail D, Skibsted LH, Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol* 212 (2001) 319-328.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Meth in Enzym* 299 (1999) 152-178.

Smith EW, Surber C, Tassopoulos T, Maibach H. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. In: Bronaugh RL, Maibach HI. *Top absorb derm prod*. New York: Marcel Dekker, (2002) 457-463.

Smith HR. Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. *Clinical and Exper Derm* 27 (2002) 138-146.

Song JM, Pak KD, Lee KW, Byun YH, Park JH, Kim SH, Kim JH, Seong JM. Biological evaluation of anti-influenza viral activity of semi-synthetic catechin derivatives. *Antiviral Research* 76 (2007) 178-185.

Staiger C., Comfrey: a clinical overview, *Phytother Res.*, 26(10) (2012) 1441-1448.

Stanojević Lj, Stanković M, Nikolić V, Nikolić Lj. Antioxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *J Serb Chem Soc* 73(5) (2008) 531-540.

Stanojević Lj, Zdravković A, Stanković M, Cakić M, Nikolić V, Ilić D. Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Sav tehn* 2(1) (2013) 51-59.

Stanojević Lj, Stanković M, Nikolić V, Nikolić Lj, Ristić D, Čanadanovic-Brunet J, Tumbas V. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors* 9 (2009) 5702-5714.

Stern JL, Hagerman AEP, Steinberg D, Mason PK. Phlorotanninprotein Interactions. *J Chem Ecol* 22 (1996) 1887-1899.

Stickel F and Seitz KH. The efficacy and safety of comfrey. *Pub H Nut* 3(4A) (2000) 501-508.

Swarup D, Patra RC, Prakash V, Cuthbert R, Das D, Avari P, Pain DJ, Green RE, Sharma AK, Saini M, Das D, Taggart M. The safety of meloxicam to critically endangered Gyps vultures and other scavenging birds in India. *Anim Conserv* 10 (2007) 192-198.

Sweetman SC (Ed), Martindale: The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, (2005).

Takiwaki H, Serup J. Measurement of erythema and melanin indices. In: Serup J, Jemec G, editors. *In Vivo Examination of the Skin: A Handbook of Non-Invasive Methods*. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, (1995) 377-84.

Tasić-Kostov M, Reichl S, Lukić M, Jakšić I, Savić S. Does lactobionic acid affect the colloidal structure and skin moisturizing potential of the alkyl polyglucoside – based emulsion systems? *Pharmazie* 66 (2011) 862-870.

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

Tepe B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technol* 99 (2008) 1584-1588.

Thornfeldt C. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg* 31 (2005) 873-880.

Tolun AA, Zhang H, Il'yasova D, Judit S, Young SP, Millington DS. Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 402 (2010) 191-193.

Toth I, Heraul F, Beutin L, Oswald E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). *J Clin Microbiol* 41 (2003) 4285-4291.

Tsukasa Iwashina and Goro Kokubugata, Flavonoids in the Leaves and Flowers of *Myoporum bontryoides* Native to Northernmost Region in the Myoporaceae, Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B 36(3) 117–125.

Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Rad (1990) 521.

Tumbas V. Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija *Rosaceae* i *Ericaceae* (doktorska disertacija). Novi Sad: Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu (2010).

Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, Serup J. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests-A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Derm* 37 (1997) 53-69.

Türk G, Ceribai AO, Sakin F, Sönmez M, Ateahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 22 (2010) 587-596.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2) (2003) 335-344.

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

Vuleta G, Kovačević A, Savić S, Milić J. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu. *Arh farm* 57 (2007) 375-398.

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

Wagner H, Hörhammer L, Frank U. Lithospermsäure, das antihormonale Wirkprinzip von *Lycopus europaeus* L. (Wolfsfuß) und *Symphytum officinale* (Beinwell). Mitteilung: Über die Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen mit hormon- und antihormonähnlicher Wirkung, *Arzneim-Forsch Drug Res* 20 (1970) 705-713.

Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45 (1997) 304-309.

Wang H, Wang X, You J, Xianen Zhao YS, Li Y, Ding Y. Comparative Analysis of Allantoin, Quercetin, and 1-Methyl-1,2,3,4- Tetrahydro-b Carboline-3-Carboxylic Acid in *Nitraria tangutorum* Bobr. Seed by HPLCAPCI- MS and CE. *J Liq Chrom & Rel Techn* 30 (2007) 363-376.

Weber TM, Ceilley RI, Buerger A, Kolbe L. Skin tolerance, efficacy, and quality of life patients with red facial skin using a skin care regimen containing Licochalcone A. *J Cosm Derm* 5 (2006) 227-232.

Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomed* 14 (2007) 508-516.

Wettasinghe M, Shahidi F, Amarowicz R. Identification and quantification of low molecular weight phenolic antioxidants in seeds of evening primrose (*Oenothera biennis* L.). *J Agric Food Chem* 50 (2002) 1267-1271.

Wilkinson JM. A laboratory evaluation of comfrey (*Symphytum officinale* L.) as a forage crop for ensilage. *Anim Feed Sci Tech* 104 (2003) 227-233.

Willis CM, Reiche L, Wilkinson JD. Immunocytochemical demonstration of reduced Cu, Zn-superoxide dismutase levels following topical application of dithranol and sodium lauryl sulphate: an indication of the role of oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 8(1) (1998) 8-12.

Wings TYL, LJ J, Mary NBC and Louis WCC. Evaluation of *Ellagic acid* on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP)bioluminescence assay. *Afric J Biotech* 9(25) (2010) 3938-3943.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology* 126 (2001) 485-493.

Yen G-C, Chen H-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 41 (1995) 27-32.

Yokozawa T, Chen CP, Dong D, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochem Pharmacol* 56 (1998) 213-222.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54 (2001) 176-186.

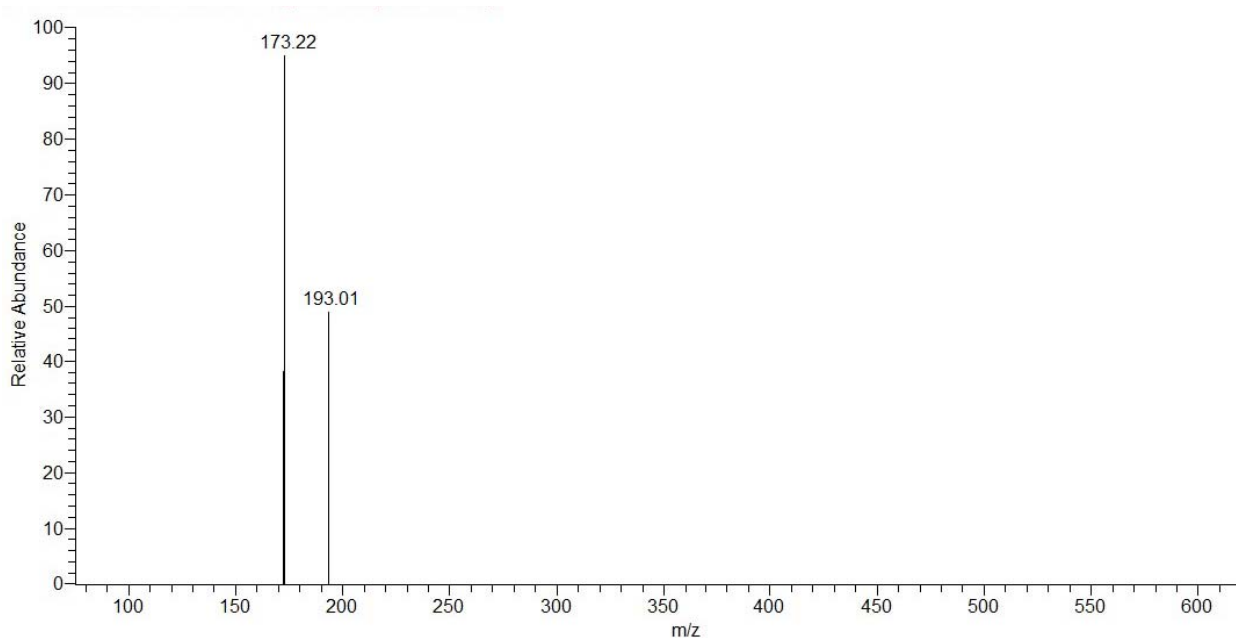
Živković J. Farmakološki aktivne supstance kestena (*Castanea sativa* Mill.) (doktorska disertacija). Novi Sad, Tehnološki fakultet (2009).

Žižak S. Antitumor effect of steroidal tetraoxanes on malignantly transformed human cell lines (doktorska disertacija). Medicinski fakultet, Beograd (2012).

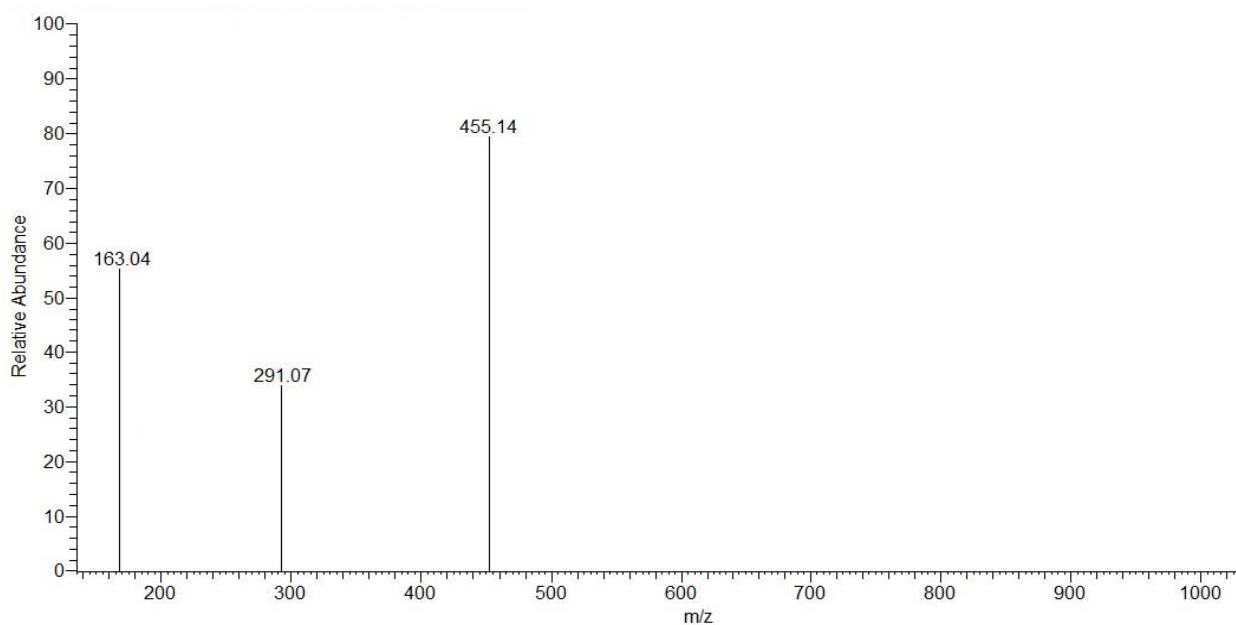
Пономарев БД. Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина.Москва, (1976) 48-49.

PRILOG P

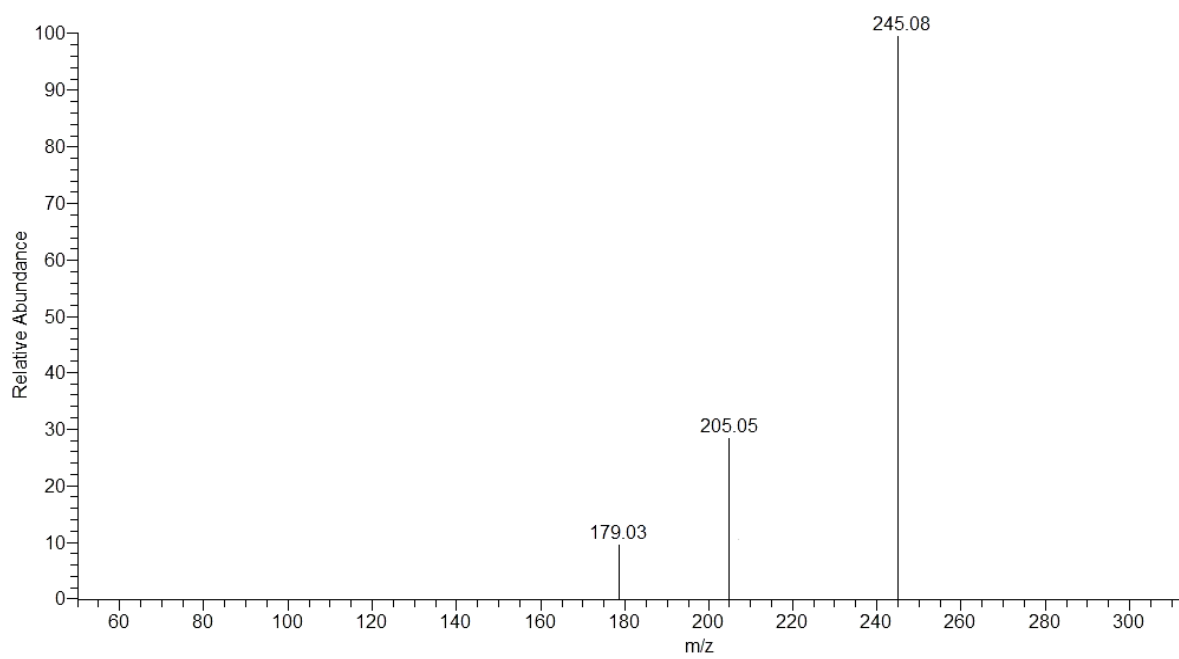
U prilogu P prikazani su maseni spektri detektovanih supstanci u manjim koncentracijama u vodenom ekstraktu korena gaveza



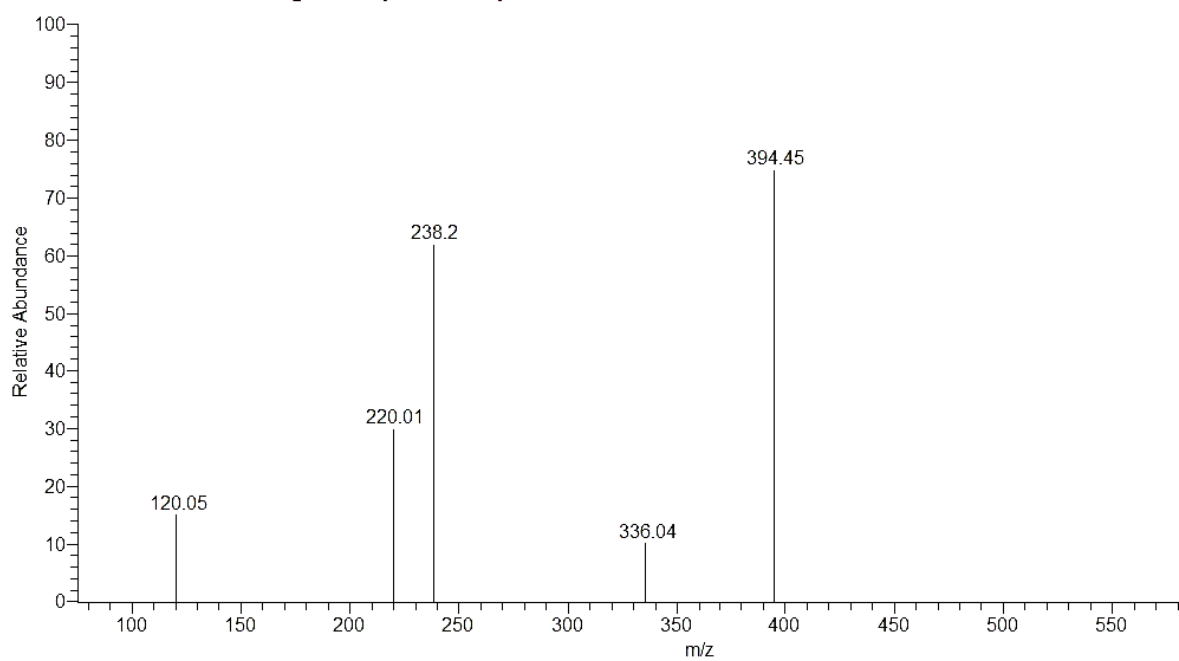
Maseni spektar 5-O-feruloil hinske kiseline



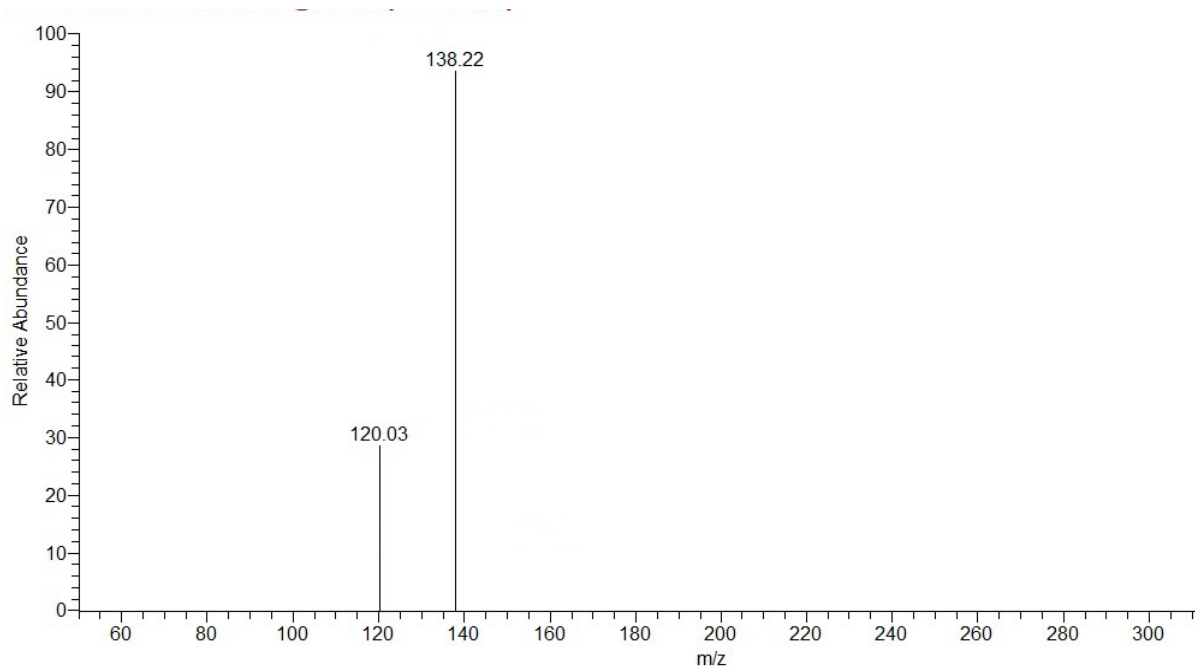
Maseni spektar derivata *p*- kumaroil-heksozid-metil glutarata



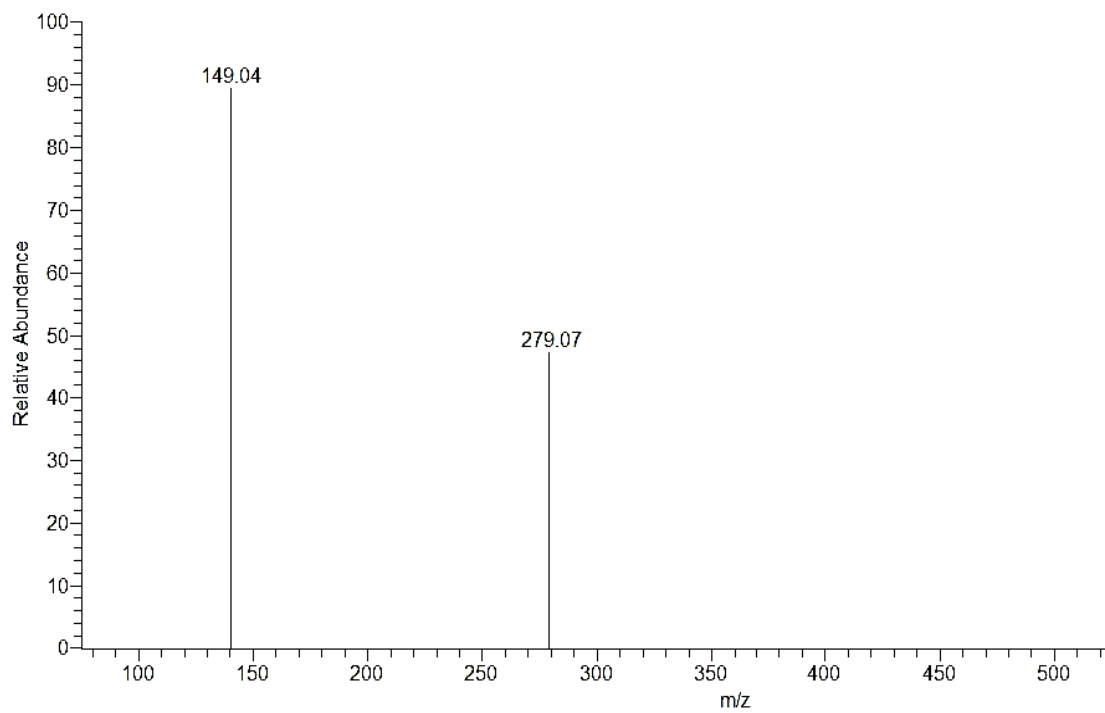
Maseni spektar epikatehina



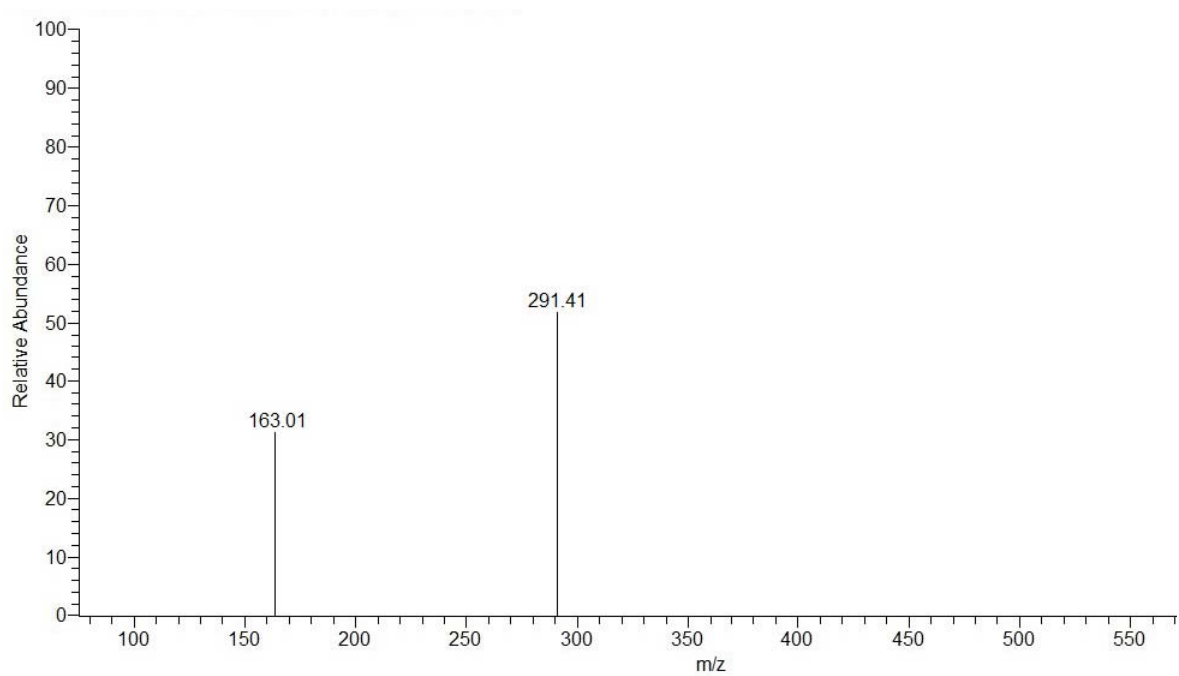
Maseni spektar lasiokarpina



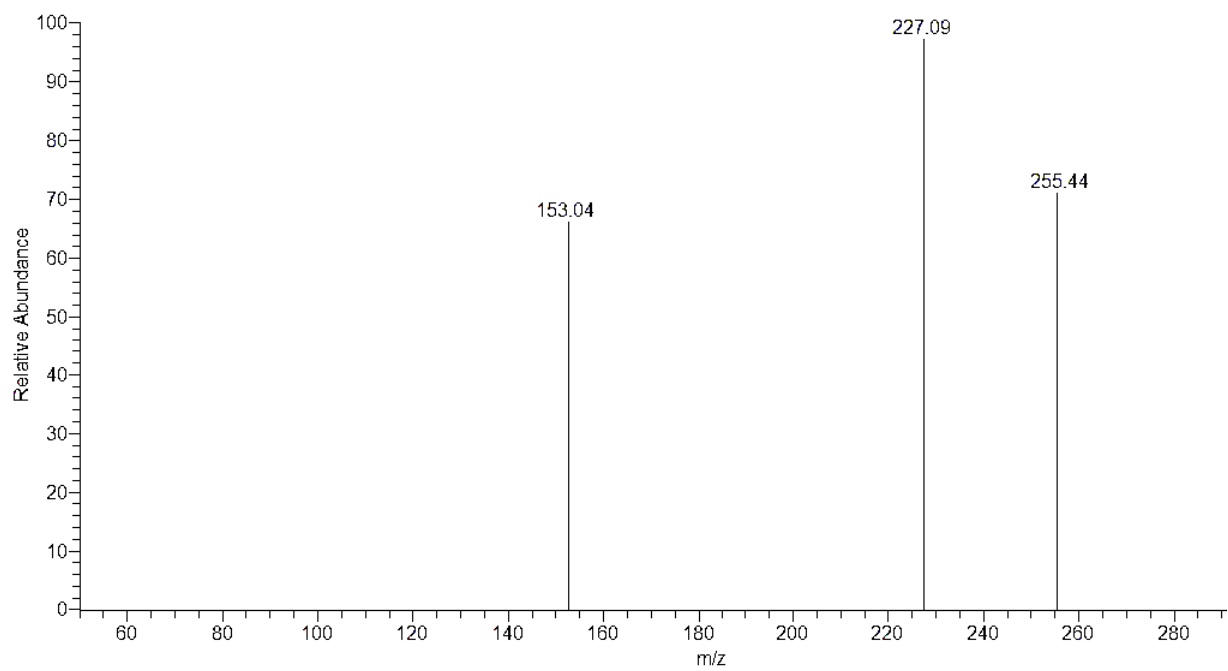
Maseni spektar likopsamina



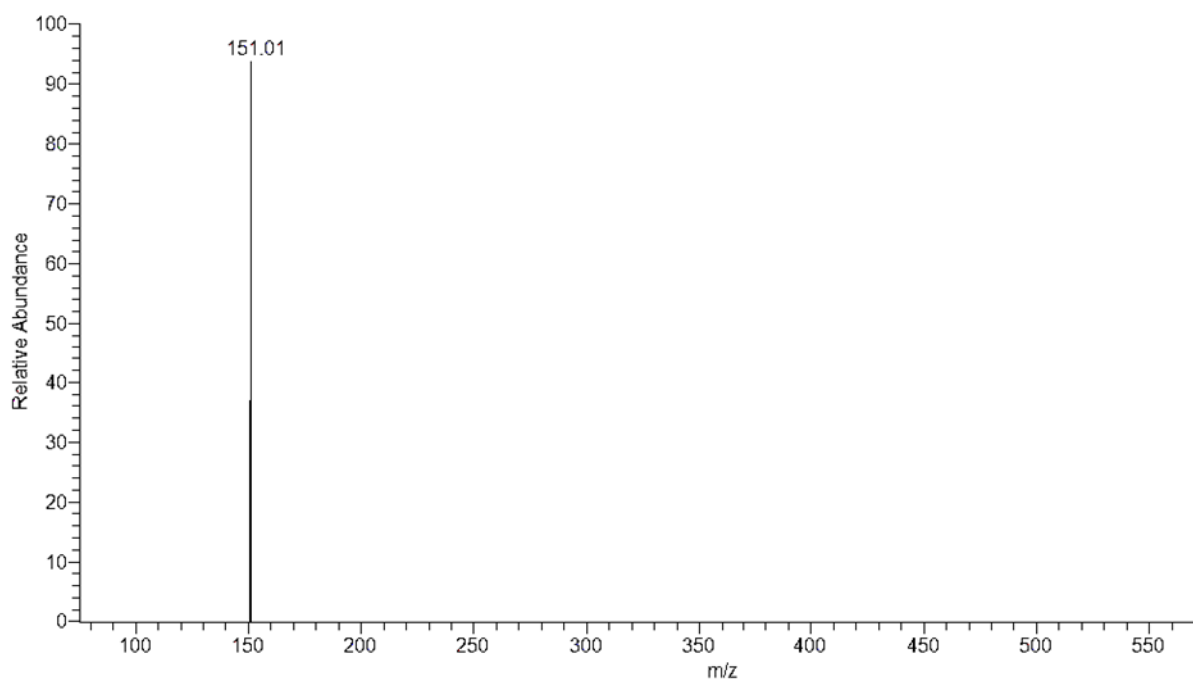
Maseni spektar miricetina



Maseni spektar *p*-kumaroil-heksozid-metil glutarat



Maseni spektar pinobanksina



Maseni spektar kvercetin-3-metiletara

BIOGRAFIJA

Vesna Lj. Savić, diplomirani farmaceut, specijalista Farmaceutske tehnologije, rođena je 15.02.1963. god. u Prokuplju gde je završila osnovnu i srednju školu sa prosečnom ocenom 5,0. Diplomom diplomiranog farmaceuta stekla je na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu 23.06.1986. godine. Po diplomiranju je tri godine radila u Apotekarskoj ustanovi u Nišu koja je šalje na poslediplomsko usavršavanje na matični fakultet u Beogradu, gde 26.11.1992. god. polaganjem specijalističkog ispita i odbranom specijalističkog rada pod nazivom "Mogućnost izrade gela sa pilokarpin-hloridom za oftalmičku primenu" stiče zvanje specijaliste za Farmaceutsku tehnologiju.

Kroz specijalističke studije iskustvo u struci stiče na VMA, Institutu za lekovito bilje, Zavodu za transfuziju, Apotekarskoj ustanovi Beograd. Od 1994. do 2008. godine radi na poslovima šefa i direktora proizvodnje izrade galenskih nesterilnih preparata u A.D. Vetfarm Beograd, P.C. Niš. Od osnivanja farmaceutskog smera Medicinske škole dr Milenko Hadžić u Nišu angažuje se kao profesor saradnik na predmetu Farmaceutska tehnologija. Doktorske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu upisuje 2008. god. na smeru Tehnološko inženjerstvo od kada radi i na poslovima asistenta na predmetu Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom na Medicinskom fakultetu u Nišu na Integriranim studijama farmacije.

Trenutno je, kao istraživač angažovana u realizaciji projekta „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije“ (Ev. br. TR-34012), koji finansira Ministarstvo, prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Posедуje značajno iskustvo u nastavi na predmetima Farmaceutska tehnologija jedan i dva, Biofarmacija, Osnovi farmaceutske biotehnologije, Farmaceutska praksa, Industrijska farmacija, Osnovi kozmetologije i Ambalažni materijali u farmaciji.

Pored doprinosa u nastavi, kandidat se bavi aktivno i naučnim radom. Objavila je jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada u međunarodnim časopisima (M23), četiri rada u časopisima nacionalnog značaja (M52), dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34), petnaest saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Radovi iz oblasti disertacije

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22

1. **Vesna Lj. Savić**, Vesna D. Nikolić, Ivana A. Arsić, Ljiljana P. Stanojević, Stevo J. Najman, Sanja Stojanović, Ivana I. Mladenović-Ranisavljević, COMPARATIVE STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALLANTOIN AND AQUEOUS EXTRACT OF THE COMFREY ROOT (*SYMPHYTUM OFFICINALE* L.) Phytotherapy Rresearch, in press, DOI: 10.1002/ptr.5356.

Rad u međunarodnom časopisu M23

1. **Savić Vesna**, Savić Saša, Nikolić Vesna, Nikolić Ljubiša, Najman Stevo, Lazarević Jelena, Đorđević Aleksandra, The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity, Hemijska industrija, 69(1) (2015) 1-9.

Saopštenje na međunarodnm skupu štampano u izvodu M34

1. Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Vanja Tadić, Ivana Arsić, Sofija Đorđević, Dušanka Runjaić-Antić, Nataša Blažević-Kamenov, Snežana Savić, *In vivo* effects of the creams containing mud from Banja Vrujci and plant extracts on surfactant-irritated skin, 8th EADV Spring Symposium, Carlsbad, Czech Republic, P109 (2011)

Rad u časopisu nacionalnog značaja M52

1. Ivana Arsić, Vanja Tadić, Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Nataša Blažević-Kamenov, Sofija Đorđević, Dušanka Runjaić-Antić, Ispitivanje antiiritantnog i vlažećeg efekta krema sa biljnim ekstraktima na veštački iritiranu kožu, Arhiv za farmaciju, 5 (2010) 786-787

2. **Vesna Savić**, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Dušica Ilić, Biljana Stanković, Milorad Cakić, Ljubiša Nikolić, Kinetika ekstrakcije i antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta iz korena gaveza (*Symphytum Officinale* L.), Savremene tehnologije 1(2) (2012) 41-47.

Saopštenje na skupu nacionalnog značaja štampano u izvodu M64

1. Dragana Stojiljković, Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Snežana Savić, Uticaj različitih emolijenasa na strukturu i vlažeći potencijal kremova stabilizovanih fazom tečnih kristala; 18 Kongres

udruženja dermatovenerologa Srbije sa internacionalnim učešćem, Beograd 4-6.6.2009. Zbornik radova, (PP19).

2. Marija Tasić-Kostov, Dradana Stojiljković, **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Snežana Savić, Uticaj različitih emolojenasa na strukturu i vlažeći potencijal kremova stabilizovanih GMSse, VIII Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, 23-24.oktobar 2009. Tehnološki fakultet Leskovac, Zbornik izvoda radova, OHT-12/OCT-12, str. 102.

3. Milica Stanković, **Vesna Savić**, Valentina Marinković, Legislation and recommendations of the european union in determining the irritation potential of cosmetic ingredients, Macedonian Pharmaceutical Bulletin 2011; 57 (suppl), Fifth Congress Of Pharmacy Of Macedonia With International Participation, Ohrid, Macedonia, 21.-25. September 2011, str. 263.

4. **Vesna Savić**, Jelena Lazarević, Aleksandra Đordjević, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza (*Symphythum officinalae*) dobijenog soxhlet ekstrakcijom, X Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Tehnološki fakultet Leskovac, 22-23.10.2013., Zbornik izvoda radova, BPT-1, str. 51.

5. **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Milica Stanković, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Dugotrajna *in vivo* studija o uticaju gela sa ekstraktom gaveza (*Symphythum officinalae*) na vlažnost kože, X Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Tehnološki fakultet Leskovac, 22-23.10.2013., Zbornik izvoda radova, OHT-4, str. 102.



Универзитет у Нишу

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ХЕМИЈСКИ САСТАВ I ФАРМАКОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
ВОДеног ЕКСТРАКТА КОРЕНА ГАВЕРА (SYMPHITUM OFFICINALE)

која је одбрањена на ... 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, _____

Аутор дисертације: VEŠNA G. SAVIC

Потпис аутора дисертације:

Všanić



Универзитет у Нишу

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

VEŠNA SAVIC

Наслов дисертације:

HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKE
AKTIVNOSTI VODENOG EKSTRAKTA KORENA GAVELA
(SYMPLEUM)
OFF. 2

Ментор:

PROF. DR. VESNA MIROLO

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Vanic



Универзитет у Нишу

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

ХЕМИЈСКИ САСТАВ I ФАРМАКОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
ВОДЕНОГ ЕКСТРАКТА КОРЕНА ГАДЕРА
(SYMPHYTUM OFFICINALE L.)

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)

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

У Нишу, _____

Аутор дисертације: VESNA L. SAVIC

Потпис аутора дисертације:

V Savic