

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana R. Žugić

**EKSTRAKT TALUSA *USNEA BARBATA*  
(L.) WEBER EX F. H. WIGG.,  
PARMELIACEAE U EMULZIONIM  
NOSAČIMA STABILIZOVANIM  
BIORAZGRADIVIM EMULGATORIMA:  
PREFORMULACIONA I FORMULACIONA  
ISTRAŽIVANJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Ana R. Žugić

**EKSTRAKT TALUSA *USNEA BARBATA*  
(L.) WEBER EX F. H. WIGG.,  
PARMELIACEAE U EMULZIONIM  
NOSAČIMA STABILIZOVANIM  
BIORAZGRADIVIM EMULGATORIMA:  
PREFORMULACIONA I FORMULACIONA  
ISTRAŽIVANJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Ana R. Žugić

**EXTRACT OF THE TALUS OF *USNEA BARBATA* (L.) WEBER EX F.H. WIGG.,  
PARMELIACEAE IN THE EMULSION  
VEHICLES STABILIZED WITH  
BIODEGRADABLE EMULSIFIERS:  
PREFORMULATION AND FORMULATION  
INVESTIGATIONS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu–Farmaceutskog fakulteta. Deo rada urađen je u Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tbingenu, Nemačka; Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“; Institutu za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Nišu–Medicinskog fakulteta; Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Univerziteta u Beogradu–Medicinskog fakulteta i Katedri za mikrobiologiju Univerziteta u Beogradu–Fakultet veterinarske medicine

MENTOR

\_\_\_\_\_  
Dr Snežana Savić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. \_\_\_\_\_  
Dr Gordana Vuleta, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet

2. \_\_\_\_\_  
Dr Vanja Tadić, naučni savetnik,  
Institut za proučavanje lekovitog bilja  
„Dr Josif Pančić“, Beograd

3. \_\_\_\_\_  
Dr Rolf Daniels, redovni profesor,  
Eberhard Karls Univerzitet, Tbingen, Nemačka

4. \_\_\_\_\_  
Dr Ivana Arsić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Nišu–Medicinski fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., Parmeliaceae u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim emulgatorima:

preformulaciona i formulaciona istraživanja

#### SAŽETAK

**Uvod** Lokalna terapija antibiotskim preparatima predstavlja pogodan način prevencije i/ili lečenja određenih infekcija kože, ali ima i niz ograničenja koja su vezana kako za lekovite supstance sa antimikrobnim delovanjem, tako i za podloge koje se koriste kao njihovi nosači. Pored porasta rezistencije bakterija, nedostatak dermalne primene antibiotika je i njihova slaba penetracija u kožu, ali i toksičnost nekih od njih prema humanim ćelijama. Usled toga, nameće se potreba za pronalaženjem novih supstanci sa antimikrobnom aktivnošću širokog spektra dejstva i poboljšanom dermalnom raspoloživošću/bezbednosnim profilom. Kao potencijalni izvori ovakvih supstanci sve više se istražuju lišajevi, među kojima se naročito istakla *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Parmeliaceae (jevrejska ili lišaj brada). Iako se brojna biološka svojstva lišaj brade pripisuju usninskoj kiselini, novija istraživanja ukazala su na neke prednosti upotrebe njenog ekstrakta dobijenog primenom natkritičnog ugljen-dioksida (CO<sub>2</sub>) u odnosu na ovu supstancu *per se*. Sa druge strane, poznato je da su emulzioni sistemi (naročito kremovi), kao najpopularniji nosači lekovitih supstanci u dermatološkim preparatima, često stabilizovani tradicionalnim anjonskim/nejonskim mešanim emulgatorima, koji mogu izazvati neželjene reakcije, posebno na oboleloj koži. Pored toga, značajan uticaj kozmetičke industrije na dermofarmaciju je, uz porast zabrinutosti za zaštitu životne sredine, stavio u fokus istraživanja savremenih emulgatora povoljnijeg ekološkog i dermatološkog profila, koji istovremeno mogu da obezbede poboljšane senzorne osobine kremova za primenu na koži.

**Cilj istraživanja** Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj emulzionog sistema tipa hidrofilnog krema sa biorazgradivim alkil poligukozidnim (APG) emulgatorima prirodnog porekla, kao nosača za ekstrakt talusa *U. barbata* sa kvantifikovanom usninskom kiselinom, kroz procenu koloidne strukture, fizičke stabilnosti i biofarmaceutskih karakteristika, te ispitivanja efikasnosti i bezbednosti prototip

formulacije gotovog proizvoda, koji bi našao potencijalnu primenu kao alternativa antibiotskim preparatima u lokalnoj terapiji infekcija kože.

**Metode** Eksperimentalni rad sproveden je u tri faze: 1) Hemijska analiza ekstrakta lišaj brade dobijenog primenom natkritičnog CO<sub>2</sub> (U-NK) nasuprot konvencionalnim metodama ekstrakcije sprovedena je upotrebom spektrofotometrijske metode/tečne hromatografije visokih performansi, dok je procena njihovih bioloških aktivnosti (i usninske kiseline *per se*) izvršena primenom *in vitro* testova: mikrodilucione metode u bujonu (antimikrobna), testom kisele fosfataze/metodom protočne citometrije (citotoksična) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)/FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power assay*) testom (antioksidativna). 2) Fizičko-hemijske osobine odabranog ekstrakta lišaj brade procenjene su određivanjem rastvorljivosti i particionog koeficijenta (*shake-flask* metoda), kontaktnog ugla (metoda statične sedeće kapi) i upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije. Radi ispitivanja fizičko-hemijske stabilnosti/koloidne stukture kremova na bazi APG emulgatora (sa i bez dodatka ekstrakta, uz variranje njegove koncentracije/postupka inkorporiranja) sprovedena je sveobuhvatna karakterizacija primenom polarizacije, fluorescentne i spektralne Raman mikroskopije; merenjem pH i električne provodljivosti; kontinualnom reološkom analizom; diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom i termogravimetrijskim merenjima. Biofarmaceutske karakteristike kremova sa ekstraktom procenjene su *in vitro* analizom liberacionih profila (sistem vertikalnih difuzionih ćelija) i *in vivo* ispitivanjem dermalne raspoloživosti (primenom *tape stripping* metode) usninske kiseline. 3) Određivanje efikasnosti odabranog krema sa ekstraktom izvršeno je *in vitro* (mikrodiluciona metoda u bujonu za procenu antimikrobne aktivnosti) i *in vivo* (merenja relevantnih biofizičkih parametara kože), dok je evaluacija preliminarnog bezbedonosnog profila procenjena *in vivo* (takođe primenom biofizičkih metoda). U cilju objektivnog sagledavanja rezultata, ekperimenti 2. i 3. faze sprovedeni su i sa uzorkom poredbenog preparata, izrađenog sa oficinalnom emulzionom podlogom (Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011), koja je stabilizovana konvencionalnim nejonskim emulgatorima.

**Rezultati** U-NK je imao najviši sadržaj polifenola/usninske kiseline i, s tim u vezi, pokazao najbolju aktivnost u ispitivanjima svih bioloških svojstava (ekvivalentnu ili poboljšanu u odnosu na usninsku kiselinu). Na osnovu najboljeg odnosa antimikrobnog potencijala

protiv bakterija-uzročnika kožnih infekcija i citotoksičnosti prema humanim keratinocitima/literaturnih podataka, odabrane su tri potencijalne terapijske koncentracije U-NK za njegovo inkorporiranje u emulzionu podlogu tipa hidrofilnog krema stabilizovanu pomoću dva novija APG emulgatora (podloga M). Fizičko-hemijska karakterizacija U-NK ukazala je na njegovu slabu rastvorljivost i u polarnim i u nepolarnim rastvaračima, sa izraženijim hidrofobnim karakterom i tendencijom njegovih čestica ka uređenju na granici faza/međusobnoj agregaciji. Na osnovu ovih nalaza, osmišljena su dva načina za inkorporiranje U-NK u ispitivane kreme: suspendovanjem u gotovu krem podlogu (S uzorci) i dispergovanjem u masnu fazu krema, pre mešanja sa vodenom fazom (D uzorci). Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije ukazali su na dobru fizičko-hemijsku stabilnost podloge M, kao i na različit uticaj dodatka U-NK na njenu koloidnu strukturu, shodno njegovoj koncentraciji/načinu inkorporiranja. Raman spektralna mikroskopija pokazala je, zajedno sa nalazima fizičko-hemijske karakterizacije ekstrakta, da njegove čestice učestvuju u koloidnoj strukturi ispitivanih kremova obe serije (S i D) putem sličnih mehanizama, ali da je, bez obzira na ovu činjenicu, variranje načina inkorporiranja U-NK rezultovao razlikama u njihovoj koloidnoj strukturi, na koju je dodatno uticala i koncentracija dodatog ekstrakta. Navedeni eksperimenti pokazali su da je suspendovanje U-NK u podlogu M pogodniji način njegovog inkorporiranja, sa aspekta preliminarne fizičke stabilnosti. Dalja *in vitro* studija liberacije potvrdila je da razlike u strukturi S i D uzoraka imaju odlučujući uticaj na oslobađanje usninske kiseline, ističući uzorak M2S (u kojem je ekstrakt suspendovan u podlogu M u koncentraciji koja odgovara sadržaju usninske kiseline od 2 % (m/m) u finalnoj formulaciji) kao ispitivani krem sa najboljom liberacionim profilom, koji je, s tim u vezi, odabran kao prototip formulacija finalnog proizvoda sa APG emulgatorima. Komparativna fizičko-hemijska karakterizacija ovog i odgovarajućeg poredbenog uzorka N2S (u kojem je U-NK inkorporiran suspendovanjem u gotovu farmakopejsku podlogu (N) u istoj koncentraciji) ukazala je na inherentne razlike u njihovoj koloidnoj strukturi i senzornim karakteristikama (poboljšane u uzorku M2S), ali i određena neslaganja konduktometrijskih i kontinualnih reoloških merenja, namećući potrebu za dodatnim ispitivanjima u cilju konačne procene fizičke stabilnosti poredbenog u odnosu na APG uzorak. Izmerene pH vrednosti uzorka N2S ukazale su na njegovu

zadovoljavajuću preliminarnu hemijsku stabilnost, uporedivu sa onom nađenom u uzorku M2S. Uporedna biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih kremova ukazala je na bolju *in vitro* liberaciju usninske kiseline iz uzorka N2S u odnosu na M2S, i obrnuto, na njenu bolju dermalnu raspoloživost iz APG uzorka u odnosu na poredbeni. Dalja ispitivanja efikasnosti pokazala su bolji antimikrobni potencijal uzorka M2S protiv kutanih patogena u odnosu na N2S, kao i ekvivalentni potencijal njihovih korespodentnih podloga (M i N) da poprave barijernu funkciju kože narušenu infekcijom. Zadovoljavajući preliminarni bezbednosni profili pokazani su kako za uzorke sa APG emulgatorima (M i M2S), tako i za odgovarajuće poredbene uzorke (N i N2S).

**Zaključak** Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije pokazali su da se razvijena podloga stabilizovana pomoću dva novija emulgatora APG tipa može smatrati pogodnim nosačem za ekstrakt talusa *U. barbata* dobijen primenom natkritičnog CO<sub>2</sub>, koji je suspendovan u navedenu podlogu u koncentraciji koja odgovara sadržaju usninske kiseline od 2 % (m/m) u finalnoj formulaciji; tako je dobijena prototip formulacija gotovog proizvoda u obliku hidrofilnog krema, zadovoljavajuće fizičko-hemijske stabilnosti, biofarmaceutskih karakteristika, efikasnosti i bezbednosti za dermalnu primenu, uz potencijalni klinički značaj u lokalnoj terapiji infekcija kože, kao moguća alternativa lokalnim antibioticima. Takođe, može se zaključiti da je ispitivana APG podloga pokazala određene povoljnije karakteristike kao nosač za navedeni ekstrakt u poređenju sa farmakopejskom podlogom, naročito uzimajući u obzir njene poboljšane senzorne karakteristike, kao osobinu koja je često odlučujuća za komplijansu pacijenata.

**Ključne reči** *Usnea barbata*, usninska kiselina, ekstrakt dobijen primenom natkritičnog CO<sub>2</sub>, alkil poliglukozidni emulgatori, koloidna struktura, interakcija aktivne supstance i emulzionog nosača, fizičko-hemijska stabilnost, biofarmaceutska ispitivanja, antimikrobna aktivnost, performanse na koži.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:** 615.45.1:582.29(043.3)

665.584.2:615.322(043.3)



Extract of the talus of *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg.,  
Parmeliaceae in the emulsion vehicles stabilized with biodegradable  
emulsifiers: preformulation and formulation investigations

ABSTRACT

**Introduction** Local therapy with antibiotic preparations represents the preferable way of prevention and/or treatment of some skin infections but also has a number of limitations connected to antimicrobial agents on one the hand and vehicles used as their carriers, on the other. Aside from bacterial resistance growth, a major problem regarding dermal application of antibiotics is their poor penetration into the skin, and also toxicity to human cells, documented for some of them. Therefore, there is a growing interest in the research concerning new substances with broad-spectrum antimicrobial activity and improved dermal availability/safety profile. Lately, various lichens are being intensively investigated as potential sources of such substances, among which *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., Parmeliaceae (old man's beard) has been singled out, as one of the most frequently investigated. Although various biological properties of old man's beard have been attributed to usnic acid, recent research suggested certain benefits of usage of its extract obtained using supercritical carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), compared to this compound *per se*. On the other hand, it is well established that the emulsion systems (particularly creams), as the most popular carriers in dermatological preparations, are often stabilized using conventional anionic/non-ionic emulsifiers, known to cause adverse effects, especially in the diseased skin. Besides that, a major impact of the cosmetic industry on dermopharmacy, alongside with the growing environmental concerns, has put in the focus research of contemporary emulsifiers with favorable dermatological and ecological profile, which are also able to provide enhanced sensory properties of creams for skin application.

**Aim** The aim of this doctoral dissertation was the development of an emulsion system of hydrophilic cream type based on biodegradable alkyl polyglucoside (APG) emulsifiers, as a potential carrier for the extract of the talus of *U. barbata* with quantified usnic acid, throughout the assessment of colloidal structure, physical stability and biopharmaceutical characteristics and also evaluation of efficacy and safety of the prototype formulation of the

final product, which could potentially serve as an alternative to the antibiotic preparations in the local treatment of skin infections.

**Methods** Experimental work was organized in three phases: 1) Chemical analysis of the extract of the talus of *U. barbata* obtained using supercritical CO<sub>2</sub> (U-NK) vs. the extracts obtained using conventional extraction methods was performed using spectrophotometric method/high performance liquid chromatography, while the assessment of their biological properties (compared to usnic acid *per se*) was carried out using *in vitro* tests: broth microdilution method (antimicrobial), acid phosphatase assay/flow cytometry (cytotoxic), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)/FRAP (ferric reducing antioxidant power assay) tests (antioxidative activity). 2) Physicochemical properties of the chosen extract were evaluated by the solubility study and partition coefficient determination (shake-flask method) and contact angle determination (static sessile drop method), as well as by means of scanning electron microscopy. In order to investigate physicochemical stability/colloidal structure of the APG-based creams (with and without the extract, by varying its concentration/method of incorporation), a comprehensive characterization was performed using polarization, fluorescence and confocal Raman microscopy; pH and conductivity measurements; continual rheological analysis; differential scanning calorimetry and thermogravimetric measurements. Biopharmaceutical properties of the creams with the extract were assessed by an *in vitro* analysis of liberation profiles (using vertical diffusion cells system) and *in vivo* test of dermal availability (by means of tape stripping method) of usnic acid. 3) The efficiency of the chosen cream with the extract was investigated *in vitro* (broth microdilution method for the assessment of antimicrobial activity) and *in vivo* (measurements of the relevant biophysical parameters of skin), while the evaluation of the preliminary safety profile was performed *in vivo* (again, using biophysical measurements). With the purpose to objectively evaluate the obtained results, the 2<sup>nd</sup> and the 3<sup>rd</sup> phase of experiments were performed with the referent preparation, made with pharmacopoeial emulsion vehicle-Non-ionic hydrophilic cream, DAB 2011, stabilized with conventional non-ionic emulsifiers.

**Results** U-NK had the highest total phenolic/usnic acid content and accordingly showed the best activity in all tested biological properties (equivalent or enhanced compared to usnic

acid). Based on the best ratio of antimicrobial potential against bacteria-causative agents of skin infections and cytotoxicity in normal human keratinocytes/literature data, three potential therapeutic concentrations of U-NK were selected for its incorporation into the emulsion vehicle of hydrophilic cream type, stabilized with two novel APG emulsifiers (vehicle M). Physicochemical characterization of U-NK pointed to its poor solubility in both polar and non-polar solvents, with more pronounced hydrophobic character and the tendency of its particles towards arrangement at the oil-water interface/self-aggregation. Based on these results, two preparation protocols i.e. suspending U-NK into the APG-based vehicle (S samples) and dispersing it into the oil phase of the cream, prior to addition to the water phase (D samples) were designed. The results of physicochemical characterization pointed to a good physicochemical stability of the vehicle M, and also a different influence of U-NK addition to its colloidal structure, pursuant to its concentration/method of incorporation. Raman spectral imaging, alongside with the findings of physicochemical characterization of the extract, suggested its particles to participate in the colloidal structure of both groups of creams (S and D) via similar mechanisms; nevertheless, varying the method of U-NK incorporation resulted in the different colloidal structure of these emulsion systems, additionally influenced by the concentration of the added extract. Stated experiments proved that suspending U-NK into the vehicle was the preferable method of its incorporation, regarding physical stability. Further *in vitro* liberation study revealed differences in the structure of S and D samples to have a decisive role in usnic acid release, singling out M2S (in which the extract was suspended into vehicle M in the concentration corresponding to 2 % (w/w) of usnic acid in the final formulation) as the sample with the best liberation profile; thus, this sample was chosen as the prototype formulation of the final product with APG emulsifiers. Comparative physicochemical characterization of this and the appropriate referent sample N2S (in which U-NK was suspended into the pharmacopoeial vehicle (N) in the same concentration) pointed to the inherent differences in their colloidal structure and sensory characteristics (enhanced in the sample M2S), but also certain dissidences in findings of conductivity and continual rheological measurements, imposing the need for additional investigations for the final assessment on physical stability of the referent sample, compared to the APG-based one. Measured pH

values of the sample N2S suggested its satisfactory preliminary chemical stability, comparable to the one found in the sample M2S. Comparative biopharmaceutical characterization of the tested creams indicated better *in vitro* liberation of usnic acid from the sample N2S compared to M2S, and *vice versa*, its better dermal availability from APG-based sample compared to the referent one. Further efficiency assessment revealed better antimicrobial potential of the sample M2S against cutaneous pathogens, relative to N2S, as well as an equivalent potential of their corresponding vehicles (M and N) to repair the barrier function of the skin disturbed by the infection. Satisfactory preliminary safety profiles were shown for APG-based (M and M2S) and the appropriate referent samples (N and N2S).

**Conclusion** Results of this doctoral dissertation suggested that the developed vehicle stabilized using two novel emulsifiers of APG type could be considered as suitable carrier for the extract of the talus of *U. barbata* obtained using supercritical CO<sub>2</sub>, which was suspended into the stated vehicle in the concentration corresponding to 2% (w/w) of usnic acid in the final formulation; in this way, a prototype formulation of the final product in the form of a hydrophilic cream was developed, which was shown to possess satisfactory physicochemical stability, biopharmaceutical characteristics, efficiency and safety for dermal application, as well as potential clinical relevance in the local treatment of skin infections, as a possible alternative to local antibiotics. In addition, it could be concluded that the investigated APG-stabilized base revealed certain preferential features as the carrier for U-NK compared to the pharmacopoeial one, especially considering its improved sensory characteristics, as a property often decisive for the patient compliance.

**Keywords** *Usnea barbata*, usnic acid, extract obtained using supercritical CO<sub>2</sub>, alkyl polyglucoside emulsifiers, colloidal structure, interaction of active substance and an emulsion carrier, physicochemical stability, biopharmaceutical characterization, antimicrobial activity, skin performance.

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

**UDK No.** 615.45.1:582.29(043.3)

665.584.2:615.322(043.3)

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Primena antibiotika u lokalnoj terapiji nekomplikovanih/površinskih infekcija kože. ....	1
1.1.1. Procena efekata dejstava antibiotika u lokalnoj terapiji najčešćih nekomplikovanih/površinskih infekcija kože.....	3
1.1.1.1. Lokalna primena antibiotika u terapiji impetiga.....	3
1.1.1.2. Lokalna primena antibiotika u terapiji sekundarno inficiranih dermatoza.....	4
1.1.1.3. Lokalna primena antibiotika u prevenciji i terapiji sekundarno inficiranih traumatskih lezija kože .....	5
1.1.2. Ograničenja lokalne primene antibiotika i budući trendovi .....	6
1.2. Lišajevi kao potencijalni izvor novih lekovitih supstanci .....	8
1.2.1. <i>Usnea barbata</i> (L.) Weber ex F. H. Wigg., Parmeliaceae .....	11
1.2.2. Usninska kiselina.....	13
1.2.2.1. Fizičko-hemijske osobine .....	13
1.2.2.2. Biološka svojstva/farmakološke aktivnosti .....	14
1.2.3. <i>U. barbata</i> kao izvor usninske kiseline: ekstrakcija primenom natkritičnih fluida vs. klasične metode ekstrakcije.....	18
1.2.4. Savremena upotreba lišaja <i>U. barbata</i> i usninske kiseline.....	20
1.2.4.1. Razvoj novih proizvoda sa usninskom kiselinom/lišajem <i>U. barbata</i> kao aktivnom supstancom: pregled novijih istraživanja .....	23
1.3. Nosači/podloge u dermofarmaceutskim preparatima .....	25
1.3.1. Alkil poliglukozidni emulgatori kao stabilizatori savremenih dermkozmetičkih ili dermofarmaceutskih emulzija i kremova .....	27
1.3.1.1. Cetearil glukozid i cetearil alkohol.....	29
1.3.1.2. Koko glukozid i cetearil alkohol/Arahidil glukozid i arahidilbehenil alkohol .....	31
1.3.1.3. Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid .....	33
1.3.1.4. C <sub>14-22</sub> alkohol i C <sub>12-20</sub> glukozid/Kokoglukozid i alkohol kokosovog oraha .....	35
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	43
3.1. Materijali i metode.....	43
3.1.1 Materijali .....	43

3.1.2. Metode i oprema.....	44
3.1.2.1. Izrada ekstrakata talusa <i>U. barbata</i> .....	44
3.1.2.2. Ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata talusa <i>U. barbata</i> .....	46
3.1.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	46
3.1.2.2.2. HPLC analiza.....	46
3.1.2.3. Ispitivanje bioloških aktivnosti ekstrakata talusa <i>U. barbata</i> /usninske kiseline .....	47
3.1.2.3.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti .....	47
3.1.2.3.1.1. Kulture ćelija .....	47
3.1.2.3.1.2. Određivanje vijabilnosti ćelija.....	47
3.1.2.3.1.3. Ispitivanje mehanizma citotoksične aktivnosti.....	48
3.1.2.3.1.3.1. Analiza ćelijskog ciklusa.....	48
3.1.2.3.1.3.2. Određivanje prisustva kiselih citoplazmatskih vezikula .....	49
3.1.2.3.1.3.3. Merenje nastajanja ROS .....	49
3.1.2.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti .....	50
3.1.2.3.2.1. Bakterijski sojevi.....	50
3.1.2.3.2.2. Test antimikrobne aktivnosti .....	50
3.1.2.3.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	51
3.1.2.3.3.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test .....	51
3.1.2.3.3.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test .....	52
3.1.2.4. Preformulaciona studija odabranog ekstrakta talusa <i>U. barbata</i> .....	52
3.1.2.4.1. Određivanje rastvorljivosti .....	52
3.1.2.4.2. Određivanje particionog koeficijenta .....	53
3.1.2.4.3. Određivanje kontaktnog ugla.....	53
3.1.2.4.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	54
3.1.2.5. Priprema ispitivanih kremova.....	54
3.1.2.6. Fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih kremova .....	57
3.1.2.6.1. Polarizaciona i fluorescentna mikroskopija.....	57
3.1.2.6.2. Reološka merenja .....	57
3.1.2.6.3. Raman spektralna mikroskopija .....	58
3.1.2.6.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	59

3.1.2.6.5. Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	59
3.1.2.6.6. Merenje pH i električne provodljivosti.....	59
3.1.2.7. Biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih kremova.....	60
3.1.2.7.1. <i>In vitro</i> ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz ispitivanih podloga	60
3.1.2.7.2. <i>In vivo</i> ispitivanje dermalne raspoloživosti usninske kiseline iz ispitivanih podloga .....	61
3.1.2.8. <i>In vitro</i> procena antimikrobnog potencijala ispitivanih kremova.....	63
3.1.2.9. <i>In vivo</i> procena efekata ispitivanih kremova na koži .....	63
3.1.2.9.1. <i>In vivo</i> procena efekata na nespecifične simptome infekcija kože.....	64
3.1.2.9.2. <i>In vivo</i> procena preliminarnog bezbednosnog profila/iritacionog potencijala .....	65
3.1.2.10. Statistička obrada podataka .....	65
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada .....	66
4.1.1. Ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata talusa <i>U. barbata</i> .....	66
4.1.2. Ispitivanje bioloških aktivnosti ekstrakata talusa <i>U. barbata</i> /usninske kiseline .....	67
4.1.2.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti .....	67
4.1.2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti .....	74
4.1.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	75
4.2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada .....	79
4.2.1. Preformulaciona studija ekstrakta talusa <i>U. barbata</i> dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO <sub>2</sub> .....	79
4.2.2. Ispitivanja kremova stabilizovanih APG emulgatorima.....	80
4.2.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija kremova stabilizovanih APG emulgatorima .....	80
4.2.2.1.1. Polarizaciona i fluorescentna mikroskopija.....	80
4.2.2.1.2. Reološka merenja .....	84
4.2.2.1.3. Raman spektralna mikroskopija .....	88
4.2.2.1.4. Termoanalitička merenja (DSC i TGA) .....	91
4.2.2.1.5. Merenje pH i električne provodljivosti.....	95
4.2.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz podloge stabilizovane APG emulgatorima.....	97

4.2.3. Ispitivanja poredbenih kremova .....	101
4.2.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija poredbenih kremova.....	101
4.2.3.2. <i>In vitro</i> ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz poredbene podloge ..	108
4.2.4. Komparativna <i>in vivo</i> procena dermalne raspoloživosti usninske kiseline iz podloge stabilizovane APG emulgatorima i poredbene podloge .....	110
4.3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada .....	113
4.3.1. Procena efikasnosti razvijene prototip formualcije krema stabilizovanog APG emulgatorima i odgovarajućeg poredbenog krema .....	113
4.3.1.1. <i>In vitro</i> procena antimikrobnog potencijala kremova sa ekstraktom .....	113
4.3.1.2. <i>In vivo</i> procena efekata ispitivanih podloga na nespecifične simptome infekcija kože.....	114
4.3.2. <i>In vivo</i> procena bezbednosti razvijene prototip formulacije krema stabilizovanog APG emulgatorima i odgovarajućeg poredbenog krema .....	115
5. ZAKLJUČAK.....	119
6. LITERATURA .....	124
7. Prilozi .....	142
7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije.....	142
7.2. Biografija autora .....	144
7.3. Izjava o autorstvu .....	145
7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije .....	146
7.5. Izjava o korišćenju.....	147



## 1. UVOD

### 1.1. Primena antibiotika u lokalnoj terapiji nekomplikovanih/površinskih infekcija kože

Nekomplikovane infekcije kože (koje se u literaturi navode i kao nekomplikovane infekcije kože i mekih tkiva (engl. *uncomplicated skin and soft tissue infections, uSSTI*), odnosno infekcije kože i struktura kože (engl. *uncomplicated skin and skin-structure infections, uSSSI*<sup>1</sup>) jedna su od najčešćih oboljenja kože, koja samo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) iziskuju skoro 200 miliona poseta lekara godišnje, uz troškove lečenja koji su procenjeni na čak 350 miliona američkih dolara. uSSSI najčešće zahvataju površinske slojeve kože (epidermis i/ili dermis), a osim primarnih infekcija (kao što su impetigo, folikulitis, furunkuloza, paronhija, eritrazma, ektima i dr.), obuhvataju i sekundarne bakterijske infekcije (sekundarne infekcije postojećih lezija kože, kao što su rane, posekotine, opekotine, ujedi itd., zatim sekundarne infekcije dermatoza, kao i superinfekcije gljivičnih i virusnih infekcija kože) (Ferringer i Elston, 2009; Pangilinan i sar., 2009; Pettigrew i sar., 2012).

Terapijske opcije za nekomplikovane infekcije kože obuhvataju inciziju i drenažu u kombinaciji sa antimikrobnom terapijom, koja može biti lokalna ili sistemska (oralna i, povremeno, parenteralna). Dermalna primena antibiotičkih preparata predstavlja pogodan način lečenja ovih infekcija, usled mogućnosti postizanja visoke koncentracije leka na mestu delovanja, manje incidence sistemskih neželjenih efekata (zbog ograničene apsorpcije ili njenog izostanka), mogućnosti kombinovanja nekoliko antibiotika u cilju empirijskog ciljnog delovanja na više potencijalnih kutanih patogena, finansijske isplativosti, dobre komplijanse pacijenata i smanjene mogućnosti pojave rezistencije u odnosu na oralni i parenteralni način primene. (Pangilinan i sar., 2009).

---

<sup>1</sup>Iako se ova dva naziva u kliničkoj praksi često koriste kao sinonimi, SSTI zapravo više predstavlja generičku klasifikaciju, dok je SSSI izraz koji se često upotrebljava u kliničkim studijama. Preciznije, SSTI predstavlja širi pojam koji, pored SSSI, može podrazumevati i infekcije ovojnice (fascija) i mišića (Pettigrew i sar., 2012).

**Tabela 1.** Pregled antibiotičkih preparata registrovanih na svetskom i domaćem tržištu indikovanih za lokalnu terapiju infekcija kože (EMA/H/C/757, 2007; Martindale 36, 2009; Drucker, 2012; Drugs, 2015; NRL, 2015)

Antibiotik(ci)/farmaceutski oblik	Indikacije
Mupirocin/krem, mast (R)	Terapija impetiga i sekundarno inficiranih lezija kože izazvanih bakterijama <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Streptococcus pyogenes</i>
Retapamulin/mast (R)	Terapija impetiga izazvanog bakterijama <i>S. aureus</i> (samo izolati osetljivi na meticilin) i <i>S. pyogenes</i> i sekundarno inficirane kožne lezije (posekotine, ogrebotine i šivene rane)
Fusidinska kiselina/mast, krem, impregnirana kompresna (R)	Terapija primarnih (impetigo, površinski folikulitis, <i>sycosis barbae</i> , paronhijska, eritrazma) i sekundarnih infekcija kože (inficiran ekcematozni dermatitis, inficiran kontaktni dermatitis, inficirane posekotine/abrazije) izazvane osetljivim sojevima bakterija <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> i <i>Corynebacterium minissimum</i>
Gentamicin/krem, mast (R)	Terapija primarnih (impetigo, površinski folikulitis, <i>sycosis barbae</i> , ektima, furunkuloza, i gangrenozna piodermija) i sekundarnih infekcija kože (inficiran ekcematozni dermatitis, inficiran kontaktni dermatitis, pustulozne akne, pustulozna psorijaza, inficiran seboroični dermatitis, inficirane ekzorijacije, bakterijske superinfekcije gljivičnih ili virusnih infekcija) izazvane osetljivim bakterijama
Bacitracin /mast, prašak za kožu (BR)	Prevenција infekcija kože nakon manjeg kompromitovanja integriteta kože, kao što su opekotine, abrazije i manji hirurški zahvati
Bacitracin-cink/ mast (BR)	
Bacitracin-cink, polimiksin B/ mast, (BR)	
Bacitracin-cink, neomicin, polimiksin B/mast (BR)	
Tirotricin/gel, prašak za kožu (BR)	Terapija malih površinskih i umereno vlažnih rana (laceracije, ogrebotine i abrazije) sa prisutnom superinfekcijom izazvanom bakterijskim uzročnicima osetljivim na tirotricin

(R) lekovi koji se mogu izdavati samo uz lekarski recept

(BR) lekovi koji se mogu izdavati bez lekarskog recepta; u SAD su to tzv. *over-the-counter* (OTC) lekovi

S tim u vezi, poslednjih godina su na tržištu prisutni brojni antibiotski preparati za dermatološku primenu, namenjeni lokalnoj terapiji jedne ili više bakterijskih infekcija kože, od kojih većina pripada upravo grupi nekomplikovanih/površinskih infekcija (tabela 1).

### **1.1.1. Procena efekata dejstava antibiotika u lokalnoj terapiji najčešćih nekomplikovanih/površinskih infekcija kože**

Među različitim nekomplikovanim/površinskim infekcijama kože kod kojih je indikovana lokalna primena antibiotika, u novijoj naučnoj literaturi se kao najčešće navode 1) impetigo, 2) sekundarne infekcije dermatoza i 3) sekundarne infekcije traumatskih lezija kože. S tim u vezi, nekoliko novijih preglednih radova sadrži podatke o efektima nakon primene registrovanih antibiotskih preparata upravo u lokalnoj terapiji ovih infekcija kože, kroz kritički osvrt na relevantne kliničke studije, o čemu će biti reči u narednim odeljcima (Pangilinan i sar., 2009; Schwartz i Al-Mutairi, 2010; Drucker, 2012).

#### **1.1.1.1. Lokalna primena antibiotika u terapiji impetiga**

Noviji literaturni podaci pokazuju da je lokalna terapija antibiotskim preparatima u lečenju impetiga efikasnija u odnosu na placebo, i jednako efikasna ili efikasnija u odnosu na oralni put primene antibiotika, te da ih treba upotrebljavati kao poželjnu prvu liniju lečenja ove bakterijske kutane infekcije (Pangilinan i sar., 2009; Schwartz i Al-Mutairi, 2010).

Naime, dve od tri kliničke studije pokazale su efikasnost lokalno primenog retapamulina i fusidinske kiseline u poređenju sa placebom. Lokalna upotreba mupirocina u lečenju impetiga bila je uporediva sa oralnom terapijom (eritromicin) u sedam od sedam studija, a jedna studija pokazala je klinički neuspeh usled mikrobiološke rezistencije ispitivanog oralnog antibiotika (Pangilinan i sar., 2009). Takođe, u poređenju lokalne primene mupirocina i gentamicina u terapiji impetiga, pokazan je sličan klinički odgovor pacijenata lečenih ovim antibioticima, ali je stopa bakteriološkog izlečenja bila statistički značajno viša u grupi lečenoj mupirocinom (Aunhachoke i sar., 1991). Pored toga, mupirocin i retapamulin pokazali su kliničko poboljšanje nakon 7-14 dana lokalne primene kod pacijenata sa impetigom, u poređenju sa placebom i najmanje su jednako efikasni u

poređenju sa antibioticima primenjenim oralnim putem (eritromicin i/ili flukloksacilin) (Pangilinan i sar., 2009). Zaključci navedenih studija u skladu su sa preporukama nedavno objavljenog vodiča američkog društva za infektivne bolesti (engl. *Infectious Diseases Society of America, IDSA*) iz 2014. godine, koji (zavisno od uslova, tj. lokacije i broja lezija) preporučuje lokalnu primenu mupirocina ili retapamulina od 5 dana, uz primenu dva puta dnevno, u terapiji impetiga (Pangilinan i sar., 2009; Stevens i sar., 2014).

#### **1.1.1.2. Lokalna primena antibiotika u terapiji sekundarno inficiranih dermatoza**

Bez obzira na različite uzroke i različite kliničke manifestacije, infekcije izazvane bakterijama *S. aureus* i/ili *S. pyogenes* predstavljaju uobičajenu komplikaciju različitih dermatoza, pre svega nekih inflamatornih oboljenja kože potput ekcema/dermatitisa ili psorijaze (Parish i sar., 2006). S tim u vezi, poslednjih godina nekoliko kliničkih studija imalo je za cilj ispitivanje efekata primene antibiotskih preparata u terapiji ovih sekundarnih infekcija kože.

U jednom istraživanju sa mupirocinom i jednom sa retapamulinom, pokazano je da su ovi antibiotici efikasni posle lokalne primene u obliku krema tj. masti, respektivno, u terapiji sekundarno inficiranih dermatoza, što se moglo uporediti sa oralno primenjenim cefaleksinom. Sa druge strane, navedene studije nisu imale kontrolu (u vidu placebo/podloge u ispitivanim antibiotskim preparatima), što otežava interpretaciju dobijenih rezultata S tim u vezi, placebo-kontrolisano istraživanje Brenemana (1990) nije uspelo da pokaže statistički značajno kliničko poboljšanje sekundarno inficiranih dermatoza nakon njihove lokalne terapije mupirocinom, bez obzira na signifikantan mikrobiološki uspeh (statistički značajno veći stepen eradikacije *S. aureus* i ukupnih patogena u grupi pacijenata lečenih mupirocinom, u odnosu na kontrolnu grupu) (Pangilinan i sar., 2009). Pored toga, treba naglasiti da veliki nedostatak navedenih ispitivanja leži u činjenici da autori nisu opisali na koji način su utvrdili da su postojeće dermatoze sekundarno inficirane, a dodatno i u relativno kratkom periodu praćenja nakon prestanka terapije (engl. *follow up*), što je onemogućilo ispitivanje uticaja ispitivanog tretmana na pojavu recidiva ili ponovljenih infekcija, naročito kod hroničnih dermatoza (Pangilinan i sar., 2009).

### **1.1.1.3. Lokalna primena antibiotika u prevenciji i terapiji sekundarno inficiranih traumatskih lezija kože**

Antibiotiski preparati mogu se primenjivati u prevenciji ili terapiji sekundarnih bakterijskih infekcija traumatskih lezija kože, kao što su ogrebotine, posekotine, abrazije, ujedi insekata ili jednostavne (terapijske ili dijagnostičke) hirurške intervencije (biopsija, ekcizija, šivenje rana i dr.) (Pangilinan i sar., 2009; Schwartz i Al-Mutairi, 2010; Drucker, 2012).

Profilaktička primena lokalnih antibiotika predstavlja deo standardnog postupka u kliničkoj praksi, nakon manjih hirurških intervencija na koži. Ipak, usled zabrinjavajućeg porasta rezistencije bakterija poslednjih godina, ali i visoke incidence alergijskog kontaktnog dermatitisa nekih uobičajeno korišćenih antibiotika (bacitracin i neomicin), postavlja se pitanje opravdanosti njihove primene u prevenciji infekcija kožnih lezija tj. postojanja dovoljno čvrstih dokaza koji ukazuju na kliničke benefite ovakve prakse, naročito ako se uzme u obzir da su novija istraživanja ukazala na relativno malu stopu postoperativnih infekcija rana nakon manjih dermatoloških procedura, u odnosu na broj ovih intervencija koji se sprovede u svetu na godišnjem nivou (Schwartz i Al-Mutairi, 2010; Drucker, 2012).

Neke kliničke studije potvrdile su da profilaktička primena antibiotika smanjuje pojavu infekcija i poboljšava zarastanje rana. Na primer, dva ispitivanja su pokazala značajno smanjenje broja infekcija hirurških rana usled primene spreja koji je sadržao neomicin, bacitracin i polimiksin B (Schwartz i Al-Mutairi, 2010). Pored toga, pokazano je da mast koja kao aktivne sastojke sadrži upravo ovu kombinaciju antibiotika (trostruka antibiotska mast, engl. *triple antibiotic ointment, TAO*) ima pozitivne efekte na zarastanje rana koji nisu u vezi sa njenom antimikrobnom aktivnošću; tačnije pokazano je da TAO povećava brzinu reepitelizacije eksperimentalno indukovanih rana i minimizira stvaranje ožiljaka i dispigmentaciju (Schwartz i Al-Mutairi, 2010). Dodatno, u jednom istraživanju, TAO je pokazala smanjenje stafilokokne kolonizacije površinskih kožnih lezija (uglavnom ujeda komaraca i abrazija) od 15 %, nakon primene tri puta dnevno (Schwartz i Al-Mutairi, 2010), dok je klinička studija Langforda i saradnika (1997) pokazala da je novija TAO,

koja sadrži cetrimid, bacitracin i polimiksin B-sulfat redukovala incidencu kliničkih infekcija sa 12,5 na 1,6 % u poređenju sa placebom (Schwartz i Al-Mutairi, 2010). Komparativno ispitivanje TAO i mupirocina nije pokazalo značajnu razliku između ova dva antibiotska preparata, dok je druga studija ukazala na benefite pretretmana mupirocinom u poređenju sa hlorheksidinom kod ekcizije neoplazme (Pangilinan i sar., 2009). Takođe, jedna velika studija koja se bavila ispitivanjem kontaminiranih rana različite ozbiljnosti otkrila je korist pretretmana bacitracinom i neomicinom, u poređenju sa placebom. Sa druge strane, u ispitivanju čistih hirurških rana nije pronađena značajna razlika između masti sa bacitracinom u poređenju sa njenom podlogom (beli vazelin). Na osnovu toga je zaključeno da sam beli vazelin predstavlja bezbedan i efikasan pretretman koji obezbeđuje jednako nisku stopu pojave infekcija, uz minimalan rizik izazivanja alergije (Pangilinan i sar., 2009).

Kada je reč o kliničkim studijama koje su ispitivale efekte dejstava lokalnih antibiotika u terapiji sekundarno inficiranih rana, jedna studija sa mupirocinom i jedna sa retapamulinom pokazale su da je lokalna primena ovih antibiotika bila uporediva sa oralno primenjenim cefaleksinom, u smislu stope kliničkog i bakteriološkog izlečenja. Suprotno ovome, drugo ispitivanje koje je obuhvatilo 42 pacijenta nije pokazalo kliničku prednost primene lokalnog mupirocina u terapiji sekundarno inficiranih traumatskih lezija kože u poređenju sa podlogom ovog antibiotskog preparata. Stoga, iako su lokalno primenjeni mupirocin i retapamulin bili barem jednako efikasni kao oralno primenjeni antibiotik, ove rezultate je teško interpretirati s obzirom da navedene studije nisu imale kontrolnu grupu (uporedna ispitivanja sa podlogama navedenih antibiotskih preparata) (Pangilinan i sar., 2009).

### **1.1.2. Ograničenja lokalne primene antibiotika i budući trendovi**

Pored prethodno navedenih teorijskih prednosti primene antibiotika u lokalnoj terapiji nekih nekomplikovanih/površinskih bakterijskih infekcija kože, pregled relevantne naučne literature pružio je dokaze o terapijskim efektima njihove primene u prevenciji i/ili lečenju ove grupe bolesti kože (pre svih impetiga i sekundarnih infekcija traumatskih lezija kože) (Pangilinan i sar., 2009).

Ipak, lokalna terapija antibiotskim preparatima može biti limitirana slabom penetracijom lekovite supstance sa antimikrobnim delovanjem u kožu (Pangilinan i sar., 2009). Pored toga, iako je manje sistemskih neželjenih efekata vezano za lokalnu antibiotsku terapiju, postoji mogućnost pojave alergijskog kontaktnog dermatitisa, čija je incidenca, kao što je ranije naglašeno, naročito visoka nakon primene nekih antibiotika poput neomicina i bacitracina. Dodatno, osim aktivnih supstanci, lokalne reakcije na koži mogu izazvati i neki sastojci podloga ovih preparata (Pangilinan i sar., 2009; Schwartz i Al-Mutairi, 2010; Drucker, 2012). Ipak, prethodno pomenuti zabrinjavajući porast rezistentnih sojeva bakterija nakon (prolongirane) izloženosti lokalnim antibioticima predstavlja daleko najveći nedostatak njihove primene. Naime, novija istraživanja ukazala su na rastuću rezistentnost *S. aureus* izolovanog iz impetiga na gentamicin i fusidinsku kiselinu (Nishijima i sar., 2003; Ferringer i Elston, 2009). Takođe, poslednjih godina zabeležen je i značajan porast rezistentnosti ove bakterije, a naročito meticilin-rezistentnog soja (MRSA) na mupirocin, koji je najviše propisivan topikalni antibiotik u SAD, i tretman izbora u terapiji impetiga, osim ukoliko testiranja osetljivosti ne indikuju primenu novijeg antimikrobnog agensa-retapamulina. S tim u vezi, još uvek nisu sprovedena klinička ispitivanja koja bi potvrdila visoku aktivnost ovog antibiotika protiv mupirocin-rezistentnih sojeva, pokazanu *in vitro* (Pangilinan i sar., 2009; Drucker, 2012).

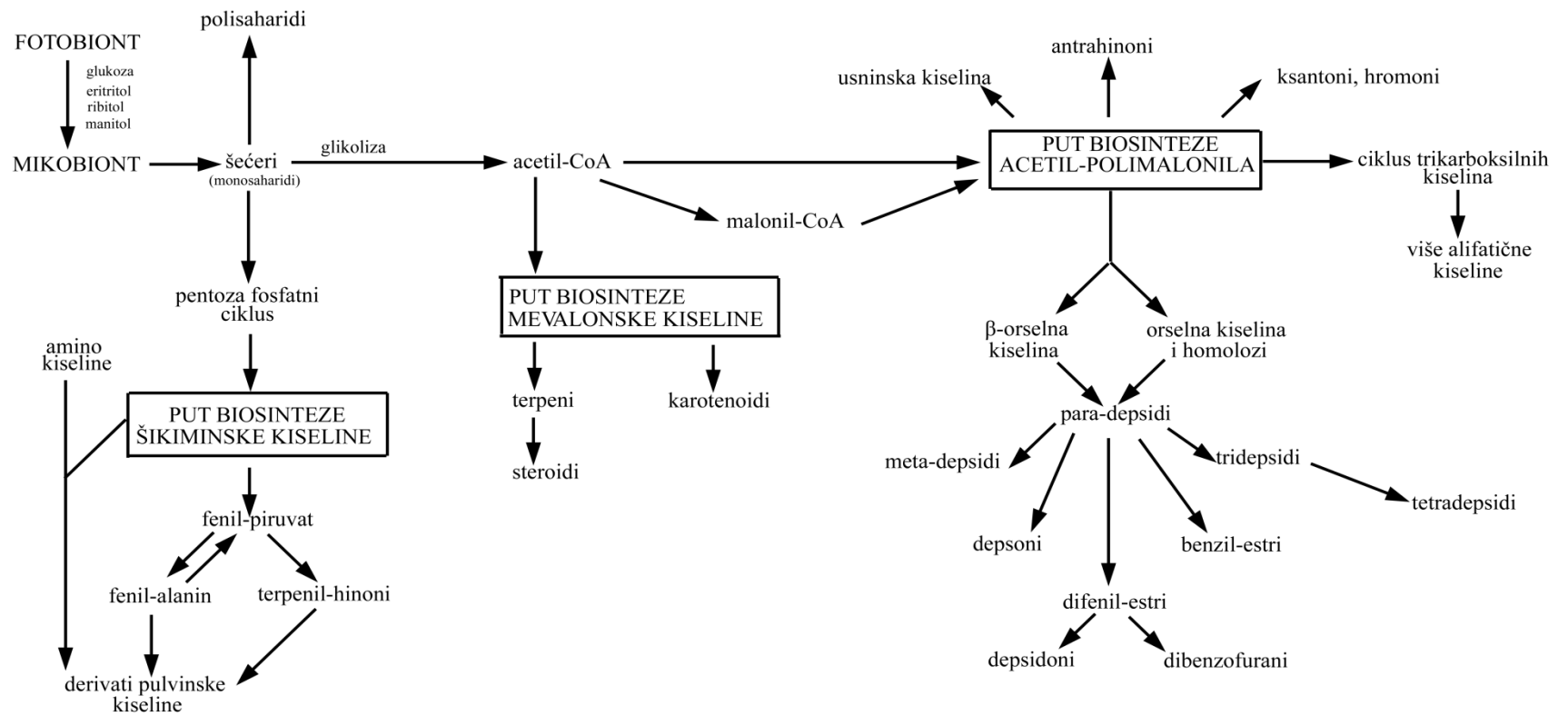
U zaključku, navedena ograničenja primene uobičajeno korišćenih lokalnih antibiotika nameću potrebu za pronalaženjem novih supstanci sa antimikrobnom aktivnošću širokog spektra dejstva i poboljšanom dermalnom raspoloživošću/bezbednosnim profilom, gde je izolovanje sastojaka iz prirodnih izvora (tzv. bioaktivnih komponenti) veoma poželjno (Weckesser i sar., 2007; Pangilinan i sar., 2009).

## 1.2. Lišajevi kao potencijalni izvor novih lekovitih supstanci

Lišajevi predstavljaju stabilne, ekološki obligatorne simbiotske sisteme koji se sastoje od gljive (mikobionta) i jednog ili više fotosintetskih partnera: eukariotske alge i/ili cijanobakterije (fotobiont) ili u nekim slučajevima bakterija koje ne vrše fotosintezu (Molnar i Farkas, 2010; Shrestha i St. Clair, 2013). Približno 21 % svih gljiva je sposobno da se ponaša kao mikobiont u lišaju, te stoga lišajevi predstavljaju najveću simbiotsku grupu među gljivama. U skladu sa tim, od 1983. godine, imena lišajeva se odnose na mikrobionta, odnosno lišajevi pripadaju carstvu Gljiva (Fungi) (Shrestha i St. Clair, 2013).

Biohemijska istraživanja lišajeva doživela su ekspanziju poslednjih decenija, čemu je doprineo razvoj novih metoda hemijske analize, koja su poslužila otkriću novih jedinjenja i njihovih struktura. Do sada je identifikovano oko 1050 sekundarnih metabolita lišajeva, uključujući supstance koje se nalaze u talusu intaktnih lišajeva iz prirode, kao i jedinjenja identifikovana u tkivnim kulturama lišajeva (Shrestha i St. Clair, 2013). Za razliku od primarnih metabolita koji imaju gradivnu funkciju i nezavisno ih sintetišu oba simbiota, sekundarne metabolite proizvode isključivo gljive, nakon čega se one transportuju izvan hifa i akumuliraju u različitim delovima talusa, najčešće u gornjem korteksu ili u medularnom sloju kao ekstraćelijski mali kristali na spoljašnjoj površini hife. Metaboliti lišajeva su, u skladu sa svojom funkcijom, ograničeni na određene delove talusa, a obrasci njihove distribucije su specifični za odgovarajući takson, pa se zbog toga koriste u sistematici lišajeva (Molnar i Farkas, 2010; Shrestha i St. Clair, 2013). Sekundarni metaboliti lišajeva obuhvataju hemijski različita alifatična i aromatična jedinjenja relativno malih molekulskih masa, od kojih većina potiče iz puta biosinteze acetil-polimalonila, a manji broj iz puta biosinteze mavalonske kiseline i šikiminske kiseline (slika 1). Iako potiču isključivo iz mikobionta, metabolička interakcija između mikrobionta i fotobionta u lišaju je neophodna za proizvodnju sekundarnih metabolita, što je u vezi sa njihovim velikim metaboličkim diverzitetom. Usled toga, samo veoma mali broj ovih jedinjenja (50-60) se može, osim u lišajevima, naći u drugim organizmima kao što su gljive koje nisu deo lišajeva ili više biljke (Molnar i Farkas, 2010).





Slika 1. Putevi biosinteze metabolita lišajeva (preuzeto iz Nash i sar., 2002)

Poslednjih godina intenzivno se istražuju biološke aktivnosti lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita sa potencijalnim medicinskim značajem, što je sa jedne strane u vezi sa uočenim prirodnim ulogama koje im omogućavaju veliku prilagodljivost različitim uslovima životne sredine (zaštita od UV zraka i odbrana od predatora i patogenih mikroorganizama), a sa druge za njihovu viševjekovnu tradicionalnu upotrebu u lečenju različitih bolesti (oboljenja krvi i srca, bronhitisa, šuge, lepre, astme, stomačnih poremećaja itd.) (Shrestha i St. Clair, 2013; Gomez-Serranillos i sar., 2014). Savremena istraživanja ukazuju na veliki farmakološki potencijal lišajeva i/ili njihovih metabolita, kao obećavajućih izvora lekova sa antitumorskim, antimikrobnim, antiinflamatornim i antioksidativnim delovanjem (Gomez-Serranillos i sar., 2014; White i sar., 2014). Usled toga, regulatorna tela, kao što je Evropska agencija za lekove (engl. *European Medicines Agency, EMA*) svrstavaju ove simbiotske organizme u kategoriju biljnih lekova za humanu upotrebu (EMA/HMPC/678891/2013, 2014), iako oni, kao što je ranije naglašeno, prema biološkoj klasifikaciji zapravo pripadaju gljivama.



**Slika 2.** *U. barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Parmeliaceae (jevrejska ili lišaj brada)

Rod *Usnea* iz familije Parmeliaceae, predstavlja jedan od najviše ispitanih, posmatrano sa stanovišta farmakoloških aktivnosti (Gomez-Serranillos i sar., 2014). Dodatno, pripadnici ovog roda su među najčešće korišćenim u tradicionalnoj medicini (Madamombe i Afolyan, 2003). Rod *Usnea* obuhvata oko 300 vrsta koje su rasprostranjene širom sveta, od polarnih zona do tropskih krajeva. Dijagnostičke karakteristike uključuju

žbunasti talus sa svetlim, žućkasto zelenim grančicama radijalne simetrije, hrskavičastu centralnu osovinu i prisustvo usninske kiseline u korteksu (Clerc, 1998; Ohmura, 2012; Gomez-Serranillos i sar., 2014). Zbog svog specifičnog izgleda pripadnici roda *Usnea* nazivaju se i bradoliki lišajevi (Clerc, 1998; Gomez-Serranillos i sar., 2014). Jedna od najbolje proučenih vrsta svakako je *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Parmeliaceae (ranije *U. barbata* (L.) Wigg. emend Mot., Usneaceae) (Hager, 1979).

### **1.2.1. *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., Parmeliaceae**

*U. barbata* (jevrejska brada ili lišaj brada) raste na stablima i granama različitih drvenastih i četinariskih vrsta, a naseljava severnu hemisferu Azije, Evrope i Severne Amerike (slika 2). Ima dugogodišnju primenu kao narodni lek za bronhitis, pleuritis i druge respiratorne bolesti, zatim infekcije urinarnih puteva, burberga i mokraćne bešike i kod zarastanja rana (Hager, 1979; Ingolfstodt, 2002; Madamombe i Afolyan, 2003). Takođe, jevrejska brada je priznata od strane Komisije E (naučni savetodavni odbor nemačkog Federalnog zavoda za lekove i medicinska sredstva za odobravanje biljnih supstanci i preparata koji se koriste u tradicionalnoj narodnoj medicini), prema čijoj monografiji je njena preporučena upotreba u terapiji blagih zapaljenja oralne i sluzokože ždretra u obliku lozengi (PDR for Herbal Medicines, 2004). Dodatno, ovaj lišaj je svrstan i u Homeopatsku farmakopeju SAD za primenu kod glavobolja i sunčanice (Madamombe i Afolyan, 2003).

Savremena istraživanja pokazala su da *U. barbata* ispoljava širok spektar bioloških svojstava (tabela 2). Među njima, najbolje je proučena antimikrobna aktivnost, koja je dokumentovana u nekoliko naučnih istraživanja. Tako je uporedno ispitivanje nekoliko ekstrakta talusa jevrejske brade protiv 10 bakterijskih i 5 sojeva gljivica ukazalo na najbolju antimikrobnu aktivnost protiv Gram pozitivnih (G+) bakterija (Madamombe i Afolyan, 2003). Slični rezultati dobijeni su i u studiji koja se bavila „*skringom*“ antimikrobne aktivnosti devet ekstrakata i izolovanih jedinjenja protiv 8 aerobnih i 9 anaerobnih bakterijskih, odnosno 3 vrste gljivica, koja je istakla upravo ekstrakt *U. barbata* kao najefikasniji, naročito protiv G+ bakterija i *Malassezia furfur* (Weckesser i sar., 2007). Ovo je potvrđeno i u novijem istraživanju Rankovica i saradnika (2012) koji su u uporednom istraživanju dva lišaja (*U. barbata* i *Toninia candida*) pokazali bolju antimikrobnu

aktivnost jevrejske brade protiv 5 bakterija i 5 gljivica. U istoj studiji, pored antimikrobne, poređena je i citotoksična (protiv FemX humanih ćelija melanoma i LS174 ćelija karcinoma debelog creva), odnosno antioksidativna aktivnost navedenih lišajeva. Dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti za obe ćelijske linije bile su niže za *U. barbata*, a dalja analiza mehanizma citotoksične aktivnosti ukazala je na njegovu naglašenu sposobnost da indukuje apoptozu u ispitivanim tumorskim ćelijama. Sa druge strane, pokazana je slabija antioksidativna aktivnost ovog lišaja, koja je bila u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola (Rankovic i sar., 2012). Dodatno, u studiji Engela i saradnika (2007), pokazana je antiinflamatorna aktivnost *U. barbata*, posredovana sposobnošću inhibicije proizvodnje prostaglandina i ciklooksigenaze-2 (COX-2).

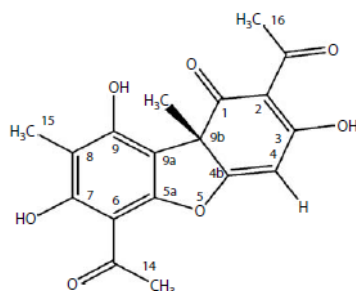
**Tabela 2.** Hemijski sastav i biološke aktivnosti lišaja *U. barbata*

Lišaj	Hemijski sastav	Reference	Biološka aktivnost	Reference
<i>U. barbata</i>	Usninska kiselina, norstiktinska kiselina, atranorin, hloroatranorin, barbatolinska kiselina, lobarna kiselina, salazinska kiselina	Hager, 1979; Rankovic i sar., 2012	Antimikrobna (antibakterijska)	Madamombe i Afolyan, 2003; Cansaran i sar., 2006; Weckesser i sar., 2007; Rankovic i sar., 2012
			Antimikrobna (antimikotička)	Madamombe i Afolyan, 2003; Rankovic i sar., 2012
			Antioksidativna	Rankovic i sar., 2012
			Citotoksična	Rankovic i sar., 2012
			Antiinflamatorna, protektivni efekti protiv UVB zračenja	Engel i sar., 2007

Iako u svom hemijskom sastavu sadrži različita jedinjenja (tabela 2), navedena biološka svojstva jevrejske brade pripisuju se usninskoj kiselini, kao njenom glavnom hemijskom konstituentu i, generalno, jednom od najbolje proučenih sekundarnih metabolita lišajeva.

### 1.2.2. Usninska kiselina

Usninska kiselina je, pored jevrejske brade, zastupljena i u drugim lišajeva koji imaju žuto-zeleni gornji korteks uključujući (izuzev ostalih vrsta roda *Usnea*) i pripadnike drugih rodova porodice Parmeliaceae, kao što su *Parmelia*, *Protousnea*, *Alectoria*, *Xantoparmelia*, *Lethariella*, *Evernia*, *Flavoparmelia*, *Parmotrema*, mada je rasprostranjena i u rodovima drugih porodica, kao što su *Cladonia*, *Lecanora* ili *Ramalina* (Ingolfstodt, 2002, Gomez-Serranillos i sar., 2014; White i sar., 2014).



**Slika 3.** Hemijska struktura usninske kiseline (preuzeto iz Santos-Magalhaes i sar., 2010)

#### 1.2.2.1. Fizičko-hemijske osobine

Usninska kiselina [(9bR)-2,6-diacetil-3,7,9-trihidroksi-8,9b-dimetil-dibenzofuran-1-on] nastaje u sekundarnom metabolizmu iz puta biosinteze acetil-polimalonila (slika 1). Hemijski pripada porodici dibenzofurana, a predstavlja fenolno jedinjenje koje se sastoji od dva šestočlana prstena, koja su spojena furanskim prstenom (slika 3), hemijske formule  $C_{18}H_{16}O_7$  (Ingolfstodt, 2002; Santos-Magalhaes i sar., 2010). Prisustvo različitih hidroksilnih grupa, karbonilne grupe i enolne funkcije u molekulu usninske kiseline vode pojavi keto-enolne tautomerije. Postoji u obliku dva enantiomera, kao (+) i (-) usninska kiselina, koje se razlikuju u orijentaciji metil grupe na hiralnem C atomu u položaju 9b (slika 3). Izolovana je iz lišajeva još davne 1844. godine, a tridesetih godina prošlog veka prvi put je hemijski sintetisana (Santos-Magalhaes i sar., 2010). Hemijska struktura usninske kiseline je okarakterisana i potvrđena spektroskopskim metodama, uključujući

infracrvenu (IR), Raman spektroskopiju, nuklearnu magnetnu rezonancu (NMR), masenu spektroskopiju i difrakciju X-zraka (Santos-Magalhaes i sar., 2010).

Kristali usninske kiseline su žućkaste iglice temperature topljenja od 203-204°C,  $[\alpha]_{20}^D + 495$  u hloroformu i molekulskom masom od 344,41. Teorijski particioni koeficijent (log P) usninske kiseline je  $2,679 \pm 0,631$  dok vrednost log P (-) usninske kiseline određena u sistemu oktanol-voda iznosi 2,88. Hidrofobni karakter usninske kiseline (i u neutralnom i u anjonskom obliku) može se pripisati prisustvu  $\beta$ -triketonske grupe i furanskom prstenu koji povezuje oba šestočlana prstena. Dodatno, hidrofobnosti usninske kiseline doprinose i unutarmolekulske vodonične veze. Ovo ne samo da doprinosi njenoj slaboj rastvorljivosti u hidrofilnim rastvaračima (voda <10 mg/100 ml, 25°C; etanol 20 mg/100 ml, 25°C), već i vrednosti log P koja je u lipofilnom opsegu (Santos-Magalhaes i sar., 2010).

Sa druge strane, smatra se da je kiselost usninske kiseline u vezi sa prisustvom nestabilnog enolnog prstena u njenom molekulu. Štaviše, spektar električne paramagnetne rezonance usninske kiseline potvrdio je da konstanta disocijacije ( $pK_a$ ) enolne hidroksilne grupe u položaju 3 iznosi 4,4, dok  $pK_a$  vrednosti fenolnih hidroksilnih grupa u položajima 9 i 7 iznose 8,8 i 10,7, redom. Utvrđeno je da je usninska kiselina kompletno neprotonovana pri pH vrednosti od 11,5 (Santos-Magalhaes i sar., 2010).

Kada je reč o metodama za identifikaciju i određivanje sadržaja usninske kiseline u lišajevima ili farmaceutskim preparatima, u literaturi se spominju konvencionalne tehnike kao što su spektroskopske i hromatografske metode (gasna hromatografija i tečna hromatografija visokih performansi (engl. *High performance liquid chromatography*, *HPLC*). Pri tome, HPLC je predložen kao metoda izbora za kvantifikaciju usninske kiseline u farmakokinetičkim ispitivanjima. Pored navedenih metoda, za analizu usninske kiseline korišćene su i neke nekonvencionalne tehnike, kao što su kapilarna elektroforeza i micelarna elektrokinetička hromatografija (Santos-Magalhaes i sar., 2010).

#### **1.2.2.2. Biološka svojstva/farmakološke aktivnosti**

Obnovljeno interesovanje za usninskom kiselinom poslednjih godina razlog je velikog broja radova u kojima su opisana njena brojna biološka svojstva i farmakološke aktivnosti, kao što je nekoliko preglednih studija objavljenih na ovu temu početkom prethodne

decenije (Muller, 2001; Cocchietto i sar., 2002; Ingolfsdottir, 2002). Već je pomenuto da se usninska kiselina smatra glavnim hemijskim konstituentom *U. barbata*, odgovornim za pokazane aktivnosti ovog lišaja (antibakterijska i antimikotička, citotoksična, antioksidativna i antiinflamatorna). S tim u vezi, brojna istraživanja same usninske kiseline (kao čiste supstance) potvrdila su navedene aktivnosti ovog derivata dibenzofurana, i dodatno njena antiprotozalna, antivirusna, neuroprotektivna, gastroprotektivna, kardioprotektivna, citoprotektivna i imunostimulatorna svojstva, kao i analgetičku/antipiretičku aktivnost i efekat zarastanja rana (White i sar., 2014). Detaljan pregled bioloških aktivnosti usninske kiseline dat je u narednim odeljcima.

Antimikrobna aktivnost usninske kiseline ispitivana je u velikom broju radova, od kojih se većina bavila „*skrining*“-om ovog derivata dibenzofurana protiv različitih bakterija, gljivica, parazita i virusa. Antibakterijska aktivnost usninske kiseline pokazana je za mnoge G+ bakterije (Gollapudi i sar., 1994; Weckesser i sar., 2007; Rankovic i sar., 2008; Schmeda-Hirschmann i sar., 2008; Ivanova i sar., 2010; Sultana i Afolayan, 2011; Manojlovic i sar., 2012; Rankovic i sar., 2012). Štaviše, usninska kiselina je predložena kao dobar kandidat za klinička ispitivanja pacijenata sa infekcijama izazvanim vankomicin-resistentnim enterokokom i MRSA-om (Elo i sar., 2007). Mehanizam dejstva usninske kiseline protiv G+ bakterija pripisan je njenim protonofornim osobinama, odnosno inhibiciji oksidativne fosforilacije (Santos-Magalhaes i sar., 2010), mada je u nedavno objavljenoj studiji koja se bavila procenom antibakterijske aktivnosti usninske kiseline protiv MRSA utvrđeno da je antistafilokokna aktivnost izazvana razaranjem ćelijske membrane (Gupta i sar., 2012). Kada je reč o Gram negativnim (G-) bakterijama i gljivicama, podaci su kontroverzni. Naime, neka istraživanja ukazala su na izostanak antibakterijske aktivnosti usninske kiseline protiv G- baterija (Gollapudi i sar., 1994; Weckesser i sar., 2007) i gljivica (Weckesser i sar., 2007; Schmeda-Hirschmann i sar., 2008; Ivanova i sar., 2010). Sa druge strane, u nekoliko radova jedne istraživačke grupe pokazana su veoma jaka antimikrobna svojstva usninske kiseline protiv svih ispitivanih bakterija (uključujući G+ i G-) i gljivica, pri čemu je antibakterijska aktivnost bila jača od antimikotičke (Rankovic i sar., 2008,2012; Manojlovic i sar., 2012). Takođe, utvrđena je i antiprotozalna aktivnost usninske kiseline protiv tri *Leishmania* vrste *in vitro*, kao i *in vivo*

u eksperimentalno izazvanoj kožnoj lajšmaniozi (Fournet i sar., 1997; Schmeda-Hirschmann i sar., 2008). Kada je reč o antivirusnoj aktivnosti usninske kiseline, u ispitivanju uticaja na proliferaciju mišjeg polioma virusa u 3T6 ćelijama, pokazano je da je replikacija dezoksiribonukleinske kiseline jako inhibirana, odnosno da je usninska kiselina generički represor transkripcije ribonukleinske kiseline (Campanella i sar., 2002).

Među svim metabolitima lišajeva, najbolje proučena supstanca kada je reč o antikancerogenim efektima je svakako usninska kiselina. Opisana je antitumorska aktivnost usninske kiseline protiv tumora izazvanog Epstein Barr virusom (Yamamoto i sar., 1995), kao i citotoksična aktivnost u ispitivanjima na humanim keratinocitima (Kumar i Muller, 1999; Burlando i sar., 2009), ćelijama malignog mezotelioma (MM98), vulvarnog karcinoma (A431) (Burlando i sar., 2009), ćelijama mišjeg fibroblasta (L-929), humane leukemije (K-562, U937, HL-60, Jurkat) (Kristmundsdottir i sar., 2002; Toledo Marante i sar., 2003; Ivanova i sar., 2010; Backorova i sar., 2011) humanog kancera ovarijuma (A2780) (Backorova i sar., 2012), humanog karcinoma cerviksa (HeLa) (Ivanova i sar., 2010; Brisdelli i sar., 2013), humanog karcinoma dojke (MCF-7, SK-BR-3, T47D) (Backorova i sar., 2011; Bessadottir i sar., 2012; Brisdelli i sar., 2013), humanog adenokarcinoma alveola (A549) (Koparal i sar., 2006), humanog melanoma (FemX i UACC-62) (Manojlovic i sar., 2012; Rankovic i sar., 2012; Brandao i sar., 2013), humanog kancera pankreasa (Capan-2) (Bessadottir i sar., 2012) i humanog karcinoma debelog creva (LS174, HCT-116, HT-29) (Backorova i sar., 2011; Backorova i sar., 2012; Manojlovic i sar., 2012; Rankovic i sar., 2012; Brisdelli i sar., 2013). Neki od predloženih mehanizma citotoksičnosti usninske kiseline na osnovu dosadašnjih istraživanja obuhvataju: antimitotičku aktivnost (Cardarelli i sar., 1997), narušavanje potencijala unutrašnje membrane mitohondrija (Han i sar., 2004; Einarsdottir i sar., 2010), indukciju apoptoze (Bezivin i sar. 2004; Backorova i sar., 2011; Rankovic i sar., 2012) i autofagiju (Bessadottir i sar., 2012).

Heterociklična struktura usninske kiseline sastavljene od konjugovanih diena i polarnih hidroksilnih grupa ukazuje na mogući redoks potencijal ovog molekula, odnosno sposobnost njegove interakcije sa reaktivnim vrstama koje učestvuju u oksidativnom stresu (White i sar., 2014). U tom smislu, antioksidativna aktivnost usninske kiseline detektovana



je u brojnim *in vitro* testovima (De Paz i sar., 2010; Behera i sar., 2012; Rankovic i sar., 2012; Singh i sar., 2013). Ipak, rezultati različitih bioloških testova nagovestili su da usninska kiselina može da se ponaša kao prooksidans ili antioksidans u različitim tipovima ćelija i tkiva, ukazujući na činjenicu da su dalja istraživanja drugih mehanizama, kao što su modulacija aktivnosti antioksidativnih enzima i ćelijskih sistema za detoksifikaciju neophodna da bi se u potpunosti razumeo njen redoks potencijal (Kohlhardt-Floehr i sar., 2010; Polat i sar., 2013). Nasuprot ovome, u nekim radovima opisan je izostanak antioksidativne aktivnosti usninske kiseline u smislu sposobnosti „hvatanja“ slobodnih radikala utvrđenu DPPH testom (sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala) (Lohezic-Le Devehat i sar., 2007; Thadhani i sar., 2011), što je objašnjeno nedostatkom labilnog vodonikovog atoma u strukturi ovog jedinjenja.

Prema rezultatima Odabasoglua i saradnika (2006), usninska kiselina ispoljila je gastroprotektivne efekte protiv gastričnih ulcera izazvanih indometacinom kod pacova, putem redukcije oksidativnog oštećenja. Takođe, protektivni efekti usninske kiseline su pokazani protiv oštećenja ćelija humanog glioblastoma astrocitoma (U373 MG) izazvanih vodonik peroksidom (De Paz i sar., 2010). Na osnovu rezultata ove studije autori su zaključili da bi usninska kiselina mogla da deluje kao antioksidativno sredstvo protiv neurodegenerativnih bolesti koje su u vezi sa oksidativnim stresom, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest. Takođe, u istraživanju Santosa i saradnika (2004) usninska kiselina je indukovala jako oslobađanje NO iz peritonealnih makrofaga, čime se pojačava ubijanje bakterija i tumora, proizvodeći tako njen imunostimulacioni efekat. Antiinflamatorna aktivnost usninske kiseline pokazana je na pacovima kod kojih je edem šape izazvan karageninom (Vijayakumar i sar., 2000). Dodatno, u novijoj studiji koja se bavila istraživanjem molekularnih mehanizama odgovornih za ovu aktivnost utvrđeno je da usninska kiselina ispoljava dozno zavisani inhibicioni efekat na proizvodnju faktora nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , *TNF- $\alpha$* ) (Jin i sar., 2008). S tim u vezi, antiinflamatorna aktivnost usninske kiseline u kombinaciji sa cink-sulfatom potvrđena je i u *in vivo* studiji kod pacijenata sa genitalnom infekcijom izazvanom humanim papiloma virusom (HPV) (Scirpa i sar., 1999). Takođe, u ispitivanjima na miševima utvrđeno je i analgetičko/antipiretičko delovanje usninske kiseline (Okuyama i sar., 1995), dok su

Behera i saradnici (2012) pokazali njenu kardioprotektivnu aktivnost. Dodatno, utvrđeno je i da ovaj derivat dibenzofurana ispoljava efekat zarastanja rana u dozi koja je netoksična za HaCaT humane keratinocite (Burlando i sar., 2009).

### **1.2.3. *U. barbata* kao izvor usninske kiseline: ekstrakcija primenom natkritičnih fluida vs. klasične metode ekstrakcije**

U savremeno doba razvoja farmaceutske i kozmetičke industrije, ekstrakti *U. barbata* se shodno visokom sadržaju usninske kiseline sa jedne, i njenim brojnim biološkim/farmakološkim aktivnostima sa druge strane, koriste prvenstveno kao izvor ovog derivata dibenzofurana (Ingolfstodt, 2002). U tom smislu, poznato je da je izbor metode ekstrakcije, koja se koristi za izolovanje sastojaka iz sirovina prirodnog porekla, važan u smislu čistoće ekstrakta, ali i prinosa ciljnih jedinjenja, što je dalje u vezi sa aktivnošću dobijenog izolata (Spigno i De Faveri, 2007).

Klasični postupci izolacije bioaktivnih jedinjenja iz biljnih droga<sup>2</sup> obuhvataju ekstrakcije rastvaračima (ekstrakcija čvrsto-tečno), u čijoj se osnovi nalazi difuzija u toku koje jedna ili više komponenata, na osnovu razlike u rastvorljivosti, prelaze iz čvrstog materijala u tečni rastvarač. Pri tome, ekstrakcije rastvaračima mogu biti diskontinuirane (kao što su maceracija, bimaceracija-dvostepena maceracija, digestija-maceracija na temperaturama od 50°C) i kontinuirane (kao što su perkolacija, ekstrakcija po Soxhlet-u i dr.). Od polarnih rastvarača, za ekstrakciju se najčešće koriste voda, etanol, metanol i glicerol, a od nepolarnih n-heksan, aceton, petroletar, dietil-etar, benzen i dr. Klasični postupci ekstrakcije rastvaračima mogu se poboljšati primenom mehaničkog mešanja čime se povećava brzina difuzije i kontaktna površina rastvarač-čvrsti materijal. Za tu svrhu se, u novije vreme, sve više primenjuju ultrazvučni talasi (ultrazvučne ekstrakcije) i mikrotalasi (mikrotalase ekstrakcije) (Ivanović, 2011; Savić, 2014).

Glavni nedostatak ekstrakcija rastvaračima jeste njihovo zaostajanje u dobijenim izolatima (tzv. ekstrakti sa rezidualnim rastvaračima), što ograničava primenu ovih proizvoda (prvenstveno) u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Drugi nedostatak ovih

---

<sup>2</sup> cele ili sečene, suve, ređe sveže biljke ili delovi biljaka, algi, gljiva, lišajeva, kao i neki eksudati koji nisu podvrgnuti specifičnom postupku prerade (Ph. Eur.).

konvencionalno korišćenih postupaka je česta potreba za višestepenom ekstrakcijom, upotrebom dva ili više rastvarača, usled njihove nedovoljne selektivnosti u odnosu na željenu grupu jedinjenja. S tim u vezi, masovna upotreba organskih rastvarača u raznim oblastima industrije predstavlja ozbiljnu pretnju za životnu sredinu. Usled toga, sve više pažnje se poklanja uvođenju novih održivih postupaka koji bi omogućili izolaciju bioaktivnih jedinjenja u što čistijem stanju, odnosno primenu ekstrakcionih tehnika koje ne uključuju upotrebu rastvarača opasnih po životnu sredinu i čovekovo zdravlje (Ivanović, 2011).

Stoga, poslednjih godina sve više pažnje privlači ekstrakcija fluidima u natkritičnom stanju. Ova vrsta ekstrakcije podrazumeva postupak u kojem se kao rastvarač za ekstrakciju koristi fluid u svom natkritičnom stanju (na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti pritiska i temperature za dati fluid, odnosno iznad tzv. kritične tačke). Iznad kritične tačke, fluid se nalazi u stanju ugušćenog gasa, a daljim povećanjem temperature dato jedinjenje se ne može prevesti u gas, niti se daljim povećanjem pritiska može prevesti u tečnost. U tom smislu, fluid u svom natkritičnom stanju integriše dobre osobine gasova i tečnosti, koje omogućavaju veću efikasnost ekstrakcije. Naime, sa jedne strane, gustina natkritičnih fluida bliska je tečnostima, što pogoduje njihovoj moći rastvaranja, dok su, sa druge strane, njihova velika difuzivnost i nizak viskozitet slični kao kod gasova, što im omogućava lako prodiranje u čvrsti materijal dovodeći do povećane brzine ekstrakcije i lakog razdvajanja faza u poređenju sa ekstrakcijom organskim rastvaračima. Pored toga, uslovi pri kojima se odvija ekstrakcija natkritičnim fluidima mogu se kontrolisati, što znači da se izborom pogodne kombinacije procesnih parametara (temperature i pritiska) može uticati na rastvorljivost željenih komponenata u ekstraktu, odnosno povećati selektivnost samog postupka (Ivanović, 2011; Savić, 2014).

Kao natkritični fluid, naročito za ekstrakcije supstanci iz prirodnih izvora, najveću primenu nalazi ugljen-dioksid ( $\text{CO}_2$ ), zato što nije reaktivan i toksičan, a i stabilan je rastvarač, bez boje, ukusa i mirisa, lako dostupan i jeftin, potpuno neškodljiv po čovekovo zdravlje i životnu sredinu. Stoga, glavna prednost ekstrakcije natkritičnim  $\text{CO}_2$  predstavlja mogućnost dobijanja ekstrakata veće čistoće (bez toksičnih rezidua organskih rastvarača). Pored toga, relativno niske vrednosti kritičnog pritiska i temperature ovog gasa ( $p_k=73,8$

bar i  $T_k=31,1^{\circ}\text{C}$ ) omogućavaju ekstrakcije na niskim temperaturama, čime se sprečava degradacija termolabilnih jedinjenja u dobijenom ekstraktu. Dodatno, ekstrakcija natkritičnim  $\text{CO}_2$  smatra se pogodnom metodom za izolovanje veoma nepolarnih pojedinačnih komponenti (ili biološki aktivnih ekstrakata sa visokim prinosom nepolarnih jedinjenja) iz biljnih droga, s obzirom da je ovaj fluid u natkritičnom stanju odličan rastvarač za nepolarne supstance (Palma i Taylor, 1999; Pereira i Meireles, 2010; Ivanović, 2011; Savić, 2014).

S tim u vezi, novija istraživanja pokazala su značajno viši sadržaj usninske kiseline u ekstraktu talusa *U. barbata* dobijenom pomoću natkritičnog  $\text{CO}_2$  u poređenju sa ekstraktima dobijenim upotrebom konvencionalnih rastvarača za ekstrakciju, ali i ukazala na nekoliko prednosti ovako dobijenog ekstrakta sa kvantifikovanom usninskom kiselinom u odnosu na usninsku kiselinu *per se*, kao što su:

- ✓ Veća rastvorljivost
- ✓ Niža cena proizvodnje
- ✓ Ekvivalentna biološka aktivnost (Engel i sar., 2007; Zizovic i sar., 2012).

#### **1.2.4. Savremena upotreba lišaja *U. barbata* i usninske kiseline**

Već je rečeno da *U. barbata* ima dugogodišnju tradiciju primene u narodnoj medicini, kao i da su savremena istraživanja pružila dokaze o opravdanosti navedene tradicije, potvrdivši brojna biološka svojstva ovog lišaja, koja su pripisana prisustvu usninske kiseline, kao njegovog glavnog hemijskog konstituenta. S tim u vezi, poslednjih godina na svetskom tržištu raste zastupljenost različitih proizvoda koji sadrže ekstrakt talusa *U. barbata* ili čistu usninsku kiselinu, odnosno neki od njenih sintetskih derivata kao aktivne sastojke (tabela 3). Pored toga, ekstrakt talusa *U. barbata* deo je kozmetičkog aditiva „*usnic acid multisolubilis*“, koji se može koristiti kao konzervans u u/v kremovima (Varvaressou i sar., 2009; Marindale 36, 2009; Drugs, 2015).

Kao što se može videti u tabeli 3, proizvodi koji kao aktivan sastojak sadrže ekstrakt lišaja *U. barbata*, odnosno usninsku kiselinu ili njene sintetske derivate, koriste se topikalno (lokalna primena na koži i sluzokoži). Pri tome, proizvodi na bazi samog lišaja

namenjani su terapiji oboljenja usta/grla (tabela 3), što je u skladu sa njegovom preporučenom upotrebom prema monogarfiji Komisije E. Sa druge strane, čista usninska kiselina/njeni sintetski derivati su aktivni sastojci preparata koji se, osim za navedenu namenu, primenjuju i kod vaginalnih infekcija, a u kombinaciji sa drugim aktivnim supstancama i kod infekcija kože, uključujući i infekcije opekotina i rana (tabela 3). Topikalna primena proizvoda na bazi *U. barbata*/usninske kiseline u vezi su sa njihovom izraženom hepatotoksičnošću, dokumentovanom kako u različitim *in vitro/in vivo* naučnim studijama (Abo-Khatwa i sar., 1996; Han i sar., 2004; Pramyothin i sar., 2004), tako i u brojnim prikazima slučajeva iz kliničke prakse.

Naime, *U. barbata*/usninska kiselina nekada su bili registrovani kao sastojci dijetetskih suplemenata namenjenih redukciji telesne mase. Jedan od primera ovakvog proizvoda su *LipoKinetix* kapsule (Syntrax, Cape Girardeau, Misuri, SAD), koje su sadržale norefedrin-hidrochlorid, usninsku kiselinu, 3,5-dijodotironin, johimbin-hidrochlorid i kofein. Godine 2000. opisani su slučajevi razvoja akutnog hepatitisa kod zdravih dobrovoljaca nakon korišćenja ovog preparata. Na osnovu preporuke Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and drug administration, FDA*) *LipoKinetix* je povučen sa tržišta i njegova proizvodnja je prekinuta 2002. godine, ali je ista firma nastavila sa proizvodnjom proizvoda sa sličnim sastojcima, bez usninske kiseline (*AdipoKinetix*). Još jedan dijetetski suplement namenjen gubitku telesne mase, koji je pored usninske kiseline sadržao i L-karnitin i kalcijum-piruvat (*UCP-1* kapsule, BDC Nutrition, Richmond, Kentaki, SAD) izazvao je insuficijenciju jetre kod dva pacijenta koji su koristili ovaj proizvod u preporučenoj dozi. Takođe, u literaturi je naveden i slučaj insuficijencije jetre kod zdrave žene nakon konzumiranja dijetetskog suplementa sa čistom usninskom kiselinom. Mnogi autori pripisivali su hepatotoksičnost dijetetskih suplemenata koji sadrže usninsku kiselinu drugim komponentama ovih proizvoda. Međutim, u ovom slučaju, pacijent je konzimirao samo usninsku kiselinu, što je dovelo do insuficijencije jetre koja je zahtevala njenu transplantaciju, predstavljajući istovremeno prvi ovakav slučaj izazvan samom usninskom kiselinom. Do 2011. godine, FDA je primio najmanje 22 izveštaja neželjenih dejstava, uključujući i jedan smrtni slučaj, nakon korišćenja dijetetskih suplemenata namenjenih

gubitku telesne mase koji su sadržali usninsku kiselinu (Guo i sar., 2008; Bagchi i Preuss, 2013).

**Tabela 3.** Spisak proizvoda koji u sebi sadrže ekstrakt lišaja *U. barbata*/ usninsku kiselinu ili njen sintetski derivat (Marindale 36, 2009; Drugs, 2015)

Naziv proizvoda	Proizvođač	Aktivni sastojak	Namena
Dr Grandel Granobil*	Grandel, Nemačka	<i>Usnea barbata</i>	Bakterijske infekcije usta i grla
Tetesept Hals-activ*	Tetesept, Nemačka	<i>Usnea barbata</i>	Oboljenja usta i grla
Fitosept	Actavis, Srbija	Natrijum-usninat	Oboljenja usta i grla
Vidermina*	Ganassini, Italija	Bakar-usninat	Vaginalna dezinfekcija
Zeta N*	Bergamon, Italija	Usninska kiselina	Vaginalna dezinfekcija
Micofoot*	Zeta, Italija	Undecilenska kiselina, usninska kiselina, salicilna kiselina, aluminijum acetat	Dezinfekcija kože, opekotina i rana; bakterijske infekcije kože
Foot Zeta	Zeta, Italija	Undecilenska kiselina, usninska kiselina	Opekotine, gljivične infekcije kože, rane
Steril Zeta	Zeta, Italija	Krem: triklozan, usninska kiselina, hamamelis, ulje jetre bakalara  Prašak za primenu na koži: triklozan, usninska kiselina, cink oksid, cink stearat	Dezinfekcija opekotina i rana
Scabucid	Kimia, Indonezija	Lindan, usninska kiselina	Bakterijske infekcije kože izazvane G+ bakterijama; šuga

\*Ovaj proizvod više nije registrovan na tržištu

#### **1.2.4.1. Razvoj novih proizvoda sa usninskom kiselinom/lišajem *U. barbata* kao aktivnom supstancom: pregled novijih istraživanja**

Uzimajući u obzir prethodno diskutovanu hepatotoksičnost usninske kiseline kao i njenu veoma slabu rastvorljivost u vodi, a u skladu sa opštim trendom intenzivnih istraživanja u domenu vezikularnih nosača i nanotehnologija (Neubert, 2011), sve veći broj radova bavi se inkapsulacijom usninske kiseline u koloidne nosače nano- i mikro-dimenzija (veličine 10-1000 nm, tzv. koloidni nanovektori), sa ciljem povećanja terapijskog indeksa ovog derivata dibenzofurana, kroz porast efikasnosti i/ili smanjenje toksičnosti. Većina pomenutih radova fokusirana je na inkapsulaciju usninske kiseline u navedene koloidne nosače sa idejom njegove potencijalne systemske primene u kliničkoj praksi; npr. inkapsulacija u liposome sa ciljem potencijalnog uvođenja usninske kiseline u terapiju tuberkuloze (Lira i sar., 2009) ili u polimerne nanokapsule/mikrosfere sa ciljem poboljšanja rastvorljivosti, te ćelijskog preuzimanja i antitumorske aktivnosti uz istovremeno smanjenje hepatotoksičnosti (Ribeiro-Costa i sar. 2004; Santos i sar., 2005; Santos i sar., 2006). Pored toga, novije studije ukazale su na mogućnost potencijalne primene polimernih mikročestica (Martinelli i sar., 2014), odnosno magnetnih nanočestica (Grumezescu i sar. 2011, 2013, 2014a,b; Taresco i sar., 2015) sa usninskom kiselinom u lokalnoj eradikaciji biofilmova i/ili planktonskih ćelija mikroba.

Kada je reč o razvoju preparata sa lišajem *U. barbata* kao aktivnom komponentom, noviji radovi uglavnom se odnose na istraživanja vezana za dermatološku primenu izolata ovog lišaja sa kvantifikovanom usninskom kiselinom, dobijenih savremenim metodama ekstrakcije poput ekstrakcije fluidima u natkritičnom stanju, što je u skladu sa prethodno pomenutim prednostima primene ovako dobijenih ekstrakata u odnosu na usninsku kiselinu kao čistu supstancu. Grupa istraživača iz Nemačke dokazala je jaku antimikrobnu aktivnost ekstrakta jevrejske brade dobijenog primenom natkritičnog CO<sub>2</sub> protiv bakterija i gljivica sa dermatološkim značajem (Weckesser i sar., 2007), kao i njegovu antiinflamatornu aktivnost u *in vitro* ispitivanju na HaCaT keratinocitima (Engel i sar., 2007). S tim u vezi, pretragom dostupne literature pronađen je jedan odobren patent iste grupe autora, koji je zasnovan na navedenim istraživanjima, a odnosi se na preparat koji sadrži ekstrakt ovog

lišaja dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> i ekstrakt kantariona (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae) dobijen istim postupkom; preparat je namenjen spoljašnjoj ili unutrašnjoj upotrebi kod različitih kožnih oboljenja, naročito kod starenja i inflamatornih stanja kože, ili kod onih bolesti kože čijoj patogenezi doprinose bakterije i gljivice, poput seboroičnih oboljenja kao što su akne, rozacea ili seboroični dermatitis. Pri tome, autori kao naročito pogodan predlažu preparat namenjen lokalnoj primeni kod navedenih bolesti, i to poželjno hidrofilni gel ili rastvor za primenu na koži (čije su formulacije navedene kao primer detaljnog objašnjenja pronalaska) ili, alternativno, mast, emulziju (krem ili losion), oleogel ili prašak za primenu na koži, ne navodeći pritom detalje vezane za njihov sastav ili način izrade (Schempp i sar., 2010).



### **1.3. Nosači/podloge u dermofarmaceutskim preparatima**

Prilikom formulacije preparata za primenu na koži, posebno polučvrstih preparata, pažnju treba posvetiti odabiru nosača/podloge, prilikom čega se u razmatranje moraju uzeti brojni kriterijumi, koji se uobičajeno dele na 1) farmaceutsko-tehnološke, 2) biofarmaceutske i 3) kozmetološke (Surber i sar., 2001). Pored toga što imaju značajan uticaj na efikasnost, podnošljivost i aplikativnost lekovite supstance koja je u njih inkorporirana (Daniels i Knie, 2007), podloge dermatoloških lekova (odnosno sve supstance koje ulaze u njihov sastav) nakon aplikacije mogu uticati na strukturu/funkciju kože (Kligman, 2005). S tim u vezi, pri razmatranju nosača za lokalna antimikrobna sredstva treba uzeti u obzir odabir podloge koja ima potencijal da reparira barijernu funkciju kože narušenu infekcijom (Hornef i sar., 2002; Ohnemus i sar., 2008; Roy i sar., 2014) istovremeno ublažavajući njene nespecifične simptome, kao što su eritem, edem, bol, osetljivost i toplota (Ki i Rostein, 2008; Kish i sar., 2010).

Među velikim brojem različitih vrsta nosača, emulzije ostaju daleko najpopularnije i najviše korišćene u svim preparatima za lokalnu terapiju kožnih bolesti, što je u vezi sa mnogim faktorima, kao što su, između ostalih, lakoća primene, elegantnost proizvoda, prijatan osećaj na koži nakon nanošenja i dobra komplijansa pacijenata (Al-Bawab i Friberg, 2006; Otto i sar., 2009). Sa druge strane, s obzirom da se emulzije generalno smatraju termodinamički nestabilnim sistemima, formulisanje nosača emulzionog tipa koji poseduje zadovoljavajuću fizičku stabilnost predstavlja veliki izazov, u kojem je odabir odgovarajućeg stabilizatora i njegova primena u optimalnoj koncentraciji od ključne važnosti (Pantelić, 2013; Tasić-Kostov, 2013).

Emulzione podloge koje se uobičajeno koriste za dermatološke preparate najčešće su stabilizovane tradicionalnim jonskim (obično anjonskim) i nejonskim emulgatorima, odnosno njihovim mešavinama sa masnim amfifilima (anjonski i nejonski mešani emulgatori ili emulgujući voskovi). Iako obezbeđuju zadovoljavajuću fizičku stabilnost emulzionih sistema koje stabilizuju, navedeni emulgatori imaju i niz ograničenja primene. Primera radi, anjonski emulgatori poznati su po svom snažnom efektu na ljudsku kožu, tačnije izraženoj sposobnosti vezivanja za njene proteine, što može dovesti do narušavanja

integriteta kožne barijere i/ili njene iritacije (Savić, 2004; Pantelic i Cuckovic, 2014). U poređenju sa njima, nejonski emulgatori se generalno smatraju bezbednijim, te su mešani emulgatori/emulgujući voskovi koji se sastoje od masnih alkohola i nejonskih površinski aktivnih materija (PAM) dugo bili prvi izbor u formulisanju dermatoloških i kozmetičkih emulzija. Ipak, i emulzije podloge stabilizovane nejonskim PAM (polisorbati, estri sorbitana, makrogolni etri ili estri i dr.) mogu dovesti do neželjenih reakcija na koži posle duže primene. Osim toga, kod emulzija koje sadrže nejonske emulgujuće voskove (sastavljene iz etoksilovanih PAM i masnih amfilila) moguća je pojava odloženog/naknadnog strukturiranja, koja dovodi do promena u reološkom profilu ovih sistema, što se sa jedne strane odražava na njihove aplikativne i estetske osobine, a sa druge na dermalnu raspoloživost inkorporiranih lekovitih supstanci (Pantelic i sar., 2014a; Savić i sar., 2014).

Dodatno, poslednjih godina primetan je veliki uticaj kozmetičke industrije na farmaciju, koji je naročito izražen u oblasti preparata za primenu na koži. Usled toga, u novije vreme, pacijenti imaju sve strože zahteve kada je reč o senzornim osobinama dermofarmaceutskih proizvoda (Lukić i sar., 2014). S tim u vezi, uobičajeno korišćene emulzije podloge u ovim preparatima (naročito podloge tipa kremova) stabilizovane tradicionalnim jonskim i nejonskim emulgatorima, veoma često su estetski neprihvatljive nakon primene, što može dovesti do smanjene komplijanse pacijenata kod lokalne terapije bolesti kože. Pored toga, ne sme se zanemariti činjenica da su ovi emulgatori uglavnom sintetskog porekla i veoma slabe biorazgradivosti, što je, uz trend porasta zabrinutosti za zaštitu životne sredine i promovisanje upotrebe prirodnih proizvoda, stavilo u fokus tzv. „*zelene surfaktante*”, dobijene iz prirodnih izvora (Scott i Jones 2000; Lourith i Kanlayavattanukul, 2009). Pri tome, kod ove grupe surfaktanata prirodnog porekla može biti ceo molekul ili samo jedan njegov deo, hidrofilni ili hidrofobni, pa se u tom smislu može izvršiti njihova klasifikacija u tri kategorije: amfifili-proizvodi kvasnica i bakterija, amfifili koji sadrže prirodne polarne "glavene" grupe i amfifili koji sadrže prirodne hidrofobne "repove". Amfifili koji kao polarnu "glavenu" grupu sadrže šećernu komponentu, nazivaju se šećernim PAM i obuhvataju alkil poliglukozide, alkilglukamide i šećerne estre (Holmberg, 2001; Lukić i sar., 2016). Među njima, na polju stabilizacije

savremenih emulzionih podloga dermokozmetičkih/dermofarmaceutskih proizvoda poslednjih godina su se naročito istakli alkil poliglukozidi, uz svojevrsnu tendenciju da zamene potencijalno štetne tradicionalne nejonske emulgatore poreklom iz derivata petrohemijske industrije (Castro i sar., 2006; Jurado i sar., 2010; Keck i sar., 2014).

### **1.3.1. Alkil poliglukozidni emulgatori kao stabilizatori savremenih dermokozmetičkih ili dermofarmaceutskih emulzija i kremova**

Alkil poliglukozidi (APG) predstavljaju grupu nejonskih emulgatora koji se sastoje iz šećerne jedinice i masnih alkohola, pri čemu šećerna komponenta predstavlja hidrofilni deo molekula, dok je ugljovodonični "rep" (alkil lanac) manje rastvoran i predstavlja njegov hidrofobni deo (slika 4) (Holmberg, 2001; Kuhn i Neubert, 2004). Prvi put su sintetisani pre više od 100 godina, a u današnje vreme se pripremaju iz šećera (npr. glukoza ili maltoza) i masnih alkohola, pri čemu se u industrijskoj proizvodnji kao polazne sirovine najčešće koriste skrob i masne komponente prirodnog porekla (npr. biljna ulja). Pri tome, komercijalno dostupni APG emulgatori zapravo predstavljaju kompleksne smeše molekula, koje se sastoje od spektra različitih šećernih polarnih grupa i hidrofobnih alkil lanaca (Kuhn i Neubert, 2004; Iglauer i sar., 2010).

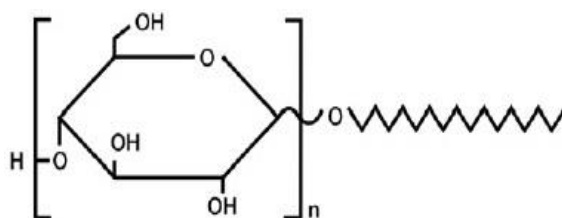
Posebna privlačnost ove grupe tzv. „prirodnih“ surfaktanata temelji se na činjenici da kombinuju svojstva klasičnih/konvencionalnih anjonskih i nejonskih emulgatora istovremeno ispoljavajući:

- ✓ veoma povoljan ekološki profil, odnosno veliku brzinu kompletne biorazgradivosti i proizvodnju iz obnovljivih sirovina,
- ✓ poželjne dermatološke karakteristike, koje se ogledaju u boljoj podnošljivosti na koži i smanjenom iritacionom potencijalu, što je u vezi sa zamenom etilen-oksidnih grupa u molekulu prirodnim holozidima tj. OH grupama šećera (tzv. *PEG-free* emulgatori) (Holmberg, 2001).

Dosadašnja istraživanja ove klase emulgatora pokazala su da APG stabilizuju emulzione sisteme građenjem kompleksnih struktura tipa lamelarnih tečnih kristala i/ili lamelarne gel faze. S tim u vezi, utvrđeno je da upravo sličnost koloidne stukture emulzija

(na bazi APG) stabilizovanih lamelarnim mazofazama i intercelularnih lipida membrana ćelija kože obezbeđuje specifične karakteristike ovih sistema, koje su važne za njihovu primenu u kozmetologiji, a potencijalno i u dermofarmaceutskim preparatima, kao što su:

- ✓ poboljšane aplikativne karakteristike,
- ✓ produženi vlažeći efekti na koži,
- ✓ povećan kapacitet za solubilizaciju lipofilnih aktivnih supstanci,
- ✓ modifikovano oslobađanje aktivnih supstanci,
- ✓ poboljšana isporuka aktivnih supstanci u kožu (Makai i sar., 2003; Savić i sar., 2010; Hosmer i sar., 2011, Pantelic i Cuckovic, 2014; Pantelic i sar., 2014a,b).



**Slika 4.** Opšta strukturna formula molekula alkil poliglukozi (Seppic, 2006a,b)

S tim u vezi, APG emulgatori različite dužine alkil lanca poslednjih godina su intenzivno istraživani u kontekstu stabilizatora konvencionalnih emulzionih sistema, kao potencijalnih nosača za dermalnu isporuku različitih lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci. Najznačajnija od navedena ispitivanja, o kojima će biti reči u narednim odeljcima, obuhvatila su procenu fizičko-hemijske stabilnosti uz kompletan uvid u koloidnu strukturu ovih sistema *per se* i nakon inkorporiranja odgovarajućih aktivnih supstanci, zatim procenu njihovih estetskih/aplikativnih osobina i biofarmaceutskih karakteristika, kao i *in vitro/in vivo* efekata na koži. Treba naglasiti da su pored konvencionalnih emulzionih sistema, ovi emulgatori ispitani i kao stabilizatori naprednih sistema za isporuku lekova mikro- i nano veličina, ali podaci navedenih istraživanja nisu prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji i mogu se naći u odgovarajućoj naučnoj literaturi (Keck i sar., 2014; Kovačević, 2014; Pantelic, 2014).

### 1.3.1.1. Cetearil glukozid i cetearil alkohol

Cetearil glukozid i cetearil alkohol jedan je od najbolje proučenih predstavnika APG mešanih nejonskih emulgatora, koji je 2010. godine od strane FDA sertifikovan kao farmaceutski ekscipijens pod nazivom *Alkyl Glucoside* (Savić i sar., 2010). Navedeni status farmaceutskog ekscipijensa nakon dugogodišnje primene u formulaciji kozmetičkih proizvoda, ovaj mešani APG emulgator dobio je na osnovu pozitivnih rezultata brojnih studija u kojima je ispitivan kao potencijalni stabilizator emulzionih nosača za različite model lekovite supstance (Baudonnet i sar., 2004; Savic 2008, 2009; Savić, 2006, 2007, 2009; Vucinic-Milankovic i sar., 2007; Jaksic i sar., 2012; Pantelic i sar., 2014c,d).

U jednom od najranijih istraživanja ovog emulgatora pokazana je njegova sposobnost da stupa u liotropne interakcije sa vodom (binarni sistemi), kao i sa vodom i uljima (ternarni sistemi), dajući stabilne multifazne u/v emulzije stabilizovane sinergističkim efektima viskoelastične hidrofilne gel faze lamelarnog tipa i lipofilne gel mreže, kao i lamelarnim tečnokristalnim dvoslojevima (Savic i sar., 2005, 2014). Pri tome, utvrđeno je da variranje udela i polarnosti uljane faze značajno utiče na koloidnu strukturu emulzionih podloga stabilizovanih ovim emulgatorom, naročito u kontekstu distribucije vode i/ili reoloških osobina, i sledstveno oslobađanja lekovitih supstanci iz korespodentnih sistema, što je pokazano na primeru nekoliko model lekovitih supstanci (diklofenak-natrijum, kofein, hidrokortizon). S tim u vezi, navedena istraživanja ukazala su na veću kompatibilnost polarnijih ulja sa cetearil glukozidom i cetearil alkoholom, usled čega su u većini studija koje su ispitivale emulzione sisteme stabilizovane ovim mešanim APG emulgatorom, kao masna faza korišćeni trigliceridi srednje dužine lanca (Savić i sar., 2007, 2009; Pantelic i sar., 2014a,b).

Kada je reč o interakciji cetearil glukozida i cetearil alkohola sa lipofilnim (glicerol monostearat i cetearil alkohol-1,5 % (m/m)) i hidrofilnim koemulgatorima (ksantan guma-0,5 % (m/m)), istraživanja su pokazala da se lipofilni koemulgatori mogu smatrati povoljnijim ekscipijensima za dodatnu stabilizaciju emulzionih podloga sa ovim emulgatorom, budući da je ksantan guma u upotrebljenoj koncentraciji izazivala pad viskoziteta/elastičnog i viskoznog modula (verovatno usled kompeticije sa emulgatorom za

vodu prisutnu u sistemu), kao i evaporaciju velikog dela vode pri niskim temperaturama u termogravimetrijskog analizi, koja se može dovesti u vezu sa narušavanjem lamelarne gel faze (Savic i sar., 2008; Pantelic i sar., 2014b). Suprotno, u ispitivanjima podloge stabilizovane ovim emulgatorom u istoj koncentraciji i sa istim udelom masne faze, ali različitog (kompleksnijeg) sastava, kao potencijalnog nosača za kiselu kozmetički aktivnu supstancu-laktobionsku kiselinu, dodatak ksantan gume (u istoj koncentraciji-0,5 % (m/m)) bio je neophodan za dodatnu stabilizaciju sistema ispitivanog krema (Tasic-Kostov i sar., 2011a; Pantelic i sar., 2014b).

Uticao dodatka korastvarača (koji istovremeno mogu imati i ulogu penetracionih inhensera) u emulzione podloge stabilizovane cetearil glukozidom i cetearil alkoholom na koloidnu strukturu ispitivanih sistema i *in vitro* i/ili *in vivo* oslobađanje/permeaciju lekovite supstance detaljno je ispitan u nekoliko studija. Tako je, u jednom istraživanju Savic i saradnika (2009) pokazano da dodatak 20 % (m/m) glicerola i propilenglikola ne utiče na reološko ponašanje bazične formulacije stabilizovane ovim emulgatorom, ali da propilenglikol povećava viskolelastičnost sistema usled povećanja udela vezane vode, vodeći značajno boljoj permeaciji *in vitro* (kroz veštačke konstrukte kože, upotrebom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije) diklofenak-natrijuma, dok je u slučaju kofeina, kao druge model lekovite supstance, oslobađanje bilo bolje iz uzorka bez dodatka poliola; štaviše, glicerol se u ovom istraživanju pokazao kao supstanca koja usporava permeaciju. Slično, u nekoliko studija ispitan je dodatak istih poliola u svojstvu penetracionih inhensera (u istoj koncentraciji) i dodatno izopropanola (u koncentraciji od 10 % (m/m)) na oslobađanje dva nesteroidna antiinflamatorna leka-ketoprofena i diklofenak-dietilamina iz emulzionog nosača stabilizovanog istim emulgatorom u fiksnoj koncentraciji od 8 % (m/m) (Jaksic i sar., 2012; Pantelic i sar., 2014c). Utvrđeno je da je uticaj propilenglikola na osnovnu koloidnu strukturu APG podloge (bez dodatka poliola) bio izraženiji u odnosu na dodatak glicerola u istoj koncentraciji. Ipak, dodatak izopropanola doveo je do najveće promene koloidne strukture osnovnog APG uzorka tj. promene oblika uljanih kapi, usled inkorporiranja alkohola u međusloju, ipak bez narušavanja stabilnosti sistema. *In vitro* ispitivanje oslobađanja navedenih model lekovitih supstanci primenom VanKel Enhancer® (VanKel Industries Inc., SAD) ćelija, kroz sintetske membrane od

celuloza-acetata ukazale su na trend poboljšanja oslobađanja ketoprofena iz uzorka sa izopropanolom, dok su ispitivanja sa diklofenak-dietilaminom pokazala da dodatak izopropanola i propilenglikola predstavlja uspešnu modifikaciju navedene APG podloge kao perspektivnog nosača za ovu lekovitu supstancu. *In vivo* ispitivanje dermalne raspoloživosti navedenih lekovitih supstanci iz istih uzoraka primenom *tape stripping* metode nije pokazalo značajno poboljšanje penetracionog profila ketoprofena usled dodatka navedenih poliola u odnosu na osnovnu APG formulaciju, dok je u slučaju diklofenak-dietilamina, dodatak izopropanola rezultovao povećanjem stepena isporuke ovog leka. Pored toga, ista grupa autora koristila je i hidrokortizon kao model supstancu u komparativnoj *in vivo* studiji dermalne raspoloživosti ovog leka primenom vazokonstriktornog testa i *tape stripping* metode. Nakon 6h vazokonstriktornog testa, uzorci sa dodatim izopropanolom i propilenglikolom bili su najefikasniji, ali je stepen permeacije bio statistički značajan samo u poređenju sa farmakodinamskim odgovorom koji potiče od uzorka sa glicerolom. Suprotno ovome, *tape stripping* metoda pokazala je zadovoljavajuću isporuku hidrokortizona iz uzorka sa glicerolom, i, štaviše, njegovu značajno dublju penetraciju u poređenju sa osnovnim APG uzorkom (bez dodatka poliola) i uzoraka sa dodatim izopropanolom, odnosno propilenglikolom (Pantelic i sar., 2014d).

Takođe, brojna ispitivanja bezbednosnog profila podloga stabilizovanih cetearil glukozid i cetearil alkoholom *per se* i nakon dodatka navedenih aktivnih supstanci, primenom odgovarajućih *in vitro* (upotrebom modela rekonstruisanog humanog epiderma) i *in vivo* metoda (merenjem odgovarajućih biofizičkih parametara kože) pokazala su zadovoljavajući iritacioni profil ispitivanih uzoraka; ista *in vivo* merenja su potvrdila i dobar vlažeći efekat emulzija na bazi ovog emulgatora. Pored toga, ispitivanje same podloge na bazi cetearil glukozida i cetearil alkohola u *in vivo* testu na veštački iritiranoj koži, ukazala su na njenu sposobnost da povećava integritet barijere oštećene kože (Tasic-Kostov i sar., 2014).

### **1.3.1.2. Koko glukozid i cetearil alkohol/Arahidil glukozid i arahidilbehenil alkohol**

Slični obrasci stabilizacije emulzionih sistema sinergističkim efektima lamelarne tečnokristalne i lamelarnih gel faza, koji su otkriveni u slučaju cetearil glukozida i cetearil

alkohola (C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> APG mešani emulgator), uočeni su i kod emulzionih nosača (ternarni sistemi i multikomponentne u/v emulzije) stabilizovanih mešanim APG emulgatorima kraćeg (C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> APG mešani emulgator/koko glukozid i cetearil alkohol) i dužeg alkil lanca (C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> APG mešani emulgator/arahidil glukozid i arahidilbehenil alkohol) (Savic i sar., 2014). Istraživanja navedenih emulgatora uglavnom su bila fokusirana na njegovu ulogu u stabilizaciji različitih emulzionih sistema *per se* i kao nosača nekih kozmetički aktivnih supstanci (Savic i sar., 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011a,b; Lukic i sar., 2013; Lukic i sar., 2014).

Tako je, u jednom istraživanju Savic i saradnika (2011), pokazana dozno zavisna liotropna interakcija koko glukozida i cetearil alkohola u seriji binarnih sistema, kao i u/v emulzijama sa fiksnom koncentracijom ovog emulgatora od 15 % (m/m), sa i bez dodatka glicerola (0-25 % (m/m)), okarakterisanih prisustvom anizotropnih struktura koje su uočene primenom polarizacione mikroskopije. Sa druge strane, u drugoj studiji, isti emulgator korišćen u koncentraciji od 7 % (m/m), omogućio je izradu fizički stabilne emulzije bez vidljivih anizotropnih struktura. Dodatak APG koemulgatora-miristol alkohola i miristol glukozida u ovu formulaciju u koncentraciji od 1,5 % (m/m) uslovio je pojavu pruga lamelarne mezofaze koje potiču verovatno od samog koemulgatora, dok je dodatak kisele kozmetički aktivne supstance-laktobionske kiseline doveo do promocije određenih lamelatnih tečnokristalnih faza; međutim, navedena interakcija laktobionske kiseline i koloidne strukture APG nosača nije dovela do sinergističkog efekta u vlaženju kože, što je objašnjeno veoma higroskopnom prirodom same aktivne supstance, te sledstvenog zadržavanja slobodne i vezane vodu u sistemu, čime je onemogućena njena isporuka u kožu (Tasic-Kostov i sar., 2011b). Za razliku od koko glukozida i cetearil alkohola, upotreba APG mešanog emulgatora dužeg alkil lanca, kakav je arahidil glukozid i arahidilbehenil alkohol, za stabilizaciju navedenih kozmetičkih emulzija dovela je do odloženog strukturiranja sistema (Tasic-Kostov i sar., 2011a). Isti emulgator u kombinaciji sa različitim uljanim fazama u koncentraciji od 20 % (m/m) (koncentracija određena na osnovu prethodnih eksperimenata u kojima je variran udeo masne faze) bio je predmet istraživanja Lukic i saradnika (2013) u kojem je utvrđen naglašen razvoj lamelarnih mezofaza u emulzionim sistema sa trigliceridima srednje dužine lanca i avokadovim uljem



(ulja slične polarnosti), dok je dodatak nepolarnog parafinskog ulja rezultovao narušavanjem lamelarnih struktura, što je objašnjeno verovatnim umetanjem dvostruko kraćih nepolarnih ugljovodoničnih lanaca ovog ulja između lipidnih dvoslojeva dugih lanaca masnog alkohola navedenog APG mešanog emulgatora. U daljem ispitivanju senzornih osobina navedenih uzoraka i dodatno, jos tri emulzije sa masnom fazom koja se sastojala od ulja nevena, izopropil miristata ili decil oleata u istoj koncentraciji (20 % (m/m)) uporednom primenom kontinualnih/oscilatornih reoloških merenja, teksturne analize i *in vivo* senzorne evaluacije zaključeno je da senzorne osobine emulzija najviše zavise od karakteristika upotrebljenog emolijensa (Lukic i sar., 2014). Primenom istih metoda ispitane su i senzorne osobine emulzija na bazi arahidil glukozida i arahidilbehenil alkohola (8 % (m/m)) u kombinaciji sa C<sub>14-22</sub> alkoholom i C<sub>12-20</sub> glukozidom (2 % (m/m)) u koje je, različitim postupcima, inkorporirano nekoliko vrsta/koncentracija kiselih aktivnih supstanci (glikolna kiselina u koncentraciji od 2 (m/m) % i 10 (m/m) % rastvaranjem u vodenoj fazi) i salicilna kiselina (u koncentraciji 2 % (m/m), suspendovanjem u gotovoj podlozi ili rastvaranjem u 10 % (m/m) izopropanolu, koji je dodat u vodenu fazu). Rezultati ove studije nagovestili su da ni vrsta ni koncentracija aktivne supstance nema značajan uticaj na senzorne karakteristike ispitivanih sistema, kao i da se navedena podloga može smatrati pogodnom za inkorporiranje kiselih aktivnih supstanci i alkohola (Lukic i sar., 2014). Sličan nalaz nađen je i u ispitivanjima Tasic-Kostov i saradnika (2011a,b) za laktobionsku kiselinu u emulzionim podlogama na bazi različitih APG mešanih emulgatora. Dodatno, treba naglasiti da su, kao i u slučaju cetearil glukozida i cetearil alkohola, odgovarajuća *in vitro/in vivo* ispitivanja ukazala na povoljan bezbednosni profil i visok potencijal za hidrataciju kože krem podloga na bazi odgovarajućih APG emulgatora kraćeg (koko glukozid i cetearil alkohol) i dužeg alkil lanca (arahidil glukozid i arahidilbehenil alkohol) *per se*, ali i nakon inkorporiranja navedenih kozmetički aktivnih supstanci (Tasic-Kostov i sar., 2014).

### **1.3.1.3. Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid**

Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid je noviji predstavnik grupe APG emulgatora, koji je prema tvrdnjama proizvođača apsolutno prirodnog porekla (hidrofilni

deo potiče od glukoze, a lipofilni iz semena biljke *Ricinus communis*, kao derivat ricinusovog ulja). Specifičnost ovog emulgatora leži u diolnoj strukturi lipofilnog dela molekula koja povećava njegov hidrofilni karakter i utiče na aplikativne osobine. Noviji literaturni podaci ukazuju na sposobnost ovog emulgatora da stabilizuje u/v emulzije (konzistencije losiona ili kremova) sa svim tipovima masnih faza (estri, silikoni, mineralna i biljna ulja) i to bez potrebe za dodatkom kostabilizatora, poput masnih alkohola. Takođe, u literaturi su opisane i unapređene senzorne karakteristike emulzija sa hidroksistearil alkoholom i hidroksistearil glukozidom u odnosu na konvencionalne APG emulgatore; nakon aplikacije na koži ove emulzije ne ostavljaju bele tragove, usled brzog upijanja u njene gornje slojeve. Dalje, kao prednost ovog emulgatora ističe se i niska koncentracija emulgatora koja je potrebna za stabilizaciju emulzija, koje su pogodne za inkorporiranje aktivnih sastojaka bogatih elektrolitima (koji uobičajeno narušavaju stabilnost emulzija), i potencijal za vlaženje *stratum corneum*. Proizvođač (Seppic, Francuska) preporučuje njegovu upotrebu u formulisanju pena, dezodoransa, proizvoda za uklanjanje šminke, kondicionera, proizvoda za zaštitu od sunca (Seppic, 2002; Savic i sar., 2014).

Na osnovu navednih tvrdnji, Bogdanovic Markovic i saradnici (2014) su razvili jednostavne emulzije konzistencije krema, sa ovim APG mešanim emulgatorom (3 % (m/m)) kao potencijalne kozmetičke ili farmaceutske emulzije podloge. U navedenim emulzijama variran je tip (poreklo) ulja (trigliceridi srednje dužine lanca, kao ulje sintetskog porekla; jojobino i ulje lešnika, kao biljna ulja), a upotrebom odgovarajućih tehnika hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid ispitan je kao mogući promotor produžene hidatacije kože, s obzirom na njegov potencijal da gradi lamelarne faze, opisan u literaturi. Polarizacione mikrofografije nisu otkrile prisustvo anizotropnih struktura, što je u skladu sa tvrdnjama proizvođača da vidljivost tečnih kristala oko uljanih kapi zavisi od prirode ulja, tj. da nije očekivana u emulzijama sa estrima i biljnim uljima. S tim u vezi, pokazano je da su navedene emulzije stabilizovane dominantno lamelarnom gel fazom, čija je elastična priroda potvrđena oscilatornim reološkim merenjima. Sa druge strane, kontinualna reološka merenja ukazala su na pseudoplastični tip tečenja ispitivanih emulzionih podloga, kao indikatora njihovih poželjnih aplikativnih karakteristika. Takođe, utvrđeno je da tip/poreklo ulja ne utiče na reološke karakteristike sistema. Dodatno,

rigorozni uslovi čuvanja uzoraka nisu doveli do promene reoloških parametara, ukazujući na dobru stabilnost ispitivanih kremova, ali je ipak zaključeno da je za njihovu dugoročnu stabilnost, kao i potencijalnu proizvodnju i primenu neophodno formulisati multikomponentnu uljanu fazu. *In vivo* ispitivanja pokazala su unapređen potencijal ispitivanih kremova sa hidroksistearil alkoholom i hidroksistearil glukozidom za vlaženje kože, kao i sposobnost povećavanja integriteta barijere oštećene kože u testu na veštački iritiranoj koži (Bogdanovic Markovic i sar., 2014; Savic i sar., 2014; Tasic-Kostov i sar., 2014).

Uzimajući u obzir napred navedeno, čini se opravdanim očekivati da će APG emulgatori omogućiti stabilizaciju sistema poboljšane/unapređene fizičke stabilnosti, biofarmaceutskih karakteristika, senzornih osobina, kao i povoljnih efekata na koži, koji bi zadovoljili kriterijume savremene formulacije emulzionog nosača za ekstrakt talusa *U. barbata* sa kvantifikovanom usninskom kiselinom; tako bi se mogao formulisati dermofarmaceutski preparat sa potencijalnim kliničkim značajem u lokalnoj terapiji infekcija kože, koji bi predstavljao adekvatnu zamenu dostupnim antibiotskim preparatima. Iz tih razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji, predmet istraživanja biće dva novija nejonska mešana emulgatora APG tipa i to: Montanov<sup>TM</sup>L (C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid) i Montanov<sup>TM</sup>S (koko glukozid i alkohol kokosovog oraha), proizvođača Seppic iz Francuske. Podaci vezani za performanse ovih emulgatora, u smislu stabilizacije emulzija-nosača dermokozmetičkih/dermofarmaceutskih preparata su oskudni, sa izuzetkom navoda samog proizvođača, o kojima će biti reči u narednim odeljcima.

#### **1.3.1.4. C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid/Koko glukozid i alkohol kokosovog oraha**

U kataloškom materijalu Montanov-a<sup>TM</sup>L (Seppic 2006a) i Montanov-a<sup>TM</sup>S (Seppic, 2006b) navodi se da su u pitanju glukolipidni emulgatori koji su u celini dobijeni iz sirovina biljnog porekla i to: glukoze, dobijene iz biljnih izvora koji nisu genetski modifikovani (engl. *GMO-free*), kao npr. manioka i masnih alkohola, ekstrahovanih iz biljnih ulja (npr. palmino ili kokosovo ulje). Takođe, naglašeno je da u njihovu sintezu nije uključen etilen-oksidi, ili organski rastvarači.

Dodatno, prema tvrdnjama proizvođača, navedeni APG emulgatori nemaju iritaciona svojstva i pokazuju dobru toleranciju u ispitivanjima podnošljivosti na koži. Takođe, u testovima koji su vršeni u cilju ispitivanja alteracije intracelularnih proteina, pokazano je da ne izazivaju hemolizu eritrocita i denaturaciju oksihemoglobina, dok ekotoksikološki podaci ukazuju na njihovu laku biorazgradivost (Seppic 2006a; Seppic 2006b).

Kako se dalje navodi u specifikaciji Montanov-a<sup>TM</sup>L (Seppic 2006a) i Montanov-a<sup>TM</sup>S (Seppic, 2006b), ovi APG emulgatori predstavljaju inovativnu kombinaciju masnog alkohola i alkil glukozida, što im daje veoma dobra emulgujuća svojstva. Proizvođač, međutim, ne daje informaciju o HLB vrednostima emulgatora, niti precizne podatke o sastavu, tj. tačnom odnosu alkil glukozida i smeše masnih alkohola. Oba APG nejonska mešana emulgatora su od strane proizvođača deklarirani kao samoemulgujuće baze (sposobne da formiraju emulzije i bez dodatka masne faze), što im omogućava prilagodljivost u industrijskom procesu izrade emulzija, u smislu da se mogu dodati ili u masnu ili u vodenu fazu. Takođe, naglašena je dobra stabilnost emulzionih sistema sa ovim mešanim emulgatorima, koja se pripisuje prisustvu jake glukozidne veze između hidrofilnog i lipofilnog dela molekula (Seppic 2006a; Seppic 2006b).

Što se tiče preporučene upotrebe navedenih APG emulgatora, proizvođač ističe mogućnost višestruke primene Montanov-a<sup>TM</sup>L za stabilizaciju tečnih emulzija-losiona ili emulzionih sistema polučvrste konzistencije-kremova. S tim u vezi, ovaj mešani emulgator prvenstveno je namenjen stabilizaciji tečnih emulzija, za koje je pokazan dobar profil tečenja (engl. *shear-thinning properties*) tj. veoma dobra razmazivost, uz izuzetnu stabilnost reoloških karakteristika tokom vremena. Takođe, prema preporuci proizvođača, Montanov<sup>TM</sup>L se može koristiti i za izradu mekih kremova sa veoma laganom teksturom, jednostavnim ugušćivanjem masne i /ili vodene faze tj. uključivanjem lipofilnih koemulgatora (poput masnih alkohola, npr. cetil alkohola) ili hidrokoloidnih kostabilizatora u osnovnu formulaciju emulzije. Kako se dalje navodi u specifikaciji Montanov-a<sup>TM</sup>L, izuzetna stabilnost emulzija sa ovim mešanim emulgatorom pripisuje se njegovom svojstvu da promoviše formiranje tečnih kristala (bez obzira na prirodu upotrebene masne faze), koja je u direktnoj vezi sa njegovim poboljšanim potencijalom za vlaženje kože, dokazanog u *in vitro* testovima sprovedenim od strane grupe istraživača iz Seppica (Seppic 2006a).

Kada je reč o Montanov-u<sup>TMS</sup>, proizvođač preporučuje njegovu upotrebu u stabilizaciji proizvoda za čišćenje kože tipa „2 u 1“, ističući ipak kao njegovu primarnu namenu ulogu koemulgatora (naročito preporučljiv u formulacijama proizvoda za zaštitu od sunca) i sredstva za poboljšanje teksture (engl. *texturizing agent*) ulje-u-vodi (u/v) emulzija tečne konzistencije-losiona ili emulzionih sistema polučvrste konzistencije-kremova (Seppic 2006b).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Lokalna terapija antibiotskim preparatima predstavlja pogodan način za prevenciju i/ili lečenje određenih bolesti kože, pre svega nekih nekomplikovanih/površinskih infekcija, ali ima i niz ograničenja, koja su sa jedne strane vezana za lekovite supstance sa antimikrobnim delovanjem, a sa druge za podloge koje se koriste kao njihovi nosači.

Pored zabrinjavajućeg porasta rezistencije bakterija, nedostatak lokalne terapije antibioticima je i njihova slaba penetracija u kožu, kao i dokumentovana toksičnost nekih od njih prema humanim ćelijama. Usled toga, nameće se potreba za pronalaženjem novih supstanci sa antimikrobnom aktivnošću, po mogućnosti širokog spektra dejstva i poboljšanom dermalnom raspoloživošću/bezbednosnim profilom. Kao potencijalni izvori ovakvih supstanci poslednjih godina sve više pažnje privlače lišajevi, među kojima se naročito istakla *U. barbata*, Parmeliaceae (jevrejska ili lišaj brada), čije se brojne biološke aktivnosti pripisuju njenom glavnom sekundarnom metabolitu-usninskoj kiselini. S tim u vezi, novija istraživanja ukazala su na nekoliko prednosti upotrebe ekstrakta talusa ovog lišaja dobijenog primenom natkritičnog CO<sub>2</sub> u odnosu na usninsku kiselinu, kao čistu supstancu.

Sa druge strane, poznato je da su emulzioni sistemi (naročito kremovi), kao najpogodniji nosači lekovitih supstanci u dermatološkim preparatima, uobičajeno stabilizovani tradicionalnim anjonskim i nejonskim mešanim emulgatorima, koji mogu dovesti do neželjenih reakcija na koži. Dodatno, značajan uticaj kozmetičke industrije na kremove, kao farmaceutske preparate u lokalnoj terapiji dermatoza, doveo je do zahteva pacijenata da njihove senzorne karakteristike budu zadovoljavajuće i na bolesnoj koži. Sve ovo je, uz porast zabrinutosti za zaštitu životne sredine, stavilo u fokus istraživanja savremenih emulgatora povoljnijeg ekološkog i dermatološkog profila, koji istovremeno mogu da obezbede poboljšane estetske/aplikativne osobine kremova za primenu na koži.

U skladu sa prethodnim navodima, ova doktorska disertacija imala je za cilj razvoj emulzionog sistema tipa hidrofilnog krema sa biorazgradivim APG emulgatorima prirodnog porekla, kao nosača za ekstrakt talusa *U. barbata*, sa kvantifikovanom usninskom kiselinom, kroz procenu koloidne strukture, fizičke stabilnosti i

biofarmaceutskih karakteristika, te ispitivanja efikasnosti i bezbednosti prototip formulacije finalnog proizvoda, koji bi našao potencijalnu primenu kao adekvatna zamena antibiotskim preparatima u lokalnom terapiji infekcija kože.

Eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije bio je podeljen u tri faze, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

### ***I faza eksperimentalnog rada***

- da se različiti ekstrakti talusa *U. barbata* izrade primenom konvencionalnih metoda ekstrakcije (ekstrakcija po Soxhlet-u etrom i etanolom i maceracija etanolom određene koncentracije), a zatim sprovede komparativni „*skrinig*“ njihovog hemijskog sastava i bioloških aktivnosti u odnosu na ekstrakt talusa ovog lišaja koji je dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (u obliku suvog ekstrakta-praška, koji je komercijalno dostupan). Za tu svrhu, u navedenim ekstraktima biće određen sadržaj ukupnih polifenola (određen spektrofotometrijskom metodom) i sadržaj usninske kiseline (određen HPLC metodom), a zatim će biti procenjena njihova antimikrobna aktivnost protiv bakterija koje izazivaju infekcije kože (primenom *in vitro* mikrodilucione metode u bujonu), antioksidativna aktivnost (primenom *in vitro* testova (DPPH i FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power assay*)) i citotoksična aktivnost (*in vitro* testovima (testom kisele fosfataze/metodom protočne citometrije) na tumorskim ćelijskim linijama: B16 melanoma i C6 glioma i HaCaT normalnim humanim keratinocitima). U cilju poređenja, usninska kiselina kao čista supstanca, biće podvrgnuta svim navedenim ispitivanjima bioloških aktivnosti;<sup>3</sup>
- da se, na osnovu rezultata ove faze, odabere ekstrakt talusa *U. barbata* (u daljem tekstu ovog odeljka: ekstrakt) sa najvišim sadržajem usninske kiseline/najboljim odnosom antimikrobnog potencijala (protiv bakterija koje izazivaju infekcije kože) i iritacionog potencijala (citotoksičnosti prema normalnim humanim keratinocitima),

---

<sup>3</sup> S obzirom da je ova doktorska disertacija započeta navedenim eksperimentima 1. faze, pre definisanja ciljeva ostalih faza eksperimentalnog rada, ona je, pored ispitivanja antimikrobne aktivnosti navedenih ekstrakata talusa *U. barbata*/usninske kiseline protiv kutanih patogena i citotoksične aktivnosti protiv humanih keratinocita, obuhvatila i ispitivanje antioksidativnog potencijala, odnosno citotoksične aktivnosti prema tumorskim ćelijama.

koji će u sledećim fazama ispitivanja biti inkorporiran u podlogu tipa hidrofilnog krema, stabilizovanu APG mešanim nejonskim emulgatorima, a zatim će razvijene formulacije kremova biti podvrgnute evaluaciji fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika, kao i *in vitro/in vivo* proceni efikasnosti i iritacionog potencijala (preliminarnog profila bezbednosti primene na humanoj koži). Treba naglasiti da je odabir koncentracija inkorporiranog ekstrakta, kao i biofarmaceutska karakterizacija i ispitivanje antimikrobnog potencijala ispitivanih kremova izvršen u odnosu na usninsku kiselinu, kao nosioca navedene aktivnosti ekstrakta.

## ***II faza eksperimentalnog rada***

- da se sprovede preformulaciona studija 1) podloge tipa hidrofilnog krema (stabilizovane upotrebom dva novija APG nejonska mešana emulgatora različite dužine ugljovodoničnog lanca: C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid; koko glukozid i alkohol kokosovog oraha) i 2) ekstrakta. Preformulaciona studija hidrofilnog krema kao podloge obuhvatiće odabir adekvatne koncentracije/vrste ekscipijenasa kao i optimizaciju postupka izrade (temperatura, brzina i vreme mešanja) koja bi omogućila formiranje emulzionog sistema tipa hidrofilnog krema zadovoljavajućih senzornih (estetskih i aplikativnih) karakteristika (što će biti procenjeno deskriptivno-organoleptičkim ispitivanjem), dok će u okviru preformulacione studije ekstrakta njegove fizičko-hemijske osobine biti procenjene preciznim merenjima-ispitivanjem rastvorljivosti, određivanjem particionog koeficijenta i kontaktnog ugla, kao i deskriptivno-upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije;
- da se izradi serija kremova inkorporiranjem ekstrakta u formulisanu emulziju u podlogu na dva načina (suspendovanjem u gotovu podlogu ili dispergovanjem u masnoj fazi krema (pre mešanja sa vodenom fazom)) i u tri koncentracije, koje su odabrane na osnovu rezultata prve faze eksperimentalnog rada (odnos antimikrobnog potencijala protiv bakterija koje izazivaju infekcije kože i citotoksičnosti prema humanim keratinocitima) i literaturnih podataka (koji se



odnose na koncentraciju usninske kiseline u topikalnim preparatima, a na osnovu njenog sadržaja u ekstraktu, koji je određen HPLC metodom u prvoj fazi);

- da se, nakon izrade, ispita uticaj načina inkorporiranja/koncentracije ekstrakta na koloidnu strukturu emulzione podloge, podvrgavanjem pripremljenih uzoraka (krem podloga i kremovi sa ekstraktom) fizičko-hemijskoj karakterizaciji koja će obuhvatiti mikroskopsku analizu: svetlosnu, polarizacionu, fluorescentnu i konfokalnu Raman mikroskopiju; merenje pH i električne provodljivosti; reološku analizu: kontinualnu reologiju; termalne metode: diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju i termogravimetrijsku analizu. Takođe, u cilju procene preliminarne fizičko-hemijske stabilnosti izrađenih uzoraka, relevantna ispitivanja biće ponovljena nakon 30 i 90 dana čuvanja na sobnoj temperaturi;
- da se utvrdi potencijal razvijene podloge kao sistema za isporuku aktivne supstance, primenom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja kroz sintetsku membranu upotrebom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije.
- da se, na osnovu prethodno opisanih ispitivanja, odabere formulacija krema (shodno načinu inkorporiranja/koncentraciji ekstrakta) sa najboljom preliminarnom fizičko-hemijskom stabilnošću i liberacionim profilom;
- da se, u cilju objektivnog sagledavanja rezultata, ekstrakt inkorporira u istoj koncentraciji i istim postupkom izrade u oficinalnu podlogu-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011, a zatim na ovim uzorcima (krem podloga i krem sa ekstraktom) sprovedu odabrana ispitivanja druge faze (već opisana) i dodatno, izvrši evaluacija dermalne raspoloživosti ekstrakta iz APG i oficinalne podloge (DAB, 2011) primenom *in vivo* metode sa trakama (engl. *tape stripping method*).

### ***III faza eksperimentalnog rada***

- da se proceni efikasnost formulacije krema sa ekstraktom, odabrane u prethodnoj fazi istraživanja, evaluacijom njenog antimikrobnog potencijala protiv odabranih kutanih patogena, upotrebom *in vitro* mikrodilucione metode u bujonu i dodatno, ispitivanjem efekata podloge na nespecifične simptome kod infekcija kože (eritem, narušena barijerna funkcija kože), primenom savremenih metoda bioinženjeringa

kože *in vivo* merenjem transepidermalnog gubitka vode (TEGV) i eritema indeksa (EI) veštački iritirane kože;

- da se proceni preliminarni profil bezbednosti primene odabrane formulacije krema sa ekstraktom merenjem navedenih parametara (i dodatno merenjem električne provodljivosti (EP), kao mere vlažnosti *stratum corneum*) u *in vivo* studiji na normalnoj koži pod okluzijom;
- da se, u cilju objektivnog sagledavanja rezultata, poredbeni uzorci (oficinalna krem podloga-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 i odgovarajući krem sa ekstraktom) podvrgnu svim eksperimentima treće faze (procena efikasnosti i bezbednosti).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Materijali i metode

##### 3.1.1. Materijali

Ekstrakt talusa *U. barbata* dobijen pomoću natkritičnog CO<sub>2</sub>, kupljen je od proizvođača Flavex, Nemačka. Za izradu ostalih ekstrakata korišćeni su rastvarači analitičke čistoće: 96 % (V/V) etanol (Vrenje, Srbija), prečišćena voda (Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Srbija) i dietil-etar (Carlo Erba Reagents, Francuska).

U cilju procene hemijskog profila testiranih ekstrakata izvršeno je određivanje ukupnih polifenola upotrebom Folin–Ciocalteu reagensa, metanola, natrijum-hidrogenkarbonata i galne kiseline (Sigma-Aldrich, Nemačka). Za analizu ekstrakata primenom HPLC metode, korišćen je acetonitril HPLC čistoće (Merck, Nemačka), fosforna kiselina (Sigma-Aldrich, Nemačka) i voda (HPLC čistoće) koja je dobijena iz prečišćene vode pomoću uređaja Simplicity® UV Water Purification System (Millipore, Francuska), dok je referentni HPLC standard usninske kiseline (čistoće>98 %) kupljen od Santa Cruz Biotechnology, SAD.

U ispitivanju antimikrobne aktivnosti ekstrakata, usninske kiseline i uzoraka kremova sa ekstraktom korišćen je dimetil-sulfoksid (DMSO), ampicilin (Sigma-Aldrich, Nemačka), Mueller Hinton II bujon sa korigovanom količinom jona kalcijuma i magnezijuma (CAMHB, Becton Dickinson, Francuska), standard 0,5 MacFarland skale (Becton Dickinson, Francuska), bromkrezol ljubičasta i fenol crvena (Merck, Nemačka). Svi reagensi korišćeni u proceni citotoksičnosti ispitivanih ekstrakata i usninske kiseline kupljeni su od Life Technologies, Nemačka. Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata i usninske kiseline korišćeni su metanol i DPPH, natrijum-acetat, sirćetna kiselina, hlorovodonična kiselina (HCl), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), gvožđe-(III)-hlorid heksahidrat (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), gvožđe-(II)-sulfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), nabavljeni od Sigma-Aldrich, Nemačka.

Za izradu emulzionih sistema korišćena su dva novija APG emulgatora i to: 1) C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid (Montanov<sup>TM</sup>L) u funkciji primarnog emulgatora i 2) koko glukozid i alkohol kokosovog oraha (Montanov<sup>TM</sup>S) u funkciji APG koemulgatora (prema specifikaciji proizvođača) (Seppic 2006 a,b). Ostali korišćeni ekscipijensi emulzionih sistema stabilizovanih navedenim APG emulgatorima bili su trigliceridi srednje dužine lanca, cetostearil alkohol (Sabo S.R.L., Italija), glicerol (85 % (m/m)) i kalijum-sorbat (Merck, Nemačka).

Za potrebe izrade poredbenih uzoraka: krema sa ekstraktom i odgovarajuće krem podloge (Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011), korišćeni su Polisorbat 60 (Merck, Nemačka), cetostearil alkohol (Sabo S.R.L., Italija), beli vazelin/beli meki parafin (Sigma-Aldrich, Nemačka) i kalijum-sorbat (Merck, Nemačka). Prečišćena voda, koja je ključala najmanje 5 min, a potom ohlađena na sobnu temperaturu, korišćena je prilikom izrade svih uzoraka, prema propisu DAC/NRF, 2007. Kvalitet korišćenih APG emulgatora odgovara specifikaciji proizvođača (Seppic 2006 a,b), dok je kvalitet ostalih ekscipijenasa u skladu sa zahtevima Ph. Eur.

### **3.1.2. Metode i oprema**

#### ***1 faza eksperimentalnog rada***

##### **3.1.2.1. Izrada ekstrakata talusa *U. barbata***

Lišaj *U. barbata* sakupljen je u Makedoniji (GPS N41 53.5764 E21 33.6348) 15.10.2009. godine. Lišaj je identifikovan na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (zaveden pod brojem 16390/10.4.2010.).

Ispitivani ekstrakti bili su: ekstrakt dobijen primenom natkritičnog CO<sub>2</sub> (U-NK), ekstrakt dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u (dietil-etarska frakcija (U-SOX-E) i etanolna frakcija (U-SOX-EtOH) i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC).

Prema specifikaciji proizvođača, U-NK je suvi ekstrakt dobijen postupkom ekstrakcije natkritičnim CO<sub>2</sub> (odnos droga: ekstrakt=62-100:5), koji je u drugom koraku, prečišćen praktično do čiste usninske kiseline. Preciznije, proizvođač navodi da ovako

dobijen ekstrakt sadrži najmanje 90% usninske kiseline, što je određeno internom HPLC metodom, sa usninskom kiselinom kao standardom<sup>4</sup>.

Uzorci ekstrakata U-SOX-E i U-SOX-EtOH dobijeni su višekratnom kontinuiranom ekstrakcijom organskim rastvaračem u Soxhlet aparaturi sledećim postupkom: po 75,0 g odmerenog osušenog talusa lišaja, usitnjenog do stepena usitnjenosti 0,75 (Ph. Jug. IV), preneto je u svaku od 5 korišćenih hilzni, a zatim preliveno odgovarajućom količinom dietil-etra kojim je vršena višekratna kontinuirana ekstrakcija do njegovog obezbojavanja (U-SOX-E). U istim hilznama sa drogom već ekstrahovanom dietil-etrom (korišćenom za dobijanje U-SOX-E), postupak je ponovljen sa 96 % (V/V) etanolom radi dobijanja etanolne frakcije ekstrakta (U-SOX-EtOH).

Za pripremu U-MAC, 93,91 g odmerenog osušenog talusa lišaja, usitnjenog do stepena usitnjenosti 0,75 (Ph. Jug. IV), preneto je u erlenmajer sa brušenim čepom, preliveno sa 600 ml 70 % (V/V) etanola i macerovano 24 h, a zatim filtrirano pomoću levka i filter papira.

Nakon toga, svi dobijeni tečni ekstrakti su upareni u vakuum uparivaču (Rotary evaporator, Buchi R 114, SAD) kako bi se odstranio rastvarač, a potom osušeni na sobnoj temperaturi do forme suvog ekstrakata, sa prinosom od 2,04; 6,71 i 5,41 % za U-SOX-E; U-SOX-EtOH i U-MAC, respektivno.

**Tabela 4.** Pregled načina obeležavanja ispitivanih ekstrakata talusa *U. barbata*

Naziv ekstrakta	Rastvarač za ekstrakciju	Postupak ekstrakcije
U-NK	CO <sub>2</sub>	Ekstrakcija natkritičnim fluidima
U-SOX-E	Dietil-etar	Ekstrakcija po Soxhlet-u
U-SOX-EtOH	Etanol, 96 % (V/V)	Ekstrakcija po Soxhlet-u
U-MAC	Etanol, 70 % (V/V)	Maceracija

<sup>4</sup> Prema definiciji Ph. Eur., ovaj ekstrakt bi se mogao obeležiti kao kvantifikovani ekstrakt.

### 3.1.2.2. Ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata talusa *U. barbata*

#### 3.1.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je prema Folin-Ciocalteu metodi: 100 µl metanolnih rastvora uzoraka ekstrakata U-NK, U-SOX-E, U-SOX-EtOH i U-MAC (0,112; 0,284; 3,780 i 6,130 mg/ml, respektivno) su pomešani sa 0,75 ml Folin–Ciocalteu reagensa (prethodno razblaženog 10 puta destilovanom vodom). U navedenu smešu, nakon stajanja od 5 min na 22°C, dodato je 0,75 ml rastvora natrijum-hidrogenkarbonata (60 g/l). Nakon 90 min stajanja na 22°C, apsorbanacija ovog rastvora je izmerena pomoću spektrofotometra Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka) na talasnoj dužini od 725 nm. Galna kiselina (0–100 mg/l) korišćena je za kalibraciju standardne krive. Kalibraciona kriva pokazala je linearnu regresiju sa  $r > 0,99$ , a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suve materije ekstrakta (mg EGK/g SM) (Velioglu i sar., 1998).

#### 3.1.2.2.2. HPLC analiza

HPLC analiza ispitivanih ekstrakata izvršena je upotrebom hromatografa HPLC model 1200 i kolone Zorbax Eclipse XDB-C18 600 Bar, 4,6 x 100 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, Nemačka). Protok je bio 0,1 ml/min, a gradijentna elucija je bila podešena prema sledećem protokolu: 11-55 % B, 0–5 min; 55-80 % B, 5–10 min; 80 % B, 10–12 min; 80-100 % B, 12–20 min; 100 % B, 20-35 min, 100-11 % B, 35-40 min, 11 % B, 40-55 min. Uzorci ekstrakata (u triplicatu) za HPLC analizu pripremljeni su na sledeći način: 5,0; 7,1; 18,9 i 61,3 mg U-NK, U-SOX-E, U-SOX-EtOH i U-MAC, respektivno su rastvoreni u 50,0 ml metanola i zatim filtrirani kroz 0,45 µm filtere od politetrafluoroetilena (PTFE) u staklene HPLC vialne i analizirani gorenavedenim postupkom. Identifikacija jedinjenja izvršena je na osnovu retencionih vremena i preklapanja spektra, a kvantifikacija eksternom kalibracijom sa standardima.

### **3.1.2.3. Ispitivanje bioloških aktivnosti ekstrakata talusa *U. barbata*/usninske kiseline**

#### *3.1.2.3.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti*

##### *3.1.2.3.1.1. Kulture ćelija*

Citotoksična aktivnost ispitivana je na sledećim tumorskim ćelijskim linijama: B16 (mišji melanom) i C6 (pacovski gliom). Sve ćelijske linije su nabavljene od Evropske kolekcije ćelijskih linija (engl. *European Collection of Cell Cultures, ECACC*). Ćelije su održavane u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO<sub>2</sub> na 37°C. Za gajenje tumorske ćelijske linije C6 korišćen je HEPES-puferovan RPMI 1640 medijum, koji je sadržao 2 mM glutamina, 10 mM natrijum-piruvata i 5 % fetalnog telećeg seruma, dok su B16 ćelije gajene u DMEM medijumu sa 2 mM glutamina i 10 % fetalnog telećeg seruma. HaCaT ćelijska linija (normalni humani keratinociti) nabavljeni su od CLS-Cell Lines Service, Nemačka. HaCaT ćelije su gajene u DMEM medijumu sa 10 % fetalnog goveđeg seruma, 4 g/l glukoze i 2 mM L-glutamina. Svi medijumi za gajenje ćelija sadržali su i 5000 U/ml penicilina i 5 mg/ml rastvora streptomicina.

Ćelije su pripremljene za eksperimente primenom standardne procedure tripsinizacije pomoću tripsina/EDTA i zasejavane u ploče sa 96 bunara u cilju procene vijabilnosti i u ploče sa 6 bunara za analize protočne citometrije. Nakon zasejavanja, ispitivane ćelije su inkubirane tokom 24 h, nakon čega je medijum odlivan, a ćelije tretirane dvostruko opadajućim koncentracijama odgovarajućih ekstrakata/usninske kiseline. Ispitivani uzorci su rastvoreni u DMSO i razblaženi medijumom za gajenje. Finalna koncentracija DMSO nije prešla 0,1 % i nije imala uticaja na vijabilnost ćelija.

##### *3.1.2.3.1.2. Određivanje vijabilnosti ćelija*

Vijabilnost ćelija određena je testom kisele fosfataze na sledeći način: nakon 24-h tretmana ekstraktima/usninskom kiselinom, ćelije su dva puta isprane puferovanim fiziološkim rastvorom, a zatim je u svaki bunar dodavano po 100 µl reakcione smeše koja je sadržala 0,1 M acetatni pufer pH 5.5 sa 10 mM paranitrofenil-fosfata (PNFF) i 0,1 % Triton-X. Ćelije su potom inkubirane na 37°C tokom 90 min. Nakon inkubacije, reakcija je

prekinuta dodavanjem 50  $\mu$ l natrijum-hidroksida (NaOH) po bunaru. Kisela fosfataza prisutna u živim ćelijama u kiseloj sredini iz PNFF oslobađa p-nitrofenil anjon, koji je u baznoj sredini (nastaloj nakon dodavanja NaOH) žute boje. Intenzitet nastale žute boje proporcionalan je broju živih (vijabilnih) ćelija. Apsorbancija žute boje koja se razvila nakon dodavanja NaOH očitavana je na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) na talasnoj dužini od 405 nm. Dobijene vrednosti apsorbancija tretiranih ćelija izražene su kao % od kontrole (netretirane ćelije) čija je apsorbancija arbitrarno predstavljena kao 100 % (Yang i sar., 1996).

#### 3.1.2.3.1.3. Ispitivanje mehanizma citotoksične aktivnosti

Dalja ispitivanja, koja su za cilj imala uvid u mehanizam citotoksičnosti, sprovedena su samo sa ekstraktom koji je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost i sa usninskom kiselinom, kao kontrolom. Za tu svrhu, korišćena je metoda protočne citometrije (FACSCalibur flow cytometer sa integrisanim softverom Cell Quest Pro, BD, Nemačka) za: analizu ćelijskog ciklusa (kvantifikaciju ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa), određivanje prisustva kiselih citoplazmatskih vezikula i merenje stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala (engl. *Reactive oxygen species, ROS*) u testiranim ćelijama.

##### 3.1.2.3.1.3.1. Analiza ćelijskog ciklusa

Analiza ćelijskog ciklusa izvršena je merenjem količine DNK obeležene fluorescentnom bojom-propidijum jodidom (engl. *propidium iodide, PI*), koja se umeće u molekul nukleinskih kiselina. Na osnovu intenziteta fluorescencije PI interkaliranog u molekul nukleinskih kiselina može se proceniti količina DNK u analiziranim ćelijama. Ćelije u  $G_0G_1$  su diploidne ( $2n$ ), ćelije sa hipodiploidnim sadržajem DNK (fragmentisana DNK) odgovaraju ćelijama koje se nalaze u procesu apoptoze ( $<2n$ ), ćelije u S fazi imaju veći sadržaj DNK od diploidnog (između  $2n$  i  $4n$ ), dok ćelije u  $G_2M$  fazi imaju dvostruko veći sadržaj DNK od diploidnog ( $4n$ ).

Sam ekperimentalni postupak izveden je na sledeći način: Nakon tretmana sa  $IC_{50}$  koncentracijama ekstrakta/usninske kiseline za koje je u prethodnim eksperimentima pokazano da prema testiranim ćelijskim linijama ispoljavaju citotoksični efekat, ćelije su



tripsinizirane, oprane u puferovanom fiziološkom rastvoru i fiksirane u hladnom 70 % (V/V) etanolu. 30 min na 4°C. Nakon ispiranja puferovanim fiziološkim rastvorom ćelije su inkubirane sa PI (40 mg/ml) i RNase (1 mg/ml), 30 min na 37°C u mraku. Konačno, ćelije su isprane i analizirane na protočnom citometru na FL-2 kanalu (narandžasta fluorescencija, koja odgovara PI). (Mijatovic i sar., 2005).

#### *3.1.2.3.1.3.2. Određivanje prisustva kiselih citoplazmatskih vezikula*

Kisele citoplazmatske vezikule jedan su od markera procesa autofagije, ali nisu specifične za njega. Detekcija kiselih citoplazmatskih vezikula vrši se uz pomoć fluorohroma akridin oranža, koji predstavlja pH-osetljivu boju. U prisustvu kiselog sadržaja akridin oranž emituje crveno/narandžastu fluorescenciju, dok jedra ćelija pokazuju zelenu fluorescenciju (neutralna pH). Na protočnom citometru prati se promena odnosa FL-3/FL-1 (crvena/zelena) fluorescencije, koja je proporcionalna porastu broja vezikula sa kiselim sadržajem. Protočni citometar se baždari tako da odnos FL3/FL1 u kontroli (netretirane ćelije) bude jednak jedinici da bi se analiza ovog odnosa u uzorcima vršila u odnosu na kontrolu. Povećanje broja vezikula sa kiselim sadržajem u uzorku se registruje kao povećanje odnosa FL3/FL1.

Eksperimentalni postupak se sastoji u sledećem: Nakon tretmana sa IC<sub>50</sub> koncentracijama ekstrakta/usninske kiseline za koje je u prethodnim eksperimentima pokazano da prema testiranim ćelijskim linijama ispoljavaju citotoksični efekat, ćelije su tripsinizirane, oprane u puferovanom fiziološkom rastvoru i zatim inkubirane 15 min na 37°C sa akridin oranžom rastvorenim u medijumu (1:100), nakon čega su dva puta oprane u puferovanom fiziološkom rastvoru, a zatim je izvršeno očitavanje (Paglin i sar., 2001).

#### *3.1.2.3.1.3.3. Merenje nastajanja ROS*

Za merenje nastajanja ROS, korišćen je redoks-osetljivi fluorohrom dihidro-rodamin 123 (DHR 123). DHR 123 (nefluorescentan molekul) slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu i u prisustvu slobodnih radikala dolazi do njegove oksidacije u rodamin, koji emituje zelenu fluorescenciju, koja se može kvantifikovati na FL-1 kanalu protočnog

citometra. Povećanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala je proporcionalno promeni intenziteta zelene fluorescencije koju emituje rodamin.

Ekperimentalni postupak podrazumevao je istovremenu inkubaciju ispitivanih ćelija tokom trajanja tretmana (ekstraktom/usninskom kiselinom) i DHR 123 (finalna koncentracija 5  $\mu$ M). Nakon isteka inkubacije, ćelije su standardno tripsinizirane, oprane u puferovanom fiziološkom rastvoru, nakon čega je izvršeno očitavanje na protočnom citometru (Emmendorffer i sar., 1990).

#### 3.1.2.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

##### 3.1.2.3.2.1. Bakterijski sojevi

Antimikrobna aktivnost ispitivana je na odabranim sojevima G+ i G- bakterijskih vrsta koje su uzročnici infekcija kože kod ljudi (Ferringer i Elston, 2009; Tognetti i sar., 2012). Osim referentnih sojeva bakterija iz Američke kolekcije uzoraka kultura (engl. *American Type of Culture Collection, ATCC*), korišćeni su i sojevi iz uzoraka briseva kože poreklom od bolesnih ljudi tj. iz kliničkih materijala (klinički izolati, KI), dostavljenih na Katedru za mikrobiologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, čija je identifikacija i izolacija izvršena primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda (Zizovic i sar., 2012). Iz grupe G+ bakterija izabrani su: *S. aureus* ATCC 25923, MRSA ATCC 33591, *S. epidermidis* (KI) i *E. faecalis* (KI), a iz grupe G- bakterija: *K. pneumoniae* (KI) i *E. coli* ATCC 25922.

##### 3.1.2.3.2.2. Test antimikrobne aktivnosti

U cilju procene antimikrobnog delovanja ekstrakata (U-NK, U-SOX-E, U-SOX-EtOH i U-MAC) i usninske kiseline, primenjena je mikrodiluciona metoda u bujonu za određivanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), a prema propisu Instituta za kliničke laboratorijske standarde, SAD (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI*) iz 2010 godine. Metoda je izvođena u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (Spektar, Čačak). Korišćena je podloga CAMHB, uz dodatak 1,6 % bromokrezol ljubičaste u finalnoj koncentraciji od 0,2 ml/200 ml za G+ i 1 % fenol crvene u finalnoj koncentraciji

od 1 ml/200 ml za G- bakterije. Bromkrezol ljubičasta i fenol crvena su dodate radi vidljivosti bakterijskog rasta. Ispitivane koncentracije ekstrakata/usninske kiseline bile su 2560,000; 1280,000; 640,000; 320,000; 160,000; 80,000; 40,000; 20,000; 10,000; 5,000; 2,500; 1,250 i 0,625 µg/ml. Ekstrakti/usninska kiselina su prethodno rastvarani u DMSO u početnoj koncentraciji od 25600 µg/ml, a zatim razblaženi 10 puta u CAMHB čime su dobijene početne koncentracije od 2560,000 µg/ml od kojih su potom pripremana dvostruka razblaženja do najniže ispitivane koncentracije. Tražena gustina inokuluma od  $5 \times 10^5$  CFU/ml postignuta je tako što je uz primenu standarda 0,5 MacFarland skale najpre pripremljena suspenzija bakterija gustine približno  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml. Tako pripremljena suspenzija razblažena je 10 puta ( $1-2 \times 10^7$  bakterija/ml), a 5 µl ove suspenzije testiranih bakterija zasejavano je u 100 µl CAMHB. Inkubacija je vršena tokom 18-24 h na temperaturi od 37°C. Za vrednost MIK uziman je bujon sa najmanjom koncentracijom ispitivanog uzorka u kojem je izostao vidljivi rast bakterija. U testu antimikrobne aktivnosti kao pozitivna kontrola korišćen je ampicilin (Zizovic i sar., 2012).

#### *3.1.2.3.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti*

##### *3.1.2.3.3.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test*

DPPH test izveden je prema Bloisu (1958), uz izvesne modifikacije. Po 400 µl rastućih koncentracija rastvora ekstrakata/usninske kiseline u metanolu preneti su u odgovarajuće test-tube koje su sadržale po 3,6 ml 0,1 mM metanolnog rastvora DPPH, dajući tako finalne koncentracije od 0,0112; 0,0284; 0,3760; 0,2420 i 0,0108 mg/ml za U-NK; U-SOX-E; U-SOX-EtOH; U-MAC i usninsku kiselinu, respektivno. Apsorbancija navedene smeše, nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, izmerena je na spektrofotometru Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka) na talasnoj dužini od 517 nm, uz metanol kao slepu probu. Procenat inhibicije je izračunavan korišćenjem sledeće formule

$$I = [(Ac - Auz) / Ac] \times 100$$

gde je I procenat inhibicije, Ac apsorbanacija negativne kontrole (400  $\mu$ l čistog metanola), Auz je apsorbanacija uzorka. Sintetički antioksidans butilhidroksitoluen (BHT) korišćen je kao pozitivna kontrola. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate korišćenjem linearne regresione analize.

#### *3.1.2.3.3.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test*

100  $\mu$ l metanolnog rastvora analiziranog uzorka (ekstrakt/usninska kiselina) odgovarajuće koncentracije je pomešano sa 3,0 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa (25 ml 300 mM acetatnog pufera, pH 3,6; 2,5 ml 10 mM rastvora TPTZ u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mM rastvora FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Nakon inkubacije ove smeše od 30 min na 37°C, njena apsorbanacija je izmerena upotrebom spektrofotometra Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka) na 593 nm uz slepu probu koja je smeša istih sastojaka sa 100  $\mu$ l metanola umesto metanolnog rastvora analiziranog uzorka. FRAP vrednost je izračunata iz kalibracione krive standardnog rastvora FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u FRAP reagensu u koncentracionom opsegu od 25–400  $\mu$ mol/l, koja je pokazala linearnu regresiju sa  $r > 0,99$ , a rezultati su izraženi kao milimolovi Fe<sup>2+</sup> jona po gramu suve materije testiranog uzorka (Fe<sup>2+</sup>/g SM) (Benzie i Strain, 1999).

### *II faza eksperimentalnog rada*

#### **3.1.2.4. Preformulaciona studija odabranog ekstrakta talusa *U. barbata***

U okviru preformulacione studije ekstrakta odabranog na osnovu rezultata prve faze eksperimenata, njegove fizičko-hemijske osobine su procenjene preciznim merenjima-određivanjem rastvorljivosti, particionog koeficijenta i kontaktnog ugla, kao i deskriptivno-upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije.

##### *3.1.2.4.1. Određivanje rastvorljivosti*

Rastvorljivost ekstrakta u vodi i trigliceridima srednje dužine lanca određena je metodom mućkanja (engl. *shake flask*) na sledeći način: višak ekstrakta je dodat u 25 ml odgovarajućeg rastvarača u erlenmajeru, koji je zatim zatvoren brušenim zatvaračem i

postavljen na orbitalni šejker IKA® KS 260 basic (IKA, Nemačka) na 181 obrt/min na 25°C, tokom 72 h. Nakon toga, uzorci su 30 min centrifugirani na 3000 obrt/min (Centrifuga Tehnica LC 320, Slovenija) u cilju razdvajanja nerastvorenog ekstrakta od supernatanta, a zatim je sadržaj ekstrakta u supernatantu određen spektrofotometrijski (Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System, Agilent Technologies, Nemačka) na 282 nm, koristeći odgovarajući rastvarač (u kojem se određuje rastvorljivost ekstrakta) kao slepu probu. Kalibraciona kriva ekstrakta u metanolu pokazala je linearnu regresiju sa  $r > 0,99$  u koncentracionom opsegu od 0,72 to 11,65 µg/ml.

#### *3.1.2.4.2. Određivanje particionog koeficijenta*

Particioni koeficijent izmeren je na sledeći način: ekstrakt je rastvoren u vodi (u prethodno određenoj koncentraciji zasićenja) a onda je njegov sadržaj određen spektrofotometrijski (Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System, Agilent Technologies, Nemačka) na 282 nm, na početku eksperimenta. Zatim je vodeni rastvor ekstrakta prenet u erlenmajer u koji je dodata ista količina triglicerida srednje dužine lanca, nakon čega je erlenmajer zatvoren brušenim zatvaračem i postavljen na orbitalni šejker IKA® KS 260 basic (IKA, Nemačka) na 181 obrt/min na 25°C, tokom 72 h. Nakon toga, navedena smeša je 30 min centrifugirana na 3000 obrt/min (Centrifuga Tehnica LC 320, Slovenija) i sadržaj ekstrakta u vodenoj fazi ponovo određen spektrofotometrijski. Particioni koeficijent je izražen kao odnos koncentracije ekstrakta u trigliceridima srednje dužine lanca i koncentracije u vodenoj fazi. Kalibraciona kriva ekstrakta u metanolu pokazala je linearnu regresiju sa  $r > 0,99$  u koncentracionom opsegu od 0,72 to 11,65 µg/ml.

#### *3.1.2.4.3. Određivanje kontaktnog ugla*

Kvašenje ekstrakta je određeno merenjem kontaktnog ugla modifikovanom metodom statične sedeće kapi (Vadgarna i Harris, 2007). Ukratko, tablete od čistog ekstrakta su pripremljene pomoću hidraulične prese (Perkin-Elmer, Nemačka). 10,0 µl vode je iz mikropipete iskapano na površinu tablete sa visine od 5 mm. Tečni meniskus na površini tablete je posmatran 20 s i zatim uslikan pomoću foto aparata EOS 50 D sa 50 mm 1:1.8 sočivom sa velikim uvećanjem (Canon, Japan). Kontaktni ugao čvrsto-tečne međupovršine

je određen sa uvećane digitalne slike upotrebom softvera MB ruler (MB-Softwaresolutions, Nemačka) crtanjem tangentne linije meniskusa na preseku čvrste faze, tečne faze i vazduha.

#### *3.1.2.4.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija*

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) ekstrakta je izvršena njegovim nanošenjem na provodljivu, dvostrano-lepljivu traku, a pripremljen uzorak analiziran pomoću mikroskopa DSM 940 A (Zeiss, Nemačka) sa integrisanom karticom Frame Grabber (Program Orion Vers. 5.25) pri naponu ubrzanja od 5 kV.

#### **3.1.2.5. Priprema ispitivanih kremova**

Sastav ispitivanih podloga tipa hidrofilnog krema (podloga stabilizovana APG emulgatorima i oficinalna podloga-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011), prikazan je u tabeli 5.

Odabir koncentracije APG emulgatora (C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid; koko glukozid i alkohol kokosovog oraha) kao i koncentracije/vrste ostalih ekscipijenasa koje su omogućile izradu hidrofilnog krema zadovoljavajućih senzornih (estetskih i aplikativnih) karakteristika, izvršen je u preformulacionoj studiji emulziona podloge, sprovedenoj u skladu sa preporukama proizvođača, primenom organoleptičkih testova (podaci nisu prikazani).

Podloga stabilizovana APG emulgatorima (podloga M) pripremljena je u skladu sa postupkom razvijenim od strane Savic i saradnika (2009). Ukratko, emulgatori su zagrevani zajedno sa masnom fazom na 70°C, nakon čega su dodavani u vodenu fazu zagrejanu na 72-75°C uz mešanje na propelerskoj mešalici (IKA®RW16 basic, Nemačka) na konstantnoj temperaturi (na ugašenoj, ali još uvek zagrejanj ploči magnetne mešalice IKA®RH basic2, Nemačka) 3 min na 800 obrt/min i zatim 3 min na 500 obrt/min. Hlađenje je započeto skidanjem uzorka sa grejne ploče magnetne mešalice uz mešanje od 500 obrt/min 1 min, a zatim 300 obrt/min do hlađenja na sobnu temperaturu.

Oficinalna podloga-Nejonski hidrofilni krem (podloga N) pripremljena je prema propisu DAB 2011.

Ekstrakt talusa *U. barbata* inkorporiran je u izrađenu APG podlogu uz variranje koncentracije i/ili načina inkorporiranja (tj. postupka izrade ispitivanih kremova).

Koncentracije ekstrakta koje su inkorporirane u APG podlogu (uzorak M) odabrane su u skladu sa rezultatima prve faze eksperimentalnog rada (odnos antimikrobnog potencijala protiv bakterija koje izazivaju infekcije kože i citotoksičnosti prema humanim keratinocitima) i literaturnih podataka (Schempp i sar., 2010). Izabrane koncentracije ekstrakta odgovarale su sadržaju usninske kiseline od 1, 2 i 4 % (m/m) u finalnoj formulaciji.

Kada je reč o variranju postupka izrade ispitivanih kremova, u skladu sa nalazima preformulacione studije, ekstrakt je inkorporiran u izrađenu APG podlogu na dva načina.

**Tabela 5.** Sastav ispitivanih podloga tipa hidrofilnog krema (podloga stabilizovana APG emulgatorima (M) i oficinalna podloga-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 (N))

Sastojak	Uzorak M	Uzorak N
	% (m/m)	
Trigliceridi srednje dužine lanca	18,5	-
Cetostearil alkohol	1,5	10,0
C <sub>14-22</sub> alkohol i C <sub>12-20</sub> glukozid	8,0	-
Koko glukozid i alkohol kokosovog oraha	2,0	-
Polisorbat 60	-	5,0
Parafin, beli meki	-	25,0
Glicerol (85 % (m/m))	5,0	10,0
Kalijum-sorbat	0,5	0,5
Prečišćena voda	64,5	49,5

U jednoj grupi ispitivanih kremova, ekstrakt je suspendovan u gotovu podlogu (ova grupa uzoraka označena je kao S uzorci). Tačnije, odgovarajuća količina ekstrakta je


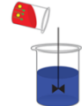
precizno odmerena na analitičkoj vagi (XP205 DeltaRange®, Mettler Toledo, Nemačka) i pomešana sa porcijama podloge upotrebom tarionika i pistila.

U drugoj grupi ispitivanih kremova (označenih kao D uzorci), odgovarajuća količina ekstrakta, precizno odmerena na analitičkoj vagi (XP205 DeltaRange®, Mettler Toledo, Nemačka), je najpre dispergovana u tečni deo masne faze krema (trigliceridi srednje dužine lanca), a zatim podvrgnuta sonifikaciji na ultrazvučnom kupatilu od 60 min i homogenizaciji upotrebom uređaja T 18 digital Ultra-Turax® (IKA®, Nemačka) 5 min na 24 000 obrt/min. Nakon toga, primenjen je isti postupak opisan za izradu podloge.

Treba naglasiti da je količina svakog ekscipijensa u D uzorcima izračunata tako da bude ekvivalentna odgovarajućem S uzorku, obezbeđujući na taj način isti odnos pojedinačnih komponenti u ispitivanim kremovima (S vs. D, u istoj koncentraciji ekstrakta) u cilju njihove međusobne komparacije.

Nakon dodavanja ekstrakta u APG podlogu (M) u navedenim koncentracijama, kao što je prikazano u tabeli 6, ispitivani kremovi označeni na sledeći način: M1S, M2S, M4S (za S uzorke) i M1D, M2D, M4D (za D uzorke).

**Tabela 6.** Pregled načina obeležavanja ispitivanih kremova, shodno načinu pripreme i koncentraciji ekstrakta (žuto: ekstrakt; crveno: masna faza; zeleno: APG emulgatori; plavo: vodena faza)

	Način pripreme	Koncentracija ekstrakta koja odgovara sadržaju usninske kiseline u finalnoj formulaciji od		
		1 % (m/m)	2 % (m/m)	4 % (m/m)
	<b>Ekstrakt suspendovan u APG podlozi (S uzorci)</b>	M1S	M2S	M4S
	<b>Ekstrakt dispergovan u masnoj fazi APG krema (D uzorci)</b>	M1D	M2D	M4D



Kao što je ranije naglašeno, na osnovu procene fizičko-hemijske stabilnosti i preliminarnog liberacionog profila, izabran je jedan od ispitivanih kremova sa ekstraktom na bazi APG emulgatora, a zatim je istim postupkom izrade i u istoj koncentraciji ekstrakt inkorporiran u oficinalnu podlogu (N). S obzirom da je odabrani uzorak bio M2S, u kojem je ekstrakt inkorporiran suspednovanjem u koncentraciji koja odgovara sadržaju usninske kiseline od 2 % (m/m) (odeljak 4.2.), ekstrakt je inkorporiran na isti način i u istoj koncentraciji u oficinalnu podlogu N. U skladu sa navedenim načinom označavanja uzoraka, ovaj uzorak je obeležen oznakom N2S.

### **3.1.2.6. Fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih kremova**

#### *3.1.2.6.1. Polarizaciona i fluorescentna mikroskopija*

Uvid u specifičnu koloidnu strukturu ispitivanih podloga tipa hidrofilnog krema, izvršen je primenom svetlosnog mikroskopa Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Nemačka) integrisanog sa digitalnom AxioCam ICc1 kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom (pri uveličanju od 200 x) i to uz dodatak  $\lambda$ -pločice u cilju polarizacije svetlosti, odnosno mogućnosti vizuelizacije anizotropnih struktura (polarizaciona mikroskopija). Takođe, uticaj načina inkorporiranja/koncentracije ekstrakta na koloidnu strukturu ispitivanih emulzionih podloga/distribucija ekstrakta u emulzionom sistemu procenjena je na isti način u ispitivanim kremovima (sa ekstraktom), i dodatno, analizom svih pripremljenih uzoraka kremova (krem podloge i kremovi sa ekstraktom) istim mikroskopom uz dodatak 43 HECy 3 filter elementa (fluorescentna mikroskopija).

#### *3.1.2.6.2. Reološka merenja*

Ispitivanje reoloških parametara krem podloga i kremova sa ekstraktom sprovedeno je primenom reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) inicijalno (7 dana nakon izrade), kao i nakon 90 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi. Merenja su vršena uz primenu kupa/ploča sistema dijametara 50 mm, pod uglom od  $1^\circ$  i debljinom uzorka od 0,05 mm, na temperaturi od  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Tokom kontinualnih merenja, primenjen je postupak sa kontrolisanom brzinom smicanja od 0 do  $200 \text{ s}^{-1}$  i obratno, pri čemu je svaki stupanj trajao

po 120 s. Kao osnovni parametri od interesa, praćeni su profili proticanja/tećenja, minimalni i maksimalni prividni viskozitet i vrednosti histereznih površina.

Reološka merenja sprovedena su u cilju uvida u koloidnu strukturu i procene preliminarne fizičke stabilnosti ispitivanih uzoraka kremova. Osim toga, podaci dobijeni primenom kontinualnih reoloških merenja mogu se povezati sa liberacionim profilom aktivne supstance iz nosača, kao i senzornim osobinama kremova (kao veoma važnog parametra komplijanse pacijenata).

#### *3.1.2.6.3. Raman spektralna mikroskopija*

Raman spektralna mikroskopija je savremena metoda koja se često koristi za detaljna ispitivanja strukture i sastava različitih sistema (Fischer i sar., 2010). U eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije, navedena metoda je poslužila kao koristan analitički instrument u određivanju tačne lokalizacije ekstrakta u višefaznom emulzionom sistemu sa APG emulgatorima i time u pojašnjavanju uloge njegovih čestica u mehanizmima uključenim u stabilizaciju ispitivanih kremova.

Mikrografije testiranih uzoraka dobijene su upotrebom  $\alpha$  500R Raman mikroskopa opremljenog 532 nm eksitacionim laserom, UHTS 300 spektrometrom i DV401-BV CCD kamerom (WiTec, Nemačka). Površina od 15  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$  (8100 piksela) je mapirana upotrebom objektiva sa uveličanjem 100 x (numeričke blende 1,25). Mikrografije kodirane bojom dobijene su upotrebom softvera WiTecProject 2.02. Naime, na ovim mikrografijama svaki piksel odgovara jednom Raman spektru. Kako svaki spektar predstavlja „otisak prsta” hemijske vrste u određenom delu mikrografije, ovo omogućava analizu distribucije različitih materijala u uzorku. Upotrebom spektra svake supstance u uzorku, može se izračunati njena relativna količina u svakoj tački mikrografije. Dodelom odgovarajuće boje spektru svake supstance dobija se mikrografija kodirana bojom na osnovu koje se može utvrditi distribucija svih supstanci u okviru testiranog preseka. Smeše supstanci se na mikrografijama vide kao mešavine odgovarajućih boja, pri čemu udeo svake boje u mešovitoj boji odgovara udelu odgovarajuće supstance u smeši, u određenoj tački mikrografije.

#### *3.1.2.6.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)*

DSC merenja sprovedena su u cilju procene faznih prelaza ispitivanih kremova (krem podloge i kremovi sa ekstraktom), radi prikupljanja dodatnih informacija o njihovoj koloidnoj strukturi.

Male količine uzoraka (između 10 i 12 mg) precizno su izmerene na analitičkoj vagi XP205 DeltaRangeR (Mettler Toledo, Nemačka) u aluminijskim posudicama, koje su zatim hermetički zatvorene. S obzirom na značajan udeo vode u ispitivanim sistemima, pre merenja izvršena je punktura poklopca posudice, kako bi se omogućilo pravovremeno registrovanje promena prilikom zagrevanja uzoraka. Prazna aluminijska posudica poslužila je kao referentna. Primenom uređaja Mettler DSC 820 (Mettler Toledo, Nemačka) uzorci su zagrevani od 25°C do 105°C, brzinom od 5 K/min

#### *3.1.2.6.5. Termogravimetrijska analiza (TGA)*

TGA merenja kremova (krem podloge i kremovi sa ekstraktom) sprovedena su sa ciljem procene načina inkorporiranja vode u emulzionom sistemu, što može ukazati na složenost njihove koloidne strukture. Takođe, distribucija vode u emulzionom sistemu može se dovesti u vezu sa potencijalom za povećanje vlažnosti kože, i s tim u vezi, sa perkutanom resorpcijom aktivnih supstanci i emulzionih nosača, odnosno njihovom dermalnom raspoloživošću.

Mala količina uzoraka precizno je izmerena u otvorenim aluminijskim posudicama i analizirana primenom uređaja za simultanu termalnu analizu Netzsch STA 409PG (Netzsch, Nemačka). Uzorci su podvrgnuti zagrevanju od 25°C do 105°C uz primenu izotermalnih segmenata na početku i kraju svakog merenja. Brzina zagrevanja podešana je na 5 K/min. Dobijeni rezultati obrađeni su primenom pratećeg ProteusR Thermal Analysis softvera.

#### *3.1.2.6.6. Merenje pH i električne provodljivosti*

Merenja pH vrednosti i električne provodljivosti izvršena su nakon 7, 30 i 90 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, sa ciljem procene fizičko-hemijske stabilnosti

ispitivanih kremova (krem podloge i kremovi sa ekstraktom). Dodatno, pH vrednost može pružiti informacije o pogodnosti primene datih uzoraka na koži, dok vrednost električne provodljivosti može ukazati na tip emulzionog sistema (u/v, voda-u-ulju (v/u) ili mešoviti).

Merenja pH i električne provodljivosti sprovedena su direktnim uranjanjem odgovarajućih sonde uređaja pH-metar HI 9321 (Hanna instruments, SAD), i konduktometar CDM 230 (Radiometer, Danska) u testirane uzorke kremova.

### **3.1.2.7. Biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih kremova**

#### *3.1.2.7.1. In vitro ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz ispitivanih podloga*

Preliminarna analiza liberacionih profila ekstrakta (praćeno preko usninske kiseline) iz razvijene APG podloge, sprovedena je sa ciljem procene njenog potencijala (u odnosu na oficinalnu podlogu-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011), kao sistema za isporuku aktivne supstance.

*In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja usninske kiseline izvršeno je primenom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije (GauerGlas, Nemačka) u kojima je donorska (ispitivani uzorak) od akceptorske faze (fosfatni pufer pH 7,4 (Ph. Eur.) sa dodatkom 20 % (V/V) Polisorbata 20) odvojena membranom od politetrafluoroetilena (PTFE). U donorski deo ćelije nanet je ispitivani uzorak, dok je u akceptorskom delu (zapremine 12 ml) navedeni akceptorski medijum konstantno mešan brzinom od 500 obrt/min. Akceptorski delovi ćelije bili su uronjeni u vodeno kupatilo, termostatirano na 32°C. Eluati zapremine 250 µl uzorkovani su tokom 8 h, u prethodno definisanim vremenskim intervalima. Nakon svakog uzorkovanja, u sistem je dodata ista zapremina čistog akceptorskog medijuma, kako bi se održali *sink* uslovi. Tokom čitavog eksperimenta, Franz-ove difuzione ćelije bile su zatvorene silikonskim filmom (Parafilm® M, Brand, Nemačka) u cilju sprečavanja evaporacije akceptorske faze.

Koncentracija usninske kiseline u eluatima određena je primenom modifikovane HPLC metode (Zizovic i sar., 2012). Za tu svrhu, korišćen je hromatograf LC-20A prominence (Shimadzu, Nemačka) i HPLC kolona Nucleosil 100-5C 18 CC 125/4 u kombinaciji sa pretkolonom Nucleosil 100-5 C18 CC 8/4 (Macherey-Nagel, Nemačka).

Temperatura kolone bila je podešena na 30°C, protok je bio izokratski (rastvarač A: 23,5 % rastvora fosforne kiseline (500 ml HPLC vode i 9,8 ml fosforne kiseline) i 76,5 % acetonitrila) brzine 1,5 ml/min Uzorkovano je 20 µl uzorka, a apsorbancija je merena na 282 nm. Kumulativna količina oslobođene usninske kiseline po jedinici površine primenjene sintetske membrane (µg/cm<sup>2</sup>), prikazana je u zavisnosti od vremena.

### 3.1.2.7.2. *In vivo* ispitivanje dermalne raspoloživosti usninske kiseline iz ispitivanih podloga

Evaluacija dermalne raspoloživosti ekstrakta (praćeno preko usninske kiseline) iz ispitivanih podloga sprovedena je upotrebom metode sa trakama (*tape stripping* metode), prema protokolu razvijenom od strane Pantelić (2013), dizajniranom za ispitivanje hidrofилnih kremova tako da obezbedi dovoljnu osetljivost za pružanje podataka o stepenu penetracije lekovitih supstanci iz različitih nosača, prilikom njihovog poređenja. Uzimajući u obzir da se radi o *in vivo* ispitivanju na ljudima, pre započinjanja studije dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu<sup>5</sup>.

Svaki uzorak ispitivan je na najmanje 4 zdrava dobrovoljca (n≥4) koji su, u skladu sa Helsinškom deklaracijom, detaljno upoznati sa protokolom ispitivanja i dali su pismenu saglasnost za učešće u studiji (potpisani informisani pristanak). Ispitanicima su date instrukcije da ne koriste kozmetičke proizvode ili druge preparate najmanje 24 h pre početka ispitivanja. Na dan ispitivanja, ispitanici su proveli 30-60 min u laboratoriji u kojoj je studija izvođena, u cilju aklimatizacije kože. Uz primenu kartonskog šablona, na mestima gde će biti naneti ispitivani uzorci, izmerene su bazalne (inicijalne) vrednosti TEGV neinvazivnom sondom uređaja Tewameter® TM210 (Courage+Khazaka, Nemačka). TEGV je biofizički parametar koji meri gubitak vode kroz intaktni *stratum corneum*, na osnovu kojeg se može proceniti integritet kožne barijere.

Nakon toga, uz primenu istih kartonskih šablona plastičnim špricem naneti su ispitivani uzorci u količini od 5 mg/cm<sup>2</sup> i ravnomerno raspoređeni po definisanoj površini kože. Nakon 2h, višak preparata pažljivo je uklonjen sa kože pamučnim tuferima (uvek na isti način), i započeto je sukcesivno nanošenje i uklanjanje po 12 adhezivnih traka (D-

---

<sup>5</sup> Odluka br. 01-9337-13 od 3.11.2014.

Squame®, CuDerm, SAD) sa svakog test-mesta. Masa pojedinačnih traka je pre i posle primene izmerena na analitičkoj vagi Sartorius BP210D (Sartorius, Nemačka), kako bi se dobili podaci o masi uklonjenih korneocita (gravimetrijski pristup). Svaka adhezivna traka pojedinačno je postavljena na tretirano mesto na koži, nakon čega je na nju izvršen konstantan pritisak od 140 g/cm<sup>2</sup> uređajem na bazi opruge, u trajanju od 10 sekundi. Traka je zatim uklonjena pincetom i izmerena na analitičkoj vagi. Na prethodno opisan način uklonjeno je 12 slojeva *stratum corneum* sa svakog test-mesta. Merenje TEGV je ponovljeno nakon uklanjanja 4., 8. i 12. trake.

Svaka adhezivna traka posebno je preneti pincetom u kivete za centrifugiranje u koje je odmereno po 5 ml metanola, kao rastvarača za ekstrakciju. Pripremljene kivete su najpre podvrgnute sonifikaciji od 15 min na ultrazvučnom kupatilu Sonorex RK102H (Bandelin, Nemačka), a zatim centrifugiranju dobijenih eluata 5 min pri 4000 obrt/min (MPW-56, MPW Instruments, Poljska). Nakon toga, dobijeni rastvori su filtrirani kroz membranske filtre promera 0,45 µm, a zatim preneti u staklene epruvete sa zatvaračem, zbog isparljivosti primenjenog rastvarača za ekstrakciju.

Sadržaj usninske kiseline u dobijenim eluatima precizno je određen primenom ultra visokoeфикаsne tečne hromatografije sa masenom spektroskopijom (UHPLC-MS):

### ***Oprema***

- UHPLC sistem sa MS detektorom
- Accela sistem za automatsko uzorkovanje sa pratećom pumpom (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- TSQ Quantum Access MAX maseni detektor sa trostrukim kvadropolskim analizatorom sa izvorom elektrosprej jonizacije (ESI) (Thermo Fisher Scientific, SAD)

### ***Reagensi***

- acetonitril, LC-MS čistoće
- mravlja kiselina, LC-MS čistoće
- voda, HPLC čistoće
- azot visoke čistoće kao nebulizator u ESI izvoru
- argon kao fragmentacioni gas u Q2 ćeliji

### ***Hromatografski uslovi***

Kolona: Xterra MS C18 3,5 µm, 2,1x150 mm (Waters, Republika Irska).

Protok: 0,5 ml/min

Temperatura sistema za automatsko unošenje uzoraka: 10°C

Temperatura kolone: 25°C

Mobilna faza: acetonitril:0,1 % mravlja kiselina (80:20 V/V)

### ***III faza eksperimentalnog rada***

#### **3.1.2.8. *In vitro* procena antimikrobnog potencijala ispitivanih kremova**

Procena antimikrobnog potencijala odabrane formulacije APG i poredbenog krema sa ekstraktom izvršena je primenom već opisane *in vitro* mikrodilucione metode u bujonu (odeljak 3.1.2.3.1). na istim bakerijskim sojevima-izazivačima kožnih oboljenja. Sam eksperimentalni postupak izveden je kao što je napred opisano, s tom razlikom da su ispitivani kremovi rastvarani u DMSO uz zagrevanje na vodenom kupatilu do 60°C.

Na osnovu dobijenih vrednosti MIK za krem sa ekstraktom izračunate su teorijske MIK vrednosti usninske kiseline shodno njenom masenom udelu u emulziji, koje su zatim poređene sa vrednostima MIK za usninsku kiselinu *per se*, određenim u prvom delu studije.

#### **3.1.2.9. *In vivo* procena efekata ispitivanih kremova na koži**

Efekti razvijene podloge i/ili krema sa ekstraktom stabilizovanog APG emulgatorima, kao i odgovarajućih poredbenih uzoraka na koži procenjeni su primenom *in vivo* metoda bioinženjeringa kože. Pri tome, potencijal odgovarajućih podloga da utiču na tzv. nespecifične simptome kod infekcija kože (eritem, narušena barijerna funkcija kože) procenjena je *in vivo* merenjem EI i TEGV u 4-dnevnoj studiji na koži iritiranoj rastvorom natrijum-lauril sulfata, dok je evaluacija preliminarnog bezbednosnog profila (iritacionog potencijala) uzoraka kremova (krem podloge i kremovi sa ekstraktom) izvršena merenjem istih parametara i dodatno, merenjem EP kože kao mere vlažnosti *stratum corneum* u 24-h studiji pod okluzijom na normalnoj koži. Merenja biofizičkih parametara izvršena su

primenom aparata Multi Probe Adapter MPA<sup>®9</sup> (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Nemačka).

Uzimajući u obzir da su oba navedena ispitivanja sprovedena na ljudima, pre započinjanja studije dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu<sup>5</sup>. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, te su ispitanici pre početka eksperimenata detaljno informisani o mogućim efektima tretmana i pravilima ponašanja za vreme ispitivanja. Ispitanici su bili u obavezi da dva dana pre početka, kao i u toku ispitivanja, na tretirana područja kože ne nanose druge lekove ili kozmetičke proizvode za negu i čišćenje.

#### *3.1.2.9.1. In vivo procena efekata na nespecifične simptome infekcija kože*

Natrijum-laurilsulfat poznati je iritans kože, koji nakon dermalne aplikacije izaziva povećavanje TEGV i izaziva eritem (Tasić-Kostov, 2013). S tim u vezi, test sa natrijum-laurilsulfatom (engl. *sodium lauryl sulphate test, SLS test*) često se, u različitim eksperimentalnim protokolima, koristi za *in vivo* procenu antiiritantnih svojstava lokalnih preparata, odnosno procenu njihovog zaštitnog dejstva na barijernu funkciju kože (Engel i sar., 2008; Korponyai i sar., 2011).

U eksperimentima ove doktorske disertacije, SLS test poslužio je za procenu kapaciteta ispitivanih podloga da poprave barijernu funkciju kože narušenu infekcijom, odnosno utiču na eritem kože, kao jedan od njenih pratećih simptoma. Sam eksperimentalni postupak izvršen je na sledeći način (Arsić i sar., 2012): Jedanaest zdravih ispitanika (prosečne starosti  $22,55 \pm 1,75$ ) su, u skladu sa protokolom, pre početka merenja proveli najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je ispitivanje vršeno kako bi se adaptirali na kontrolisane atmosferske uslove (temperatura  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  i relativna vlažnost vazduha  $50 \pm 5\%$ ), nakon čega su izvršena merenja bazalnih vrednosti biofizičkih parametara (TEGV i EI) na volarnim stranama podlaktica, na test-mestima površine  $9\text{ cm}^2$ , definisanim pomoću kartonskih šablona. Nakon sprovedenih inicijalnih merenja, označena mesta su iritirana na sledeći način:  $50\ \mu\text{l}$   $10\%$  (V/V) rastvora SLS u vodi je pipetom nanoseno na parče filter papira ( $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ ), koje je zatim prislonjeno na kožu i prekriveno Parafilm<sup>®</sup>-om M (Brand, Nemačka) i zatim hipoalergijskim adhezivnim trakama (Sensifix<sup>®</sup>, Galenika,



Srbija). Iritacija je trajala 6 h, a njeni efekti su procenjeni ponovnim merenjima navedenih biofizičkih parametara, nakon 24 h od iritacije. Nakon toga, ispitanicima su date instrukcije da ispitivane uzorke (na mestu iritacije) nanose dva puta dnevno (ujutru i uveče), a merenja biofizičkih parametara su ponovljena 2. i 4. dana. Dva mesta na koži istog oblika, površine 9 cm<sup>2</sup> ostavljena su kao kontrolna i to: 1) netretirana iritirana kontrola, NIK (mesto koje je iritirano rastvorom SLS na gore opisani način, ali nije tretirano ispitivanim uzorcima) i 2) netretirana neiritirana kontrola, NNK (mesto koje nije iritirano rastvorom SLS, niti tretirano ispitivanim uzorcima).

#### *3.1.2.9.2. In vivo procena preliminarnog bezbednosnog profila/iritacionog potencijala*

Trinaest zdravih ispitanika (prosečne starosti 21,92±1,60) su, u skladu sa protokolom, pre početka merenja proveli najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je ispitivanje vršeno kako bi se adaptirali na kontrolisane atmosferske uslove (temperatura 23±1°C i relativna vlažnost vazduha 50±5 %), nakon čega su izvršena merenja bazalnih vrednosti biofizičkih parametara (EI, TEGV i EP) na volarnim stranama podlaktica, na test-mestima površine 9 cm<sup>2</sup>, definisanim pomoću kartonskih šablona. Nakon sprovedenih inicijalnih merenja, na označena mesta ravnomerno su naneti ispitivani uzorci (0,016 g/cm<sup>2</sup>), preko kojih je postavljena okluzija u vidu Parafilm®-a M (Brand, Nemačka), fiksirana hipoalergijskim adhezivnim trakama (SensifixR, Galenika, Srbija). Dva sata nakon uklanjanja 24-h okluzije, svi biofizički parametri su ponovo izmereni. Dva mesta na koži istog oblika, površine 9 cm<sup>2</sup> ostavljena su kao netretirana kontrola pod okluzijom, NKO (pri čemu je okluzija izvršena na već opisan način) i bez okluzije (NK). Ispitivanja su izvedena u skladu sa postupkom opisanim u nedavno objavljenom radu Tasic-Kostov i saradnika (2011b).

#### **3.1.2.10. Statistička obrada podataka**

Statistička analiza je izvedena pomoću programa OriginPro 9.0 (Electronic Arts, SAD) upotrebom Mann-Whitney U-testa, Student-ovog t-testa ili ANOVA testa, zavisno od prirode podataka (p<0,05). Parameteri *in vivo* merenja su procenjeni upotrebom jednofaktorske ANOVA-e ili ANOVA-e za ponovljena merenja, nakon čega je rađen Tukey-ev t-test ili Studentov t-test za nesparene uzorke, gde je to bilo potrebno.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

#### 4.1.1. Ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata talusa *U. barbata*

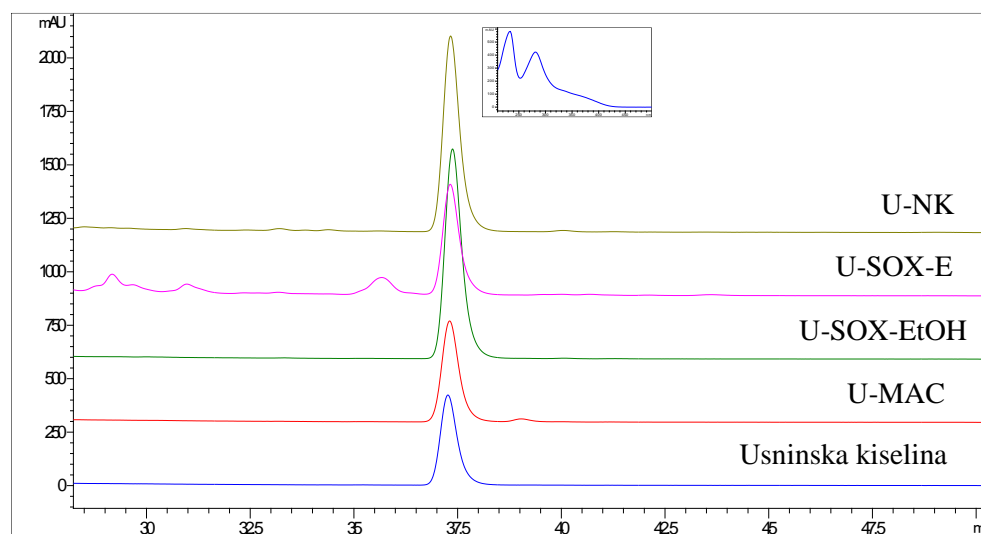
S obzirom na činjenicu da lišajevi stvaraju uglavnom sekundarne metabolite koji su fenolne prirode (Behera i sar., 2012), incijalni „*skrining*“ hemijskog profila ispitivanih ekstrakata sproveden je određivanjem sadržaja ukupnih fenola. Kao što se može videti u tabeli 7, sadržaj ukupnih fenola varirao je od 14,64 mg EGK/g SM u U-MAC do 164,42 mg EGK/g SM u U-NK. Najniži sadržaj ukupnih fenola detektovan je u ekstraktima pripremljenim upotrebom polarnog rastvarača-etanola, 70 % (V/V) (U-MAC) i 96 % (V/V) (U-SOX-EtOH), respektivno. Primetan rast sadržaja ukupnih fenola uočen je pri korišćenju nepolarnog dietil-etra kao ekstrakcionog sredstva (U-SOX-E), dok je njihov najviši sadržaj detektovan u ekstraktu dobijenom postupkom ekstrakcije natkritičnim CO<sub>2</sub>, U-NK (tabela 7).

**Tabela 7.** Rezultati hemijske analize (sadržaj ukupnih fenola, izražen kao mg EGK/g SM i sadržaj usninske kiseline, izražen kao % (m/m)) ispitivanih ekstrakata talusa *U. barbata*: ekstrakta dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarske frakcije ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u (U-SOX-E), etanolne frakcije ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u (U-SOX-EtOH) i ekstrakta dobijenog postupkom maceracije (U-MAC)

Oznaka ekstrakta	Sadržaj ukupnih fenola (mg EGK/g SM)	Sadržaj usninske kiseline (% (m/m))
U-NK	164,42	81,41
U-SOX-E	144,12	67,09
U-SOX-EtOH	25,70	2,43
U-MAC	14,64	1,39

Nakon utvrđivanja sadržaja ukupnih fenola, sprovedena je detaljna hemijska analiza upotrebom HPLC-a, koji je omogućio identifikaciju usninske kiseline kao glavnog fenolnog jedinjenja zastupljenog u svim ispitivanim ekstraktima (slika 5).

Kao i u slučaju ukupnih fenola, sadržaj usninske kiseline (tabela 7), bio je obrnuto proporcionalan polarnosti rastvarača korišćenog u procesu ekstrakcije (Jin i sar., 2013), te se može istaći da je U-NK bio ekstrakt sa najvišim sadržajem ovog derivata dibenzofurana.



**Slika 5.** HPLC hromatogrami ispitivanih ekstrakata talusa *U. barbata* (ekstrakta dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarske frakcije (U-SOX-E) i etanolne frakcije (U-SOX-EtOH) ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u i ekstrakta dobijenog postupkom maceracije (U-MAC)) i standarda usninske kiseline

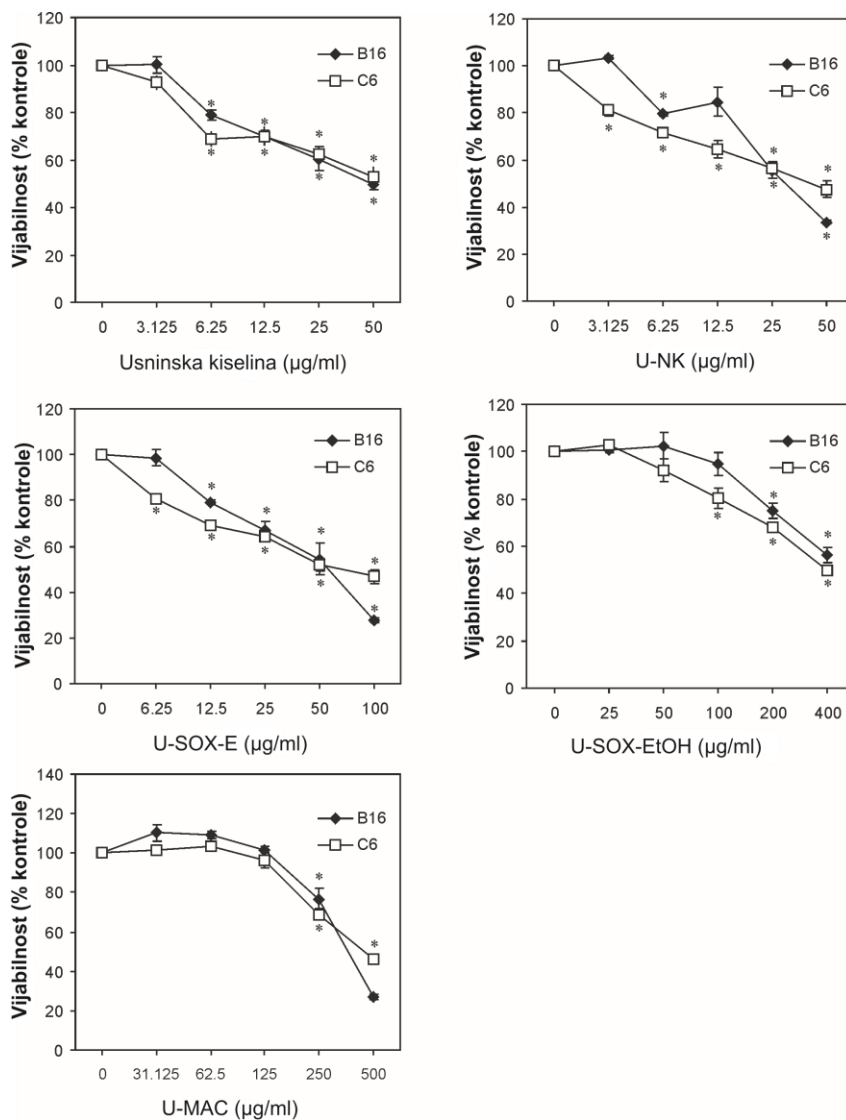
#### 4.1.2. Ispitivanje bioloških aktivnosti ekstrakata talusa *U. barbata*/usninske kiseline

Dalja ispitivanja bioloških aktivnosti obuhvatila su ekstrakte talusa *U. barbata* paralelno sa čistom usninskom kiselinom, kao glavnim hemijskim konstituentom identifikovanim u svim ispitivanim ekstraktima.

##### 4.1.2.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

Citotoksična aktivnost ekstrakta talusa *U. barbata* ispitana je na dve tumorske ćelijske linije (B16 mišji melanom i C6 pacovski gliom). Svi ispitivani ekstrakti su smanjivali vijabilnost ćelija obe ispitivane linije na dozno zavisani način (slika 6). Među njima, najjaču citotoksičnost je pokazao ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub>, U-NK (tabela 8), pri čemu je ćelijska linija B16 (IC<sub>50</sub> 31,21 µg/ml) bila osetljivija od C6 (IC<sub>50</sub> 43,40 µg/ml). Sa izuzetkom U-NK, za koji su utvrđene niže IC<sub>50</sub> vrednosti nego za čistu usninsku

kiselinu, citotoksična aktivnost ekstrakata bila je u dobroj korelaciji sa sadržajem ovog jedinjenja (tabela 7, tabela 8).



**Slika 6.** Dozno zavisna citotoksična aktivnost ekstrakata talusa *U. barbata* i usninske kiseline. B16 ćelije mišjeg melanoma i C6 ćelije pacovskog glioma su inkubirane sa različitim koncentracijama sledećih uzoraka: usninska kiselina i ekstrakti talusa *U. barbata* : ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarska frakcija (U-SOX-E) i etanolna frakcija (U-SOX-EtOH) ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC). Viabilnost ćelija procenjena je nakon 24 h, upotrebom testa kisele fosfataze (\*p<0,05 se odnosi na kontrolu-netretirane ćelije)

Naime, dietil-etarska frakcija ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u (U-SOX-E) pokazala je takođe jak citotoksičan efekat prema obe testirane ćelijske linije (tabela 8), ali je on bio srazmerno slabiji u odnosu na niži sadržaj usninske kiseline detektovan u ovom uzorku (67,09 % (m/m)). Prateći ovaj trend, etanolna frakcija ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u (U-SOX-EtOH) i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC) koji su sadržali znatno manje usninske kiseline (2,4 i 1,4 % (m/m), respektivno) ispoljili su slabu citotoksičnu aktivnost (tabela 8). Dodatno, svi ispitivani uzorci (ekstrakti i usninska kiselina) bili su značajno manje toksični prema nekancerskim ćelijama-HaCaT normalnim humanim keratinocitima, ukazujući na njihovu selektivnost prema tumorskim ćelijama (tabela 8).

**Tabela 8.** IC<sub>50</sub> vrednosti (izražene kao µg/ml) u ispitivanim tumorskim (B16 ćelije mišjeg melanoma i C6 ćelije pacovskog glioma) i netumorskim ćelijama (HaCaT normalni humani keratinociti) tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih uzoraka (ekstrakti talusa *U. barbata* (ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarska frakcija (U-SOX-E) i etanolna frakcija (U-SOX-EtOH) ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC)) i usninska kiselina)

Oznaka uzorka	IC <sub>50</sub> vrednosti za ispitivane ćelijske linije (µg/ml)		
	B16	C6	HaCaT
<b>U-NK</b>	31,21	43,40	278,75*
<b>U-SOX-E</b>	58,20	69,10	380,31*
<b>U-SOX-EtOH</b>	466,10*	395,60	543,44*
<b>U-MAC</b>	391,76	457,24	637,10*
<b>Usninska kiselina</b>	49,14	56,83*	232,98*

\* IC<sub>50</sub> vrednosti izvan opsega eksperimentalnih koncentracija

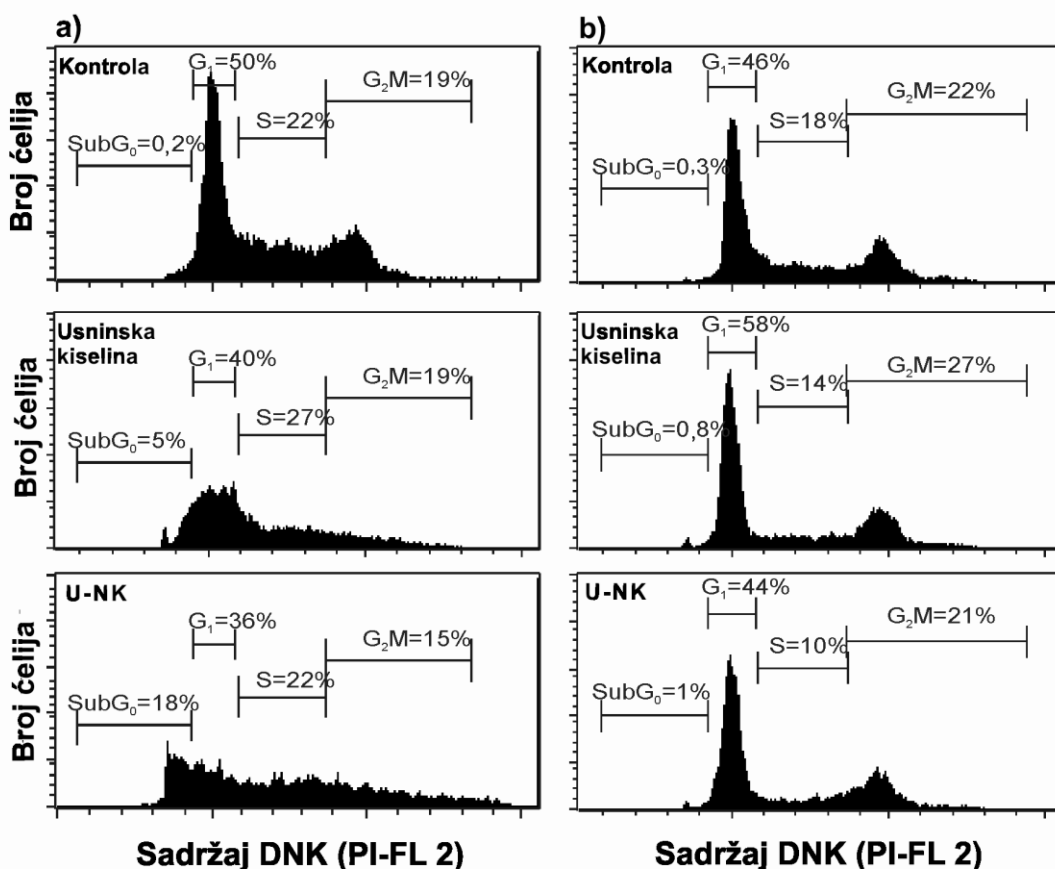
Na osnovu navedenih rezultata, može se pretpostaviti da se usninska kiselina, kao glavna komponenta identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima, može smatrati odgovornom za primećenu citotoksičnu aktivnost, dodatno uzimajući u obzir dobro dokumentovanu toksičnost ovog jedinjenja prema različitim tumorskim ćelijama, opisanu u literaturi proteklih decenija (Cardarelli i sar., 1997; Kristmundsdottir i sar., 2002; Toledo

Marante i sar., 2003; Bezivin i sar., 2004; Han i sar., 2004; Koparal i sar., 2006; Einarsdottir i sar., 2010; Ivanova i sar., 2010; Backorova i sar., 2011; Backorova i sar., 2012; Bessadottir i sar., 2012; Manojlovic i sar., 2012; Rankovic i sar., 2012; Brandao i sar., 2013; Brisdelli i sar., 2013). Sa druge strane, pokazano je da, u nekim slučajevima, ekstrakti mogu ispoljiti bolju biološku aktivnost od jedinjenja koja su identifikovana kao njihovi glavni hemijski konstituenti (Lopez i sar., 2011; Zizovic i sar., 2012). U našem istraživanju, nakon tretmana obe ispitivane tumorske ćelijske linije (B16 i C6) ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim pomoću natkritičnog CO<sub>2</sub>, nađene su niže IC<sub>50</sub> vrednosti u poređenju sa tretmanom čistom usninskom kiselinom. Stoga su dalja istraživanja sprovedena sa ciljem sticanja dubljeg uvida u mehanizme uključene u pokazanu citotoksičnu aktivnost ovog ekstrakta u odnosu na usninsku kiselinu.

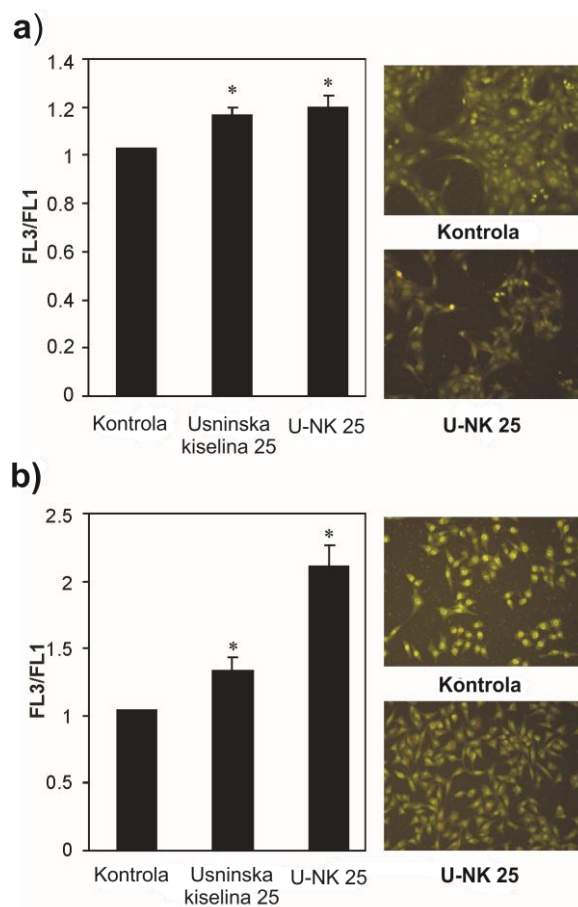
Analiza ćelijskog ciklusa otkrila je da je značajan broj B16 ćelija tretiranih ispitivanim uzorcima (U-NK i usninska kiselina) pokazao hipodiploidan sadržaj DNK, ukazujući na fragmentaciju DNK, odnosno apoptozu (slika 7a). Već je pokazano da usninska kiselina indukuje apoptozu u HeLa ćelijama humanog karcinoma cerviksa (Brisdelli i sar., 2013), HT-29 ćelijama humanog karcinoma debelog creva i A2780 ćelijama humanog karcinoma ovarijuma (Backorova i sar., 2012). Takođe, istraživanje Rankovica i saradnika (2012) ukazalo je na izraženu sposobnost acetonskog ekstrakta talusa *U. barbata* i čiste usninske kiseline da indukuju apoptozu u FemX ćelijama humanog melanoma i LS174 ćelijama humanog karcinoma debelog creva. Nasuprot ovome, nakon tretmana C6 ćelija usninskom kiselinom i ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), nije primećena nikakva promena ćelijskog ciklusa (slika 7b), ukazujući na činjenicu da u ovim tumorskim ćelijama apoptoza nije mehanizam odgovoran za ispoljene citotoksične efekte navedenih uzoraka.

Međutim, 24-h inkubacija ispitivanih ćelija (B16 i C6) sa oba testirana uzorka (usninska kiselina i U-NK) izazvala je masovno formiranje kiselih citoplazmatskih vezikula, koje predstavljaju morfološke karakteristike autofagije (slika 8). Poznato je da autofagija može imati dvostruku ulogu u antitumorskoj aktivnosti citotoksičnih lekova: 1) kao mehanizam koji omogućava kancerskim ćelijama da prežive, ili 2) kao alternativni mehanizam umiranja ćelija *per se* ili blisko spregnut sa apoptozom/nekrozom (Fimia i

Piacentini, 2009). Uzimajući u obzir prethodno diskutovane nalaze, čini se da je u ispitivanim tumorskim ćelijama autofagija imala različit doprinos ispoljenoj citotoksičnoj aktivnosti ekstrakta talusa lišaj brade dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK)/usninske kiseline. Naime, u slučaju B16 ćelija autofagija je mogla da posluži ili kao mehanizam koji sprečava apoptozu (Chen i sar., 2014) ili kao njen promoter (Fimia i Piacentini, 2009), dok je u C6 ćelijama delovala kao alternativni mehanizam ćelijske smrti (Fimia i Piacentini, 2009). S tim u vezi, autofagija, kao mehanizam ćelijske smrti, nedavno je opisana u dve tumorske ćelijske linije (T47D i MCF-7 ćelijama kancera dojke i Capan-2 ćelijama kancera pankreasa) tretiranih usninskom kiselinom (Bessadottir i sar., 2012).



**Slika 7.** Efekti ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) i usninske kiseline na ćelijski ciklus B16 (a) i C6 (b) ćelija. Brojevi na histogramu predstavljaju procenat ćelija u odgovarajućoj fazi ćelijskog ciklusa (sub G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub>M) nakon tretmana sa usninskom kiselinom (25 µg/ml) i najaktivnijim ekstraktom-U-NK (25 µg/ml)

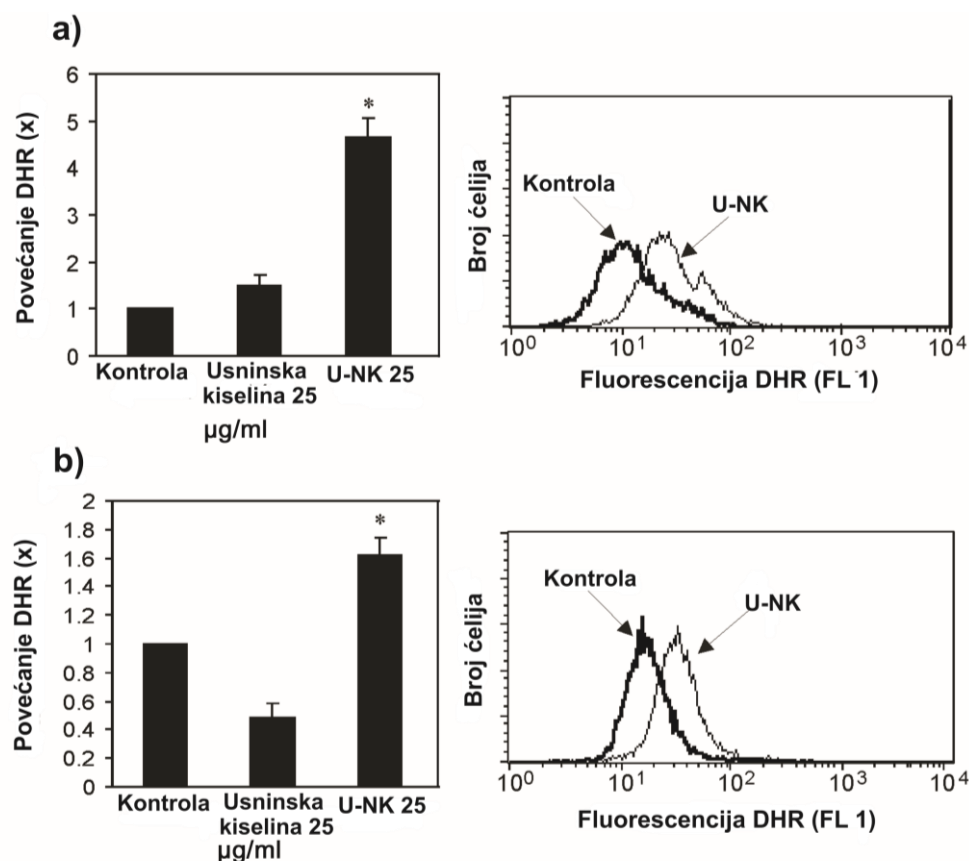


**Slika 8.** Efekti ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) i usninske kiseline na indukciju autofagije. Sa leve strane prikazana je intracelularna acidifikacija procenjena protočnom citometrijom, nakon bojenja sa akridin oranžom B16 (a) i C6 (b) ćelija i predstavljena je histogramima povećanja intenziteta fluorescencije nakon 24-h tretmana sa usninskom kiselinom (25 µg/ml) i U-NK (25 µg/ml). Sa desne strane, fluorescentne mikrofografije tumorskih ćelija obojenih akridin oranžom ukazuju na prisustvo kiselih citoplazmatskih vezikula u B16 (a) i C6 (b) ćelijama tretiranih najaktivnijim ekstraktom-U-NK (25 µg/ml) (\*p<0,05 se odnosi na kontrolu-netretirane ćelije)

Dalji eksperimenti otkrili su značajnu proizvodnju ROS u B16 ćelijama tretiranim najtoksičnijim ekstraktom talusa lišaj brade, U-NK (slika 9a). Isti ekstrakt indukovao je značajan oksidativni stres i u C6 ćelijama (slika 9b), ali je on bio manje izražen u poređenju sa onim detektovanim u B16 ćelijama. Suprotno ovome, usninska kiselina nije ni povećavala, niti smanjivala produkciju ROS u ispitivanim tumorskim ćelijama (slika 9), ukazujući na izostanak oksidativnog stresa u ispoljenoj citotoksičnosti ovog derivata dibenzofurana (Brisdelli i sar., 2013). Poznato je da oksidativni stres može doprineti



citotoksičnosti supstance putem nekoliko različitih mehanizama (Deavall i sar., 2012). Stoga, čini se logičnim pretpostaviti da razlike u ispoljenoj citotoksičnosti ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) i usninske kiseline u obe ispitivane ćelijske linije (IC<sub>50</sub> 31,21 vs. 49,14, za B16 i IC<sub>50</sub> 43,40 vs. 56,83 za C6) mogu biti u vezi sa različitim stepenom produkcije ROS. Ipak, potrebna su dodatna istraživanja koja bi potvrdila navedene pretpostavke i razjasnila tačan mehanizam uključen u citotoksičnost ispitivanog ekstrakta talusa *U. barbata* posredovanu ROS.



**Slika 9.** Efekti ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) i usninske kiseline na proizvodnju ROS. B16 (a) i C6 ćelije (b) inkubirane su sa U-NK (25 µg/ml) i usninskom kiselinom (25 µg/ml) i proizvodnja ROS je izmerena nakon 24 h protočnom citometrijom. Sa leve strane prikazano je relativno povećanje fluorescencije DHR (u poređenju sa kontrolom-netretiranim ćelijama) nakon tretmana ćelija sa U-NK i usninskom kiselinom (koncentracije su izražene u µg/ml, a \*p<0,05 se odnosi na kontrolu-netretirane ćelije). Sa desne strane prikazani su reprezentativni histogrami srednje fluorescencije DHR nakon 24-h tretmana sa U-NK i usninskom kiselinom (25 µg/ml)

Generalno, ekstrakt talusa *U. barbata* dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) pokazao je najjaču citotoksičnu aktivnost prema ispitivanim tumorskim linijama (B16 ćelije mišjeg melanoma i C6 ćelije pacovskog glioma), među svim ispitivanim uzorcima (ekstrakti talusa *U. barbata* i usninska kiselina). Svi ispitivani uzorci bili su značajno manje toksični prema netumorskim ćelijama-HaCaT normalnim humanim keratinocitima, ukazujući na određenu selektivnost ispoljene citotoksičnosti ka ćelijama kancera. Dodatna istraživanja nagovestila su da su isti mehanizmi (apoptoza i/ili autofagija) uključeni u ispoljenu citotoksičnost i U-NK i usninske kiseline. U daljnim eksperimentima, međutim, primećen je značajan porast ROS u obe ispitivane ćelijske linije nakon tretmana uzorkom U-NK, ali ne i usninskom kiselinom. Imajući na umu da oksidativni stres može doprineti citotoksičnoj aktivnosti, primećena razlika u IC<sub>50</sub> vrednostima ispitivanih ćelijskih linija nakon tretmana uzorkom U-NK i usninskom kiselinom može se objasniti barem kao funkcija različitog stepena proizvodnje ROS u ovim ćelijama.

#### **4.1.2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti**

Svi ispitivani ekstrakti i čista usninska kiselina ispoljili su antimikrobnu aktivnost protiv G<sup>+</sup> sojeva, dok je aktivnost protiv G<sup>-</sup> bakterija izostala (MIK vrednosti veće od 2560,00 µg/ml), što je u skladu sa nalazima drugih istraživača (Madamombe i Afolyan, 2003; Cansaran i sar., 2006; Weckesser i sar., 2007). MIK vrednosti protiv G<sup>+</sup> bakterija bile su obrnuto proporcionalne sadržaju usninske kiseline u ispitivanim ekstraktima (tabela 7, tabela 9).

Tačnije, među testiranim uzorcima, ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC) je pokazao najveću MIK vrednost (koja označava najslabiju antimikrobnu aktivnost) protiv testiranih bakterija, praćen ekstraktima dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u, U-SOX-EtOH (etanolna frakcija) i U-SOX-E (dietil-etarska frakcija) (tabela 9). Ekstrakt dobijen pomoću natkritičnog CO<sub>2</sub> (U-NK) ispoljio je najbolju antimikrobnu aktivnost među ispitivanim ekstraktima, sa istim MIK vrednostima kao čista usninska kiselina, pri čemu su klinički izolati *S. epidermidis* i *E. faecalis* pokazali najveću osetljivost među testiranim sojevima bakterija (tabela 9). Nasuprot ovome, ampicilin, korišćen kao pozitivna kontrola, nije inhibirao rast većine ispitivanih bakterija, sa izuzetkom kliničkog izolata *E. faecalis*

protiv kojeg je pokazao bolju aktivnost od usninske kiseline/U-NK. Dodatno, ampicilin je, za razliku od usninske kiseline i svih ekstrakata talusa *U. barbata*, ispoljio antimikrobnu aktivnost protiv G- *E. coli* (tabela 9).

**Tabela 9.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK vrednosti, izražene u µg/ml) ispitivanih uzoraka: ekstrakata talusa *U. barbata* (ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarska frakcija (U-SOX-E) i etanolna frakcija (U-SOX-EtOH) ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC)), usninske kiseline i ampicilina (pozitivna kontrola)

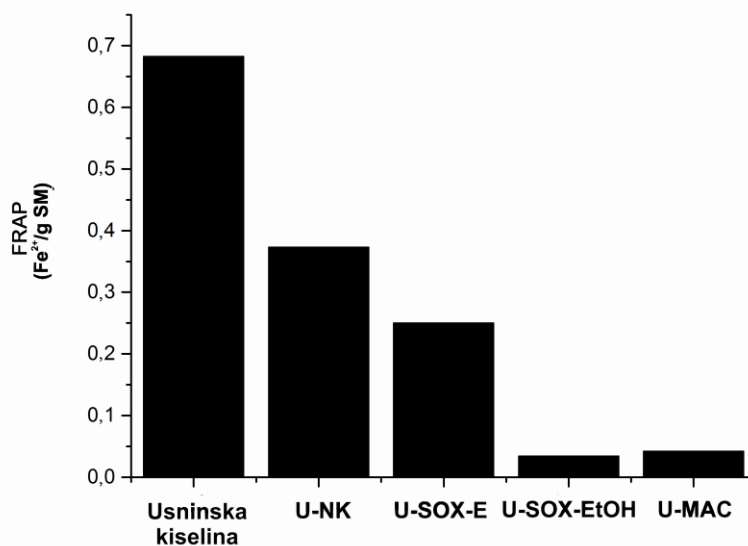
Oznaka uzorka	MIK (µg/ml)					
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 33591	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> (KI)	<i>E. faecalis</i> (KI)	<i>K. pneumoniae</i> (KI)	<i>E. coli</i> ATCC 25922
U-NK	10,00	5,00	1,25	2,50	-	-
U-SOX-E	40,00	20,00	5,00	5,00	-	-
U-SOX-EtOH	320,00	320,00	40,00	160,00	-	-
U-MAC	640,00	320,00	160,00	320,00	-	-
Usninska kiselina	10,00	5,00	1,25	2,50	-	-
Ampicilin	-	-	-	0,25	-	2,00

#### 4.1.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Poznato je da se antioksidativna aktivnost ne može proceniti upotrebom jednog testa i stoga su, u ovom istraživanju, korišćena dva uobičajena *in vitro* ispitivanja, koja se međusobno razlikuju u principima rada (Zugic i sar., 2014).

Jedna od metoda koja je korišćena za određivanje antioksidativnog potencijala ispitivanih uzoraka bila je neutralizacija DPPH radikala. Princip ove metode leži u reakciji antioksidansa sa slobodnim DPPH (ljubičasto obojeni rastvor), u kojoj dolazi do doniranja vodonikovog atoma i nastanka DPPH-H (bistri rastvor), pri čemu stepen obezbojenja odgovara antioksidativnom potencijalu (Milutinovic i sar., 2013). U eksperimentima ove

doktorske disertacije, nijedan od ispitivanih ekstrakata, kao ni usninska kiselina nisu pokazali aktivnost „hvatanja“ DPPH radikala (rezultati nisu prikazani). BHT, korišćen kao referentni antioksidans, pokazao je IC<sub>50</sub> vrednost određenu DPPH testom od 11,2 µg/ml. Nasuprot navedenim nalazima, u istraživanju Rankovica i saradnika (2012) acetonski ekstrakt talusa *U. barbata*, kao i čista usninska kiselina, pokazali su antioksidativnu aktivnost primenom istog (DPPH) testa. Sa druge strane, nekoliko studija koje su ispitivale antioksidativnu aktivnost usninske kiseline pokazale su da ovaj derivat dibenzofurana nema sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala, bez obzira na svoju fenolnu prirodu, ukazujući na nedostatak labilnog vodonikovog atoma u molekulu ovog jedinjenja (Atalay i sar., 2011; Brisdelli i sar., 2013; White i sar., 2014).



**Slika 10.** Antioksidativna aktivnost određena FRAP testom (FRAP vrednosti su izražene u mmol Fe<sup>2+</sup>/g SM) ispitivanih uzoraka: usninske kiseline i ekstrakata talusa *U. barbata*: ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), dietil-etarska frakcija (U-SOX-E) i etanolna frakcija (U-SOX-EtOH) ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u-i ekstrakt dobijen postupkom maceracije (U-MAC)

Druga metoda korišćena za procenu antioksidativne aktivnosti bio je FRAP test, koji meri kapacitet supstance da redukuje oksidativne vrste pomoću transfera elektrona, uz promenu boje (određene spektrofotometrijski), pri čemu je stepen promene boje

proporcionalan koncentraciji supstance (Milutinovic i sar., 2013). Rezultati FRAP testa predstavljeni su na slici 10, na kojoj se jasno može uočiti tendencija ka grupisanju ispitivanih ekstrakata u skladu sa sadržajem usninske kiseline (tabela 7) i antioksidativne aktivnosti (FRAP vrednosti). Naime, ekstrakt dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), koji je sadržao najviše usninske kiseline (81,41 % (m/m)), pokazao je najbolji antioksidativan potencijal sa FRAP vrednošću skoro dva puta većom od dietil-etarske frakcije ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u, U-SOX-E (67,09 % (m/m) usninske kiseline), uz drastično smanjenje antioksidativne aktivnosti (FRAP vrednosti) etanolne frakcije istog ekstrakta, U-SOX-EtOH i ekstrakta dobijenog postupkom maceracije, U-MAC (2,4 i 1,4 % (m/m) usninske kiseline, respektivno). Uočena zavisnost sadržaja usninske kiseline i antioksidativne aktivnosti pokazane FRAP testom u skladu su sa mnogim istraživanjima koja su opisala visoku korelaciju sadržaja fenolnih jedinjenja i FRAP vrednosti (Ahmad i sar., 2010; Iqbal i sar., 2012). S tim u vezi, FRAP vrednost čiste usninske kiseline bila je očekivano veća u odnosu na U-NK (slika 10) i može se smatrati umerenom u poređenju sa BHT, koji je korišćen kao referentni antioksidans (FRAP vrednost 1,35 mmol Fe<sup>2+</sup>/g SM). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima Rankovica i saradnika (2012) koji su, doduše, koristili test redukujuće moći uz upotrebu askorbinske kiseline kao pozitivne kontrole.

Eksperimenti prve faze pokazali su najviši sadržaj usninske kiseline u ekstraktu talusa *U. barbata* koji je dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), što je dalje u vezi i sa najboljom aktivnošću upravo ovog ekstrakta u svim ispitivanjima bioloških svojstava. Naime, U-NK je bio najaktivniji u testovima citotoksičnosti na tumorskim ćelijama (B16 mišji melanom i C6 pacovski gliom), kao i u ispitivanju antimikrobnog potencijala protiv bakterija koje izazivaju infekcije kože i testovima antioksidativne aktivnosti. Važno je spomenuti da je u navedenim istraživanjima nađena visoka korelacija sadržaja usninske kiseline u ekstraktima i ispoljene citotoksične, antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, potvrđujući time literaturne navode o posredničkoj ulozi ovog sekundarnog metabolita u biološkim svojstvima *U. barbata*. Štaviše, u ispitivanjima citotoksičnosti na tumorskim ćelijama, U-NK je pokazao bolju aktivnost i od čiste usninske kiseline, a dalja ispitivanja

pokazala su da je ovakav rezultat u vezi sa oksidativnim stresom koji ovaj ekstrakt (nasuprot usninskoj kiselini) izaziva u ispitivanim ćelijama.

Dodatno, na osnovu najboljeg odnosa antimikrobnog potencijala protiv bakterija koje su izazivači infekcija kože (MIK od 1,25 do 10,00  $\mu\text{g/ml}$ ) i citotoksičnosti prema HaCaT humanim keratinocitima ( $\text{IC}_{50}$  278,75  $\mu\text{g/ml}$ ), ekstrakt talusa *U. barbata* dobijen ekstrakcijom natkritičnim  $\text{CO}_2$  odabran je za sledeće faze istraživanja ove doktorske disertacije, koje su obuhvatile njegovo inkorporiranje u emulzionu podlogu tipa hidrofilnog krema (na bazi APG emulgatora), uz variranje postupka izrade/koncentracije, nakon čega su razvijene formulacije kremova podvrgnute evaluaciji fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika, kao i *in vitro/in vivo* proceni efikasnosti i iritacionog potencijala (preliminarnog profila bezbednosti primene na humanoj koži).

## 4.2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

### 4.2.1. Preformulaciona studija ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub>

Ispitivanje rastvorljivosti ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) otkrilo je njegovu slabu rastvorljivost u vodi. Rastvorljivost u trigliceridima srednje dužine lanca je takođe bila mala, ali ipak oko 10 puta veća u odnosu na rastvorljivost u vodi, ukazujući na veći afinitet U-NK ka uljanoj fazi, što je dodatno potvrđeno određenim particionim koeficijentom (tabela 10). Uporediva rastvorljivost nađena je i za čistu usninsku kiselinu (The Merck Index, 1983; PubChem Substance, 2015), ukazujući na činjenicu da ona utiče na rastvorljivost U-NK, što je bilo očekivano, s obzirom na njen visok sadržaj u ovom ekstraktu (81,40 % (m/m)).

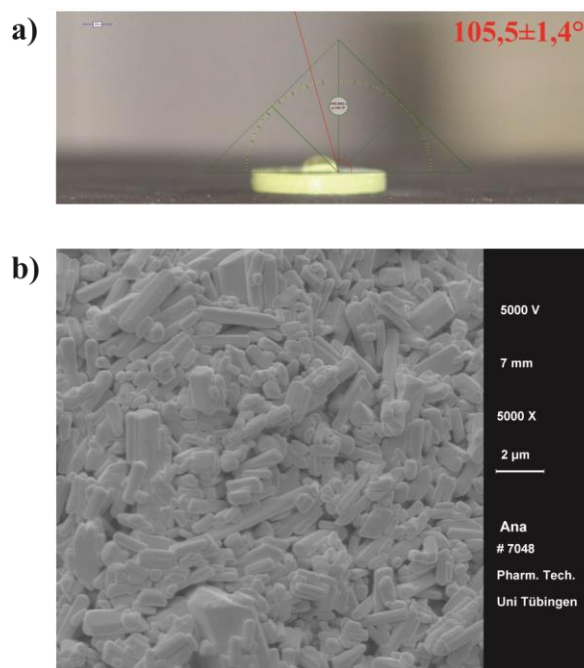
**Tabela 10.** Rezultati preformulacione studije ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK): rastvorljivost u vodi i nepolarnim rastvaračima, izražena kao g/100 ml (TG-trigliceridi srednje dužine lanca) i particioni koeficijent (izražen kao log P), u poređenju sa usninskom kiselinom (literaturni podaci (\*The Merck Index, 1983; \*\*PubChem Substance, 2015))

Fizička osobina	U-NK	Usninska kiselina
Rastvorljivost u vodi (g/100ml)	0,0016±0,0007	<0,01*
Rastvorljivost u nepolarnim rastvaračima (g/100ml)	0,017±0,003 <sub>TG</sub>	0,88* <sub>etil-acetat</sub>
Particioni koeficijent (log P)	0,17±0,01 <sub>TG/voda</sub>	2,88** <sub>oktanol/voda</sub>

Izmereni kontaktni ugao (slika 11a) potvrdio je hidrofobnu prirodu U-NK, u isto vreme ukazujući na potencijal čestica ovog ekstrakta za uređenjem na granici faza ulje-voda (Binks i Clint 2002; Aveyard i sar., 2003). SEM mikrografije U-NK otkrile su prisustvo igličastih kristala mikrometarske veličine, sa naglašenom tendencijom ka agregaciji (slika 11b).

U skladu sa nalazima preformulacione studije, osmišljena su dva postupka za inkorporiranje U-NK u podlogu stabilizovanu APG emulgatorima: suspendovanje U-NK u

gotovu podlogu (S uzorci) i dispergovanje U-NK u masnu fazu krema, pre mešanja sa vodenom fazom (D uzorci). Kao što je već rečeno, dalja istraživanja su sprovedena sa ciljem ispitivanja koloidne strukture i fizičko-hemijske stabilnosti obe grupe ispitivanih uzoraka kremova sa ekstraktom (U-NK), međusobno i u odnosu na odgovarajuću podlogu stabilizovanu APG emulgatorima.



**Slika 11.** Rezultati preformulacione studije ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK): a) kontaktni ugao (izražen kao °) i b) SEM mikrografija

## 4.2.2. Ispitivanja kremova stabilizovanih APG emulgatorima

### 4.2.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija kremova stabilizovanih APG emulgatorima

#### 4.2.2.1.1. Polarizaciona i fluorescentna mikroskopija

Nakon izrade, podloga stabilizovana APG emulgatorima (M) bila je polučvrste konzistencije (konzistencije mekog krema) i bele boje. Fluorescentna mikrografija ovog uzorka otkrila je prisustvo uljanih kapi uniformno dispergovanih u kontinualnoj fazi (slika 12a). Analizom uzorka M upotrebom polarizacione mikroskopije (slika 12b) uočene su tipične anizotropne strukture, kao što su deformisani Malteški krstovi, kao i prisustvo

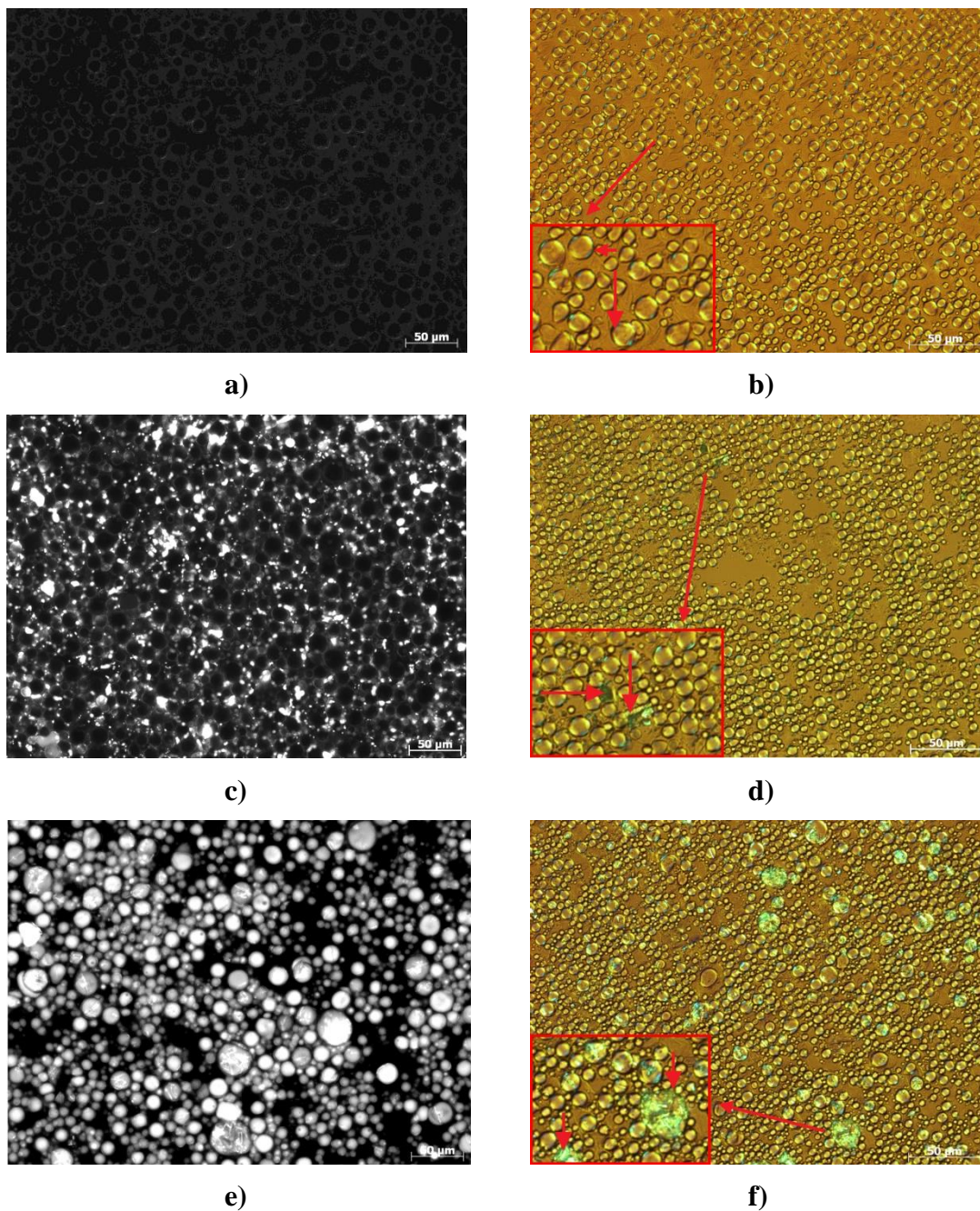


regiona velikog viskoziteta koji poput koncentričnih krugova okružuju kapi unutrašnje faze, ukazujući na prisustvo lamelarne faze oba tipa: (1) fluidnije *lamelarne tečnokristalne faze*, koja okružuje uljane kapi i (2) rigidnije *lamelarne gel faze ( $\alpha$ -kristalne gel faze)*, koja je, polazeći sa površine uljanih kapi, nasumično orijentisana u kontinualnoj fazi (Savic i sar., 2005; Lukic i sar., 2013).

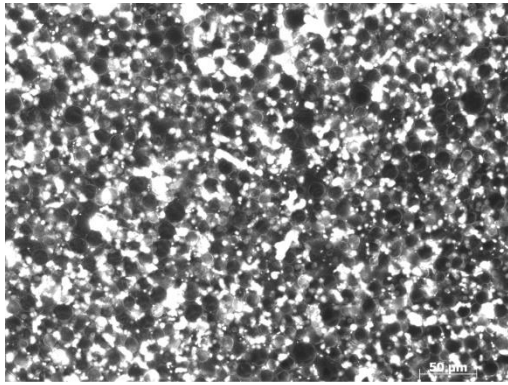
Kremovi sa ekstraktom bili su žukaste boje i različite konzistencije u zavisnosti od koncentracije U-NK i/ili postupka izrade. Na slikama 12 c-f, koje prikazuju mikrografije uzoraka sa najnižom koncentracijom U-NK, jasno se može razlikovati drugačija distribucija ekstrakta u S i D uzorku, pri čemu je ova razlika naročito vidljiva na fluorescentnim mikrografijama. U-NK se može videti izvan uljanih kapi u uzorku M1S, dok je u uzorku M1D ekstrakt očekivano prisutan uglavnom u njihovoj unutrašnjosti. Međutim, pažljivim posmatranjem snimljenih mikrografija primećeno je da je u ovom uzorku manji deo U-NK takođe izvan uljanih kapi, bez obzira na činjenicu da je tokom izrade ekstrakt dispergovan u masnoj fazi krema (slika 12f). Daljom analizom fluorescentnih/polarizacionih mikrografija dodatno je utvrđena i uniformnija distribucija uljanih kapi u uzorku M1S u odnosu na M1D (slika 12c-f). Takođe, krupnije uljane kapi sa dispergovanim ekstraktom u uzorku M1D pokazale su manje izraženo svojstvo dvostrukog prelamanja polarizovane svetlosti (engl. *birefringence*) na svojim ivicama (slika 12f). Trend nehomogene distribucije uljanih kapi, praćen redukcijom anizotropije na njihovom obodu bio je još više naglašen u uzorku M2D, a naročito u uzorku M4D (slika 12i,j,m,n). U ovom uzorku, mogu se videti klasteri U-NK u velikim uljanim kapima sa periodičnim anizotropnim strukturama u kontinualnoj fazi (slika 12n). U uzorcima M2S i M4S (slika 12g,h,k,l) uočen je isti način distribucije U-NK opisan za S uzorak sa najnižim sadržajem ekstrakta (M1S), koji je, očekivano, bio proporcionalan njegovoj koncentraciji u navedenim uzorcima.

Poznato je da emulzioni sistemi koji sadrže nejonske mešane emulgatore postižu svoju konačnu unutrašnju strukturu u toku nekoliko nedelja (Eccleston, 1997; Jaksic i sar., 2012). Stoga je mikroskopska analiza ponovljena nakon 30 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi. Takođe, bilo je od značaja proceniti potencijal APG emulzione podloge da rastvori inicijalno dodati U-NK, čiji su igličasti kristali uočeni u svim kremovima sa ovim ekstraktom (slika 12d,f,h,j,l,n), bez obzira na njegovu koncentraciju i način inkorporiranja.

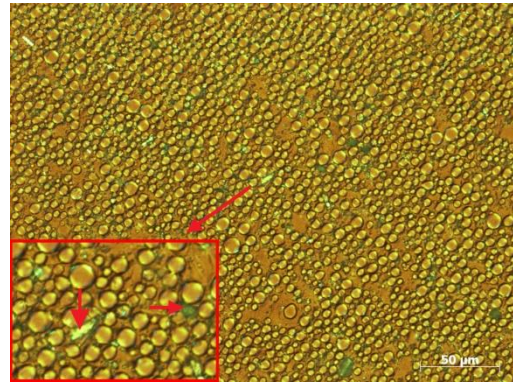
Međutim, nisu uočene značajne promene u mikrografijama snimljenim nakon 30 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi (podaci nisu prikazani). Ipak, dalja istraživanja su sprovedena sa ciljem utvrđivanja uticaja prisustva kristala U-NK u testiranim kremovima na njihovu koloidnu strukturu i fizičku stabilnost (McClements, 2012).



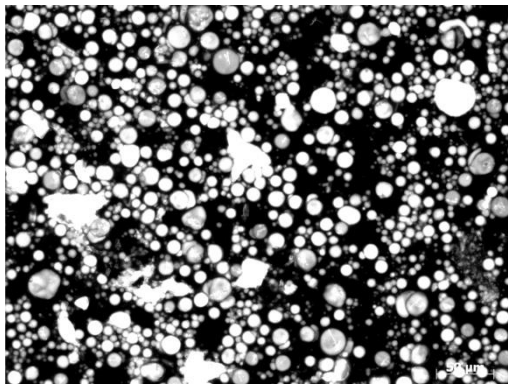
Slika 12. (legenda na sledećoj strani)



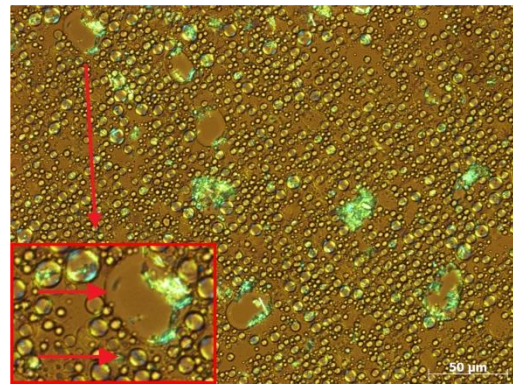
**g)**



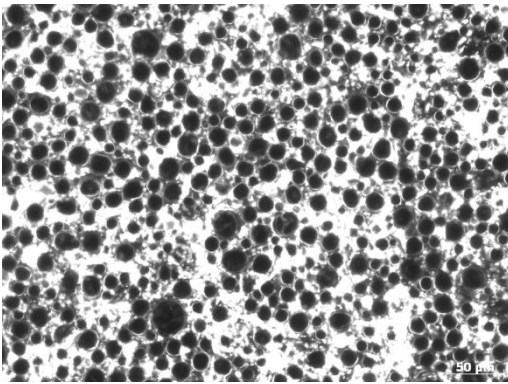
**h)**



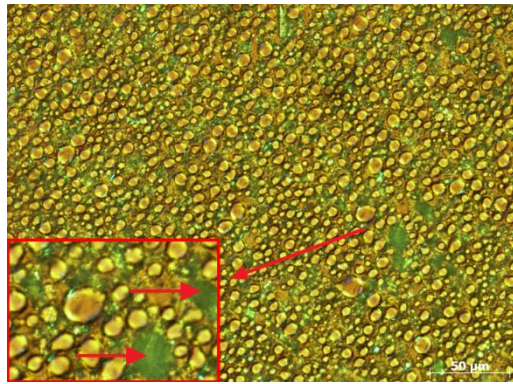
**i)**



**j)**

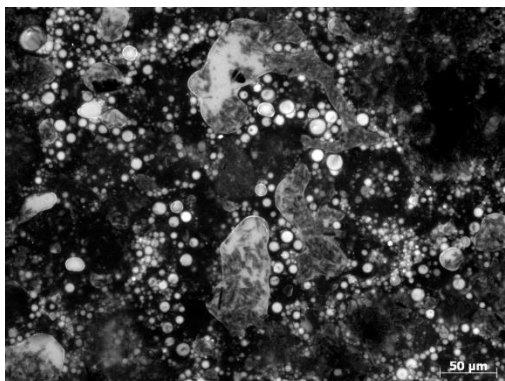


**k)**

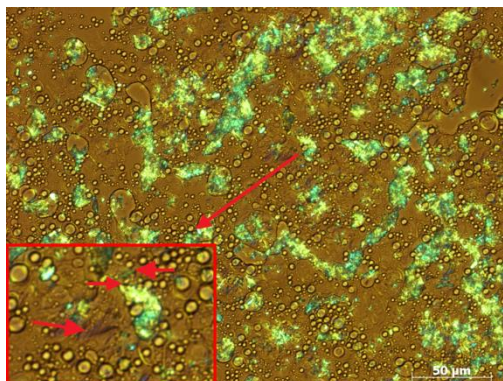


**l)**

**Slika 12.** (legenda na sledećoj strani)



m)



n)

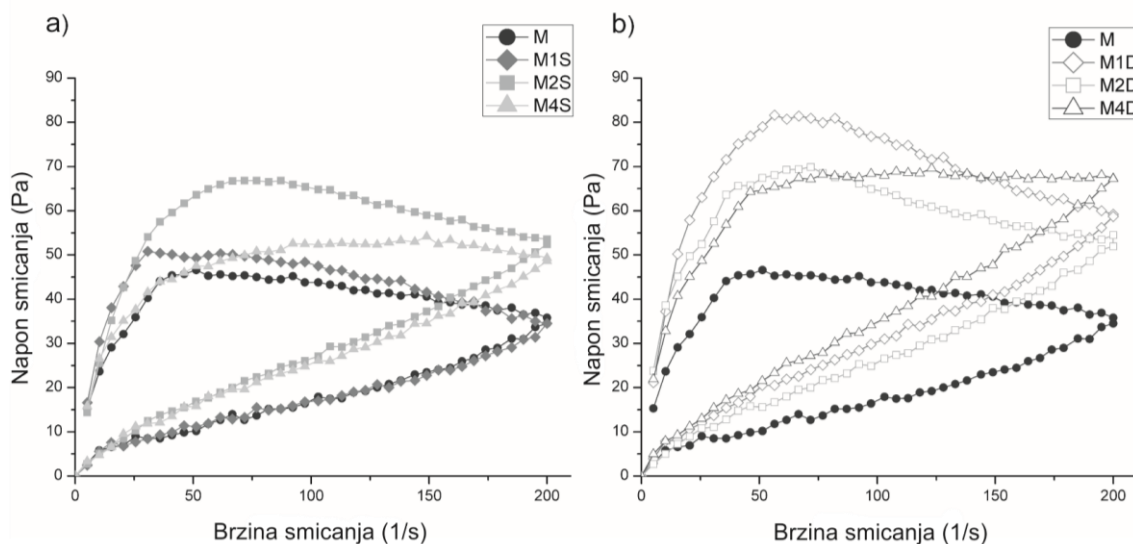
**Slika 12.** Fluorescentne (FM) i polarizacione (PM) mikrografije (200 x) emulziona podloge stabilizovane APG emulgatorima: a) M (FM), b) M (PM); kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulziona podlogu (c–d): c) M1S (FM), d) M1S (PM) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (e–f): e) M1D (FM), f) M1D (PM); kremova sa U-NK (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulziona podlogu (g–h): g) M2S (FM), h) M2S (PM) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (i–j): i) M2D (FM), j) M2D (PM) i kremova sa U-NK (koji odgovara sadržaju od 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulziona podlogu (k–l): k) M4S (FM), l) M4S (PM) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (m–n): m) M4D (FM) i n) M4D (PM)

#### 4.2.2.1.2. Reološka merenja

Svi ispitivani uzorci (slika 13) pokazali su pseudoplastični tip tečenja (engl. *shear-thinning flow behavior*). Ovakvo reološko ponašanje (umerena tiksotropija sa ne tako visokim vrednostima prinosnog napona) smatra se poželjnim za preparate koji se primenjuju na koži, jer ukazuje na njihove dobre aplikativne karakteristike, odnosno dobru razmazivost i formiranje kontinuiranog filma koji se dobro zadržava na površini kože (Savić, 2004; Lukic i sar., 2014).

Dodatak U-NK uslovio je da se krive tečenja pomere ka višim vrednostima prinosnog napona i histerezne površine u svim ispitivanim kremovima u odnosu na odgovarajuću podlogu-uzorak M (slika 13), ali je ovaj fenomen bio generalno više izražen u uzorcima dobijenim dispergovanjem U-NK u masnoj fazi APG krema (D uzorci) u odnosu na one u kojima je ekstrakt suspendovan u gotovu APG podlogu (S uzorci). Ovakvi nalazi su u

saglasnosti sa rezultatima Baudonneta i saradnika (2004), koji su primetili slično reološko ponašanje prilikom dva načina inkorporiranja salicilne kiseline (kao model supstance slabe rastvorljivosti u vodi) u podlogu sa APG emulgatorom.



**Slika 13.** Krive tečenja kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) a) suspendovanim u APG emulziona podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i b) dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M), 7 dana nakon izrade

Dodatno, krive tečenja obe grupe kremova sa U-NK (S i D) ukazale su na očigledan uticaj koncentracije ekstrakta na koloidnu strukturu ispitivanih emulzionih sistema (slika 13). U grupi S uzoraka, dodatak U-NK u najnižoj koncentraciji (uzorak M1S) praktično nije uticao na reološko ponašanje podloge stabilizovane APG emulgatorima (slika 13a). Isto se ne može reći za višu koncentraciju ekstrakta u M2S, koja je dovela do pomeranja prinosnog napona ka višim vrednostima, uz primetno povećanje histerezne površine (slika 13a). Međutim, dalje povećanje koncentracije ekstrakta u uzorku M4S dovelo je do obrnutog trenda u reološkom ponašanju kremova grupe S (slika 13a). Porast histerezne površine i prinosnog napona u uzorku M2S u odnosu na M i M1S, praćen njihovim smanjenjem u M4S, potencijalno se može pripisati interakciji U-NK sa nosačem tj. njegovom uključivanju u osnovni mehanizam stabilizacije emulzionog sistema u datoj

koncentraciji ekstrakta, koja dovodi do njegovog kompleksnog strukturiranja (Jaksic i sar., 2012). Sa druge strane, reološki profil M4S ukazuje na moguće narušavanje koloidne strukture u ovom uzorku, koja je verovatno u vezi sa slabljenjem formiranih lamelarnih mezofaza u prisustvu čestica ekstrakta u najvišoj koncentraciji (koja odgovara sadržaju od 4 % (m/m) usninske kiseline).

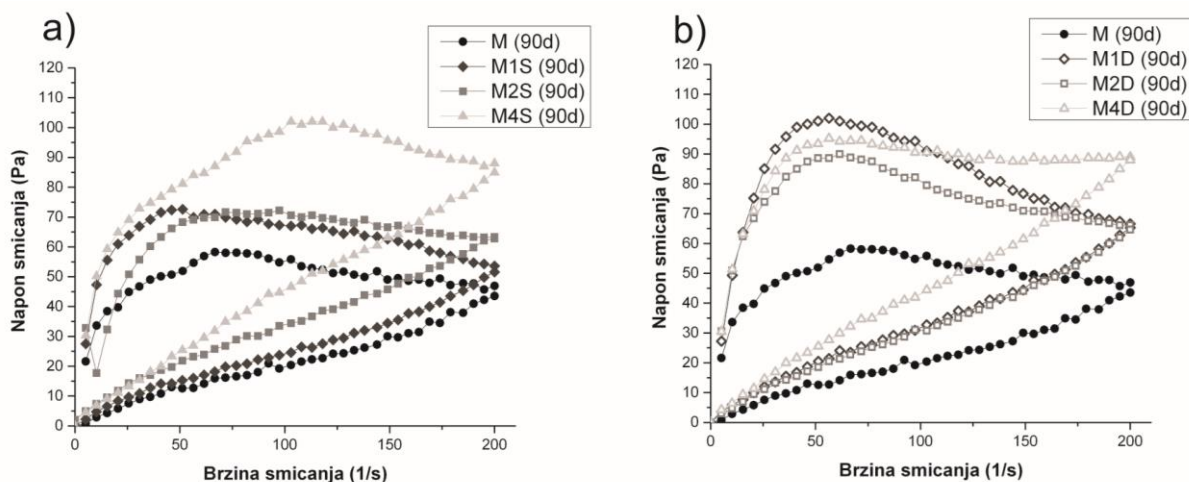
Vrednosti minimalnog prividnog viskoziteta  $\eta_{\min}$  pratile su trend navedenih reoloških promena u S uzorcima u skladu sa porastom koncentracije ekstrakta (tabela 11). Isto se ne može reći za vrednost maksimalnog prividnog viskoziteta  $\eta_{\max}$ , koja je iznenađujuće, među svim kremovima S serije, bila najniža u uzorku M2S (tabela 11).

**Tabela 11.** Parametri kontinualne reologije 7 dana nakon izrade kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M): minimalni prividni viskozitet,  $\eta_{\min}$ , (izražen u Pa·s, snimljen na brzini smicanja od 200,0 1/s) i maksimalni prividni viskozitet,  $\eta_{\max}$  (izražen u Pa·s, snimljen na brzini smicanja od 5,1 1/s)

Oznaka uzorka	$\eta_{\min}$ (Pa·s)	$\eta_{\max}$ (Pa·s)
M	0,179±0,001	2,98±0,09
M1S	0,172±0,011	3,23±0,04
M2S	0,268±0,015	2,82±0,13
M4S	0,246±0,002	3,07±0,02
M1D	0,296±0,022	4,11±0,02
M2D	0,272±0,005	4,63±0,01
M4D	0,336±0,018	4,27±0,01

Nasuprot S uzorcima, u grupi D uzoraka najviši prinosni napon i najveća vrednost histerezne površine detektovani su u kremu sa najnižim sadržajem U-NK i *vice versa* (slika 13b). Smanjenje oba reološka parametra sa povećanjem koncentracije U-NK može se

pripisati većem polidisperzitetu uljanih kapi, zajedno sa slabije izraženom anizotropijom (kao merom prisustva lamelarne mezofaze) na njihovoj ivici, primećenim primenom fluorescentne i polarizacione mikroskopije (Baudonnet i sar., 2004; Niraula i sar., 2004). Vrednosti minimalnog ( $\eta_{\min}$ ) i maksimalnog prividnog viskoziteta ( $\eta_{\max}$ ) nisu bile u saglasnosti sa navedenim promenama prinosnog napona i histerezne površine u D uzorcima, shodno promeni koncentracije ekstrakta (tabela 11).



**Slika 14.** Krive tečenja: kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) a) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i b) dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M), 90 dana nakon izrade

Poznato je da promene reoloških osobina mogu ukazati na nestabilnost kremova. Stoga, ponovljena reološka merenja mogu poslužiti kao jednostavna i pogodna eksperimentalna metoda za procenu stanja emulzionog sistema kao funkcije vremena skladištenja (Derkach, 2009). U poređenju sa inicijalnim merenjem (7 dana nakon izrade uzoraka), krive proticanja uzorka svih kremova sa U-NK snimljene nakon 90 dana čuvanja na sobnoj temperaturi pomerene su ka višim vrednostima, uz odgovarajuće povećanje histerezne površine (slika 14). Uzimajući u obzir da je isti trend uočen i u slučaju same APG podloge (M), navedene promene (ugušćivanje uzoraka) delimično se mogu pripisati naknadnom strukturiranju emulzionog sistema, što je poznata karakteristika kremova stabilizovanih nejonskim mešanim emulgatorima, detaljno definisana od strane Eccleston

(1997). Ipak, primetno veći rast histerezne površine u odnosu na APG podlogu (M) detektovan je u uzorcima M4S i M4D (slika 14a,b), što se potencijalno može dovesti u vezu sa nezadovoljavajućom fizičkom stabilnošću i/ili aplikativnim osobinama kremova sa najvišom koncentracijom ekstrakta (koji odgovara sadržaju od 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji), bez obzira na način njegovog inkorporiranja.

Mikrografije ispitivanih uzoraka kremova sa U-NK otkrile su razlike u njihovoj koloidnoj strukturi u zavisnosti od načina inkorporiranja ovog ekstrakta i/ili njegove koncentracije, koje su dodatno podržane nalazima reološke analize. U cilju identifikacije tačne lokalizacije ekstrakta u ovim kompleksnim sistemima i time dobijanja dodatnih informacija o njihovoj koloidnoj strukturi, u daljim istraživanjima korišćena je Raman spektralna mikroskopija.

#### *4.2.2.1.3. Raman spektralna mikroskopija*

Kao što se može videti sa Raman mikrografije prikazane na slici 15a, u S uzorcima ekstrakt je uočen uglavnom na ivicama uljanih kapi, a naročito u oblastima gde su primećeni prekidi ili potpuno odsustvo tečnokristalnih lamela. Dodatno, primećena je i adsorpcija U-NK na formiranu lamelarnu mezofazu na granici faza ulje-voda, kao i u kontinualnoj fazi (slika 15a). Uzimajući u obzir nalaze preformulacione studije U-NK, ovakva lokalizacija ekstrakta može se dovesti u vezu sa međupovršinskom aktivnošću njegovih čestica između kontinualne i dispergovane faze, sa jedne i interakcijama između čestica ekstrakta i formiranih lamelarnih mezofaza, sa druge strane. Naime, imajući u vidu rezultate merenja kontaktnog ugla i SEM mikrografije U-NK (slika 11), logično je pretpostaviti da, nakon dodatka ovog ekstrakta u gotovu podlogu, njegove čestice međusobnom interakcijom (agregacijom) učestvuju u formiranju partikularnog sloja na granici faza ulje-voda, slično onom opisanom za suvi ekstrakt kore breze (Daniels i Grysko, 2010; Grysko i Daniels, 2013), premošćavajući na taj način praznine u lamelarnom tečnokristalnom omotaču oko uljanih kapi. Takođe, izmereni particioni koeficijent i kontaktni ugao (tabela 10, slika 11) ukazali su na hidrofobnu prirodu ekstrakta, na osnovu čega se može pretpostaviti i postojanje hidrofobnih interakcija njegovih čestica sa alkil



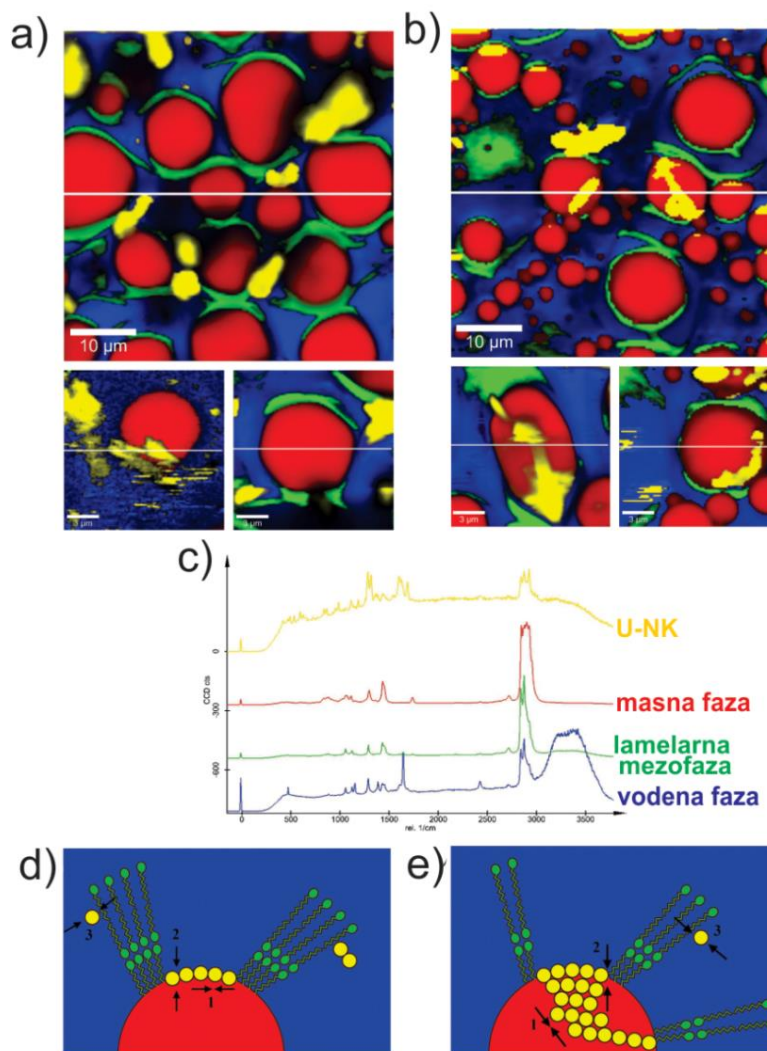
lancima surfaktanta i/ili masnog amfilila u formiranim lamelarnim mezofazama (Zhang i sar., 1997).

U skladu sa ovakvim rezultatima Raman spektralne mikroskopije, kao što je predstavljeno u shematskom prikazu (slika 15d), može se pretpostaviti da čestice U-NK učestvuju u stabilizaciji S uzoraka putem sledećih mehanizama: (1) agregacije čestica ekstrakta, (2) adsorpcije čestica ekstrakta na granici faza ulje-voda i (3) interakcijama čestica ekstrakta sa hidrofobnim domenima formiranih lamelarnih mezofaza. Ranija istraživanja sistema stabilizovanih surfaktantima i čvrstim česticama pokazala su da prisustvo oba entiteta može imati različit uticaj na njihovu stabilnost (Binks i Desforges, 2007). Uzimajući u obzir nalaze kontinualnih reoloških merenja, čini se da je uočeno ponašanje čestica U-NK u S uzorcima zavisno od njegove koncentracije, odnosno vodi dodatnom strukturiranju emulzionog sistema sa povećanjem količine ekstrakta do koncentracije koja odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji (uzorak M2S), odnosno do narušavanja koloidne strukture pri daljem povećanju procenta ekstrakta u sistemu (koji odgovara sadržaju od 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji, u uzorku M4S).

Nalazi dobijeni analizom Raman mikrografija kodiranih bojom D uzoraka (slika 15b) bili su u saglasnosti sa prethodno diskutovanim rezultatima polarizacione i fluorescentne mikroskopije. Naime, na Raman mikrografijama može se videti prisustvo malih uljanih kapi bez lamelarnog tečnokristalnog omotača (usled čega dolazi do njihove koalescencije), zajedno sa klasterima lamelarne mezofaze sa adsorbovanim česticama ekstrakta u kontinualnoj fazi (slika 15b). Većina ekstrakta je ipak lokalizovana u unutrašnjosti većih uljanih kapi, a u onima bez omotača od APG emulgatora, U-NK se može uočiti na granici faza ulje-voda.

U skladu sa ovakvim nalazom, kao što je predstavljeno na shematskom prikazu (slika 15e), slično ponašanje čestica ekstrakta uočeno u S uzorcima tj. predominantno: (1) agregacija čestica ekstrakta, (2) adsorpcija čestica ekstrakta na granici faza ulje-voda i, u manjoj meri (3) hidrofobne interakcije čestica ekstrakta i lamelarnih mezofaza može se pretpostaviti i u D uzorcima. Ipak, dispergovanje U-NK u masnoj fazi APG krema u D uzorcima uslovalo je vidno drugačiju distribuciju ekstrakta u odnosu na S uzorke (slika

15d,e), ističući značaj postupka izrade kremova stabilizovanih i surfaktantima i čvrstim česticama (Binks i Desforges, 2007).



**Slika 15.** Raman mikrofografije kodirane bojom a) krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (M2S), b) krema sa U-NK (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) dispergovanim u masnoj fazi APG krema (M2D) (žuto: U-NK; crveno: masna faza; zeleno: lamelarna mezofaza; plavo: vodena faza), c) Raman spektar U-NK, masne faze, lamelarne mezofaze i vodene faze; shematski prikaz pretpostavljene strukture i U-NK lokalizacije u uzorku d) M2S i e) M2D ((1) agregacija čestica ekstrakta, (2) adsorpcija čestica ekstrakta na granici faza ulje-voda i (3) interakcije čestica ekstrakta sa hidrofobnim domenima lamelarne mezofaze)

Logično je pretpostaviti da je U-NK, prethodno dispergovan u masnoj fazi krema (koja sadrži i APG emulgatore), nakon mešanja sa vodenom fazom podvrgnut preraspodeli koja usled hidrofobne prirode ekstrakta dovodi do njegovog pretežnog „zarobljavanja” u unutrašnjosti uljanih kapi u fazi njihovog nastanka, uz istovremeno ometanje formiranja lamelarne mezofaze. U skladu sa prethodno diskutovanim nalazima fizičko-hemijske karakterizacije ispitivanih emulzionih sistema, čini se da je i ovaj fenomen koncentraciono zavisian, odnosno izraženiji sa porastom koncentracije U-NK u D uzorcima.

#### *4.2.2.1.4. Termoanalitička merenja (DSC i TGA)*

Pretpostavljena struktura/distribucija U-NK u emulzionom sistemu predložena za S i D uzorke na osnovu rezultata polarizacione/fluorescentne mikroskopije, kontinualnih reoloških merenja, a naročito Raman spektralne mikroskopije, podržana je i nalazima dalje sprovedenih termoanalitičkih ispitivanja (slika 16, slika 17).

Kao što se može videti sa slike 16, DSC sken APG podloge karakterišu dva endotermna pika ukupnih entalpija od -0,57 i -11,84 mJ/mg, respektivno. Drugi pik, koji se prostire u širokom temperaturnom opsegu od 40-65°C verovatno odgovara topljenju kompleksnih lamelarnih faza oba tipa (tečnokristalna i lamelarna gel faza), sudeći prema relativno visokoj ukupnoj entalpiji. Sa druge strane, prvi pik verovatno odgovara tranziciji masnih alkohola iz  $\beta$  u  $\alpha$  konformaciju (slika 16). Dodatak U-NK u svim uzorcima uslovio je nestanak prvog pika (slika 16), sugerišući da su alkil lanci masnih alkohola u ovim uzorcima u  $\alpha$ -kristalnom obliku na sobnoj temperaturi (Lukic i sar., 2013).

Prisustvo U-NK u S uzorcima nije uslovilo značajne promene u entalpijama topljenja niti temperaturama maksimuma drugog pika (slika 16). Suprotno ovom nalazu, dodatak U-NK u D uzorcima doveo je do primetne razlike ne samo u izgledu ovog pika, već i u temperaturama maksimuma i ukupnoj entalpiji (slika 16).

Rezultati DSC merenja dodatno su potvrdili inherentne razlike u koloidnoj strukturi kremova sa U-NK, shodno načinu inkorporiranja ekstrakta (S vs. D uzorci) na koje su ukazale prethodno primenjene eksperimentalne tehnike. Sa druge strane, široke endoterme DSC skenova teško je interpretirati (Ribeiro i sar., 2004), usled veoma kompleksne strukture ispitivanih sistema. S tim u vezi, rezultati DSC analize nisu dali očekivane

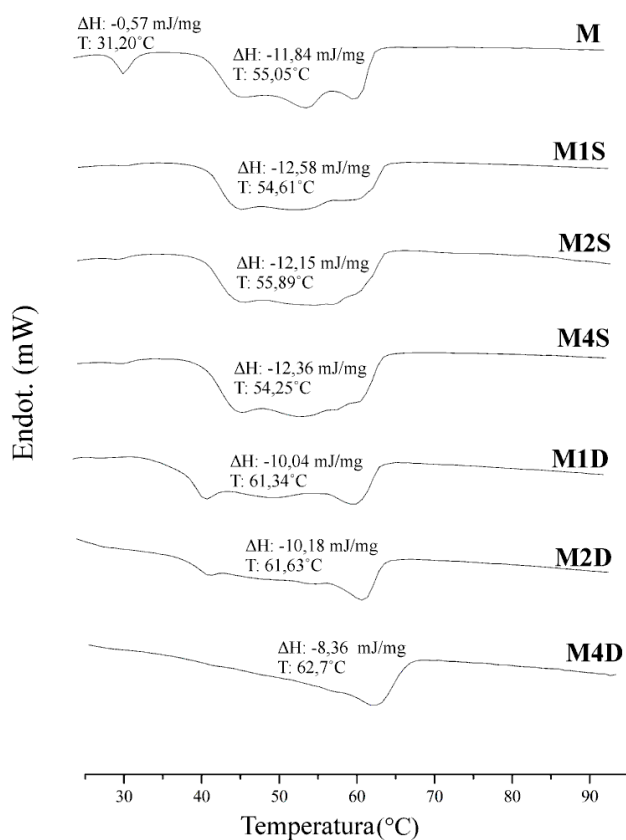
dodatne podatke o uticaju U-NK na koloidnu strukturu ispitivanih kremova sa ovim ekstraktom. Stoga je TGA sprovedena kao termalna analiza koja se često primenjuje zajedno sa DSC.

Rezultati DSC analize bili su u dobroj korelaciji sa TGA merenjima, procenjenim kroz parcijalne gubitke mase u različitim temperaturnim opsezima, koji odgovaraju različitim tipovima vode u sistemu, za koje je poznato da ima različite fizičko-hemijske osobine (Baudonnet i sar., 2004). Frakcija vode koja isparava u prvom temperaturnom opsegu (30-50°C) odgovara slobodnoj ili *bulk* vodi. Frakcija vode koja isparava u temperaturnom opsegu od 50-70°C naziva se „sekundarnom” vodom, koja je inkorporirana u sklopu lipofilne gel faze, sastavljene od jedinica masnog alkohola u višku, dok se voda koja isparava na temperaturi od 70-100°C naziva interlamelarno vezanom i odgovara vodi vezanoj u hidrofilnoj gel fazi ili kao voda fiksirana između lamela tečnokristalne faze (Junginger, 1997; Savić, 2004; Lukic i sar., 2013). Pri tome, *bulk* voda doprinosi subjektivnom osećaju hlađenja na koži nakon aplikacije preparata, dok interlamelarno vezana voda (ili „depo” voda) stoji na raspolaganju za produženu/kontrolisanu hidrataciju kože, a takođe utiče na stepen difuzije i penetraciju aktivnih supstanci u kožu (Konya i sar., 2003, Savic i sar., 2005, Pantelic i sar., 2014a,b).

Rezultati TGA ispitivanja izraženi su kao gubitak mase u odnosu na ukupni sadržaj vode u sistemu (slika 17a). Dodatno, izračunate su i derivativne TGA krive (tzv. DTG profili) u cilju procene brzine evaporacije vode iz ispitivanih uzoraka (slika 17b).

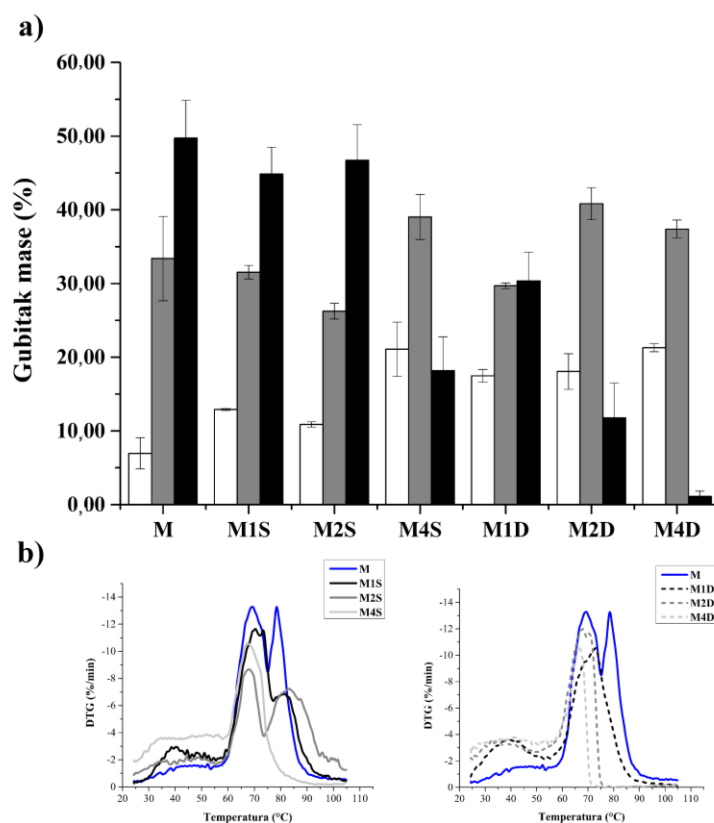
Dobijeni rezultati TGA merenja pokazali su da je skoro polovina vode u podlozi stabilizovanoj APG emulgatorima inkorporirana kao interlamelarno vezana voda, koja je isparavala u trećem temperaturnom opsegu (slika 17a). Suspendovanje U-NK u formulisanu APG podlogu u nižim koncentracijama (u uzorcima M1S i M2S) nije uslovalo vidljivu promenu u distribuciji vode u sistemu (slika 17a). Međutim, dalje povećanje koncentracije ekstrakta (u uzorku M4S) dovelo je do drastičnog smanjenja isparavanja vode u trećem temperaturnom opsegu, ukazujući da je u ovom uzorku voda interlamelarno vezana u nižem stepenu (slika 17a). Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa prethodno diskutovanim narušavanjem koloidne strukture (slabljenjem formiranih lamelarnih mezofaza) u ovom uzorku.

Kada je reč o rezultatima TGA merenja D uzoraka, značajno smanjenje količine vode koja isparava u trećem temperaturnom opsegu je uočena već kod uzorka sa najnižim sadržajem U-NK (M1D), ukazujući na pomeranje dela interlamelarno fiksirane u slabo vezanu vodu. Ovaj trend je bio još izraženiji sa porastom koncentracije ekstrakta u uzorcima M2D i M4D, respektivno (slika 17a). Dobijeni rezultati TGA analize u skladu su sa drugim nalazima fizičko-hemijske karakterizacije, odnosno prethodno iznetim pretpostavkama da je u prisustvu U-NK u D uzorcima formiranje lamelerne mezofaze redukovano, i to na koncentraciono zavisani način, što svakako treba uzeti u obzir pri proceni dugoročne stabilnosti ovih uzoraka.



**Slika 16.** Temperature (°C) i ukupne entalpije (mJ/mg) kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) ušinske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M), 7 dana nakon izrade

Analiza DTG profila bila je u dobroj korelaciji sa navedenim pretpostavkama (slika 17b). Naime, pregledom DTG krive podloge stabilizovane APG emulgatorima (uzorak M) primećena su dva temperaturna pika na  $69,31 \pm 0,26$  i  $78,62 \pm 0,06^\circ\text{C}$ . Uporedivi trendovi temperaturnih pikova uočeni su i analizom derivativnih profila uzoraka M1S ( $70,40 \pm 0,19$  i  $80,85 \pm 0,13^\circ\text{C}$ ) i M2S ( $68,32 \pm 0,01$  and  $83,13 \pm 0,05^\circ\text{C}$ ). Sa druge strane, u uzorku M4S detektovan je nestanak drugog pika, dok je prvi bio pomeren ka nešto nižoj temperaturi od  $67,01 \pm 0,31^\circ\text{C}$  (slika 17b). Nestanak drugog pika detektovan je i u svim D uzorcima (slika 17b) uz pomeranje prvog pika ka nižim temperaturama sa porastom koncentracije U-NK ( $71,93 \pm 0,03$ ;  $68,31 \pm 0,27$  i  $67,11 \pm 0,15^\circ\text{C}$  za M1D, M2D i M4D, respektivno).



**Slika 17.** a) Parcijalni gubici mase (izraženi u %) procenjeni TGA merenjima (beli pravougaonik: 30-50°C; sivi pravougaonik: 50-70°C; crni pravougaonik: 70-100°C) i b) derivativne termogravimetrijske (DTG) krive kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulziona podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M), 7 dana nakon izrade

#### 4.2.2.1.5. Merenje pH i električne provodljivosti

pH vrednosti svih ispitivanih uzoraka (tabela 12) bile su u granicama prihvatljivim za preparate koji se primenjuju na koži (Vuleta i sar., 2012). Dodatak U-NK doveo je do blagog pada pH vrednosti u svim kremovima sa ovim ekstraktom u odnosu na APG podlogu (tabela 12). Uočeni pad pH bio je obrnuto proporcionalan koncentraciji U-NK u obe grupe uzoraka (S i D) što je i bilo za očekivati, uzimajući u obzir da je pH vrednost izmerena u vodenom rastvoru U-NK, u koncentraciji koja odgovara njegovoj saturacionoj rastvorljivosti, iznosila 5,80. Dodatno, izmerena pH vrednost ispitivanih uzoraka nije se značajno menjala tokom perioda čuvanja od 90 dana na sobnoj temperaturi, ukazujući na njihovu zadovoljavajuću preliminarnu hemijsku stabilnost. Najveća promena pH uočena je kod APG podloge (uzorak M) i iznosila je 0,39 pH jedinica (tabela 12).

**Tabela 12.** pH i električna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim  $\text{CO}_2$  (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno) u poređenju sa APG emulzionom podlogom (M), 7, 30 i 90 dana nakon izrade

Oznaka uzorka	pH			Električna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )		
	7. dan	30. dan	90. dan	7. dan	30. dan	90. dan
M	7,04±0,63	6,95±0,54	6,65±0,05	204,40±0,13	91,50±0,54	181,00±0,21
M1S	6,97±0,02	7,09±0,31	6,64±0,12	260,40±0,36	135,80±0,15	220,00±0,55
M2S	6,96±0,09	6,98±0,12	6,90±0,45	199,50±0,56	107,30±0,31	248,00±1,01
M4S	6,92±0,24	6,86±0,23	6,85±0,01	270,80±0,11	143,40±0,76	298,00±0,41
M1D	6,96±0,45	6,88±0,08	6,71±0,36	169,10±0,73	80,00±0,14	180,00±0,98
M2D	6,86±0,30	6,82±0,27	6,77±0,51	234,40±0,12	93,00±0,27	207,00±0,15
M4D	6,77±0,47	6,72±0,05	6,68±0,32	196,80±0,14	87,10±0,11	195,00±0,89

U svim ispitivanim uzorcima (APG podloga i kremovi sa U-NK) izmerena je električna provodljivost veća od 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , koja nije uobičajena za sisteme stabilizovane APG emulgatorima (emulzioni sistemi mešovito tipa), već se nalazi u oblasti tipičnoj za prave u/v emulzije (Tabela 12). Međutim, uzimajući u obzir nalaze TGA merenja (Slika 17a), visoka električna provodljivost ne može se decidno interpretirati kao mera smanjene strukturiranosti sistema, nego pre kao odraz nivoa slobodnih jona prisutnih u sistemu (Korhonen i sar., 2000). Sa druge strane, inicijalno izmerene vrednosti električne provodljivosti bile su u saglasnosti sa drugim izmerenim parametrima. Na primer, među svim S uzorcima, M2S, koji je imao najviši procenat vezane vode (slika 17a), pokazao je i najnižu električnu provodljivost (tabela 12). Iznenađujuće, ovaj uzorak je imao i najnižu vrednost maksimalnog prividnog viskoziteta među S uzorcima (tabela 11). Nasuprot tome, najviša vrednost električne provodljivosti među D uzorcima izmerena je u uzorku M2D (tabela 12), što nije u saglasnosti za najvišom vrednošću maksimalnog prividnog viskoziteta ovog krema (tabela 11), koja bi trebalo da ukaže na visok procenat vezane vode u sistemu (Korhonen i sar., 2000). Na osnovu ovih rezultata, može se pretpostaviti da je viskozitet ispitivanih uzoraka zavisao prvenstveno od razvijenosti lipofilne gel faze koja vezuje tzv. „sekundarnu” vodu (Savic i sar., 2009). Ovakva pretpostavka je u dobroj korelaciji sa rezultatima TGA merenja (slika 17a).

Kontrolna merenja nakon 30 dana čuvanja na sobnoj temperaturi (tabela 12) ukazala su na smanjenje vrednosti električne provodljivosti u svim ispitivanim uzorcima, što se smatra pokazateljem naknadnog strukturiranja emulzionih sistema i tipična je karakteristika kremova sa nejonskim mešanim emulgatorima (Korhonen i sar., 2000). Porast vrednosti električne provodljivosti u odnosu na kontrolno merenje nakon 30 dana, zabeležen je kod svih ispitivanih uzoraka nakon 90 dana čuvanja na sobnoj temperaturi (tabela 12), ali su izmerene vrednosti bile niže u odnosu na one određene inicijalno (7 dana od izrade). Izuzetno, određen porast vrednosti provodljivosti zabeležen je u uzorcima M2S, M4S i M1D (tabela 12), s tim da su izmerene vrednosti ostale u opsegu prihvatljivom za u/v emulzione sisteme.

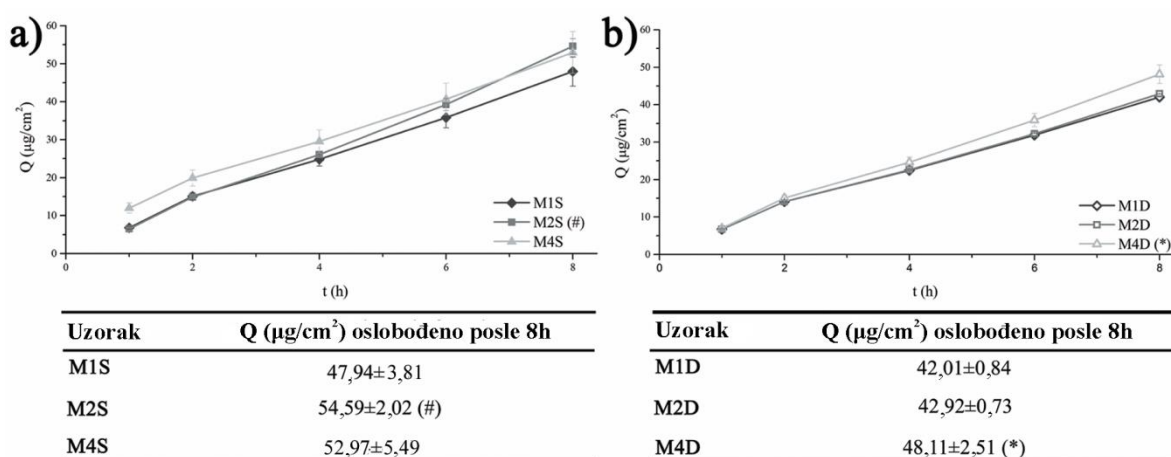


#### **4.2.2.2. *In vitro* ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz podloge stabilizovane APG emulgatorima**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja leka predstavlja pouzdan test za procenu kritičnih atributa polučvrstih preparata za primenu na koži, budući da su liberacioni profili aktivnih supstanci iz ovih farmaceutskih oblika veoma osetljivi indikatori njihovih fizičko-hemijskih karakteristika (kao što su rastvorljivost lekovite supstance i veličina/kristalni oblik njenih čestica, način distribucije leka u podlozi, zatim njene reološke osobine i dr.), koje su u vezi kako sa sastavom, tako i sa postupkom njihove izrade (Shah i sar., 2015). U tom smislu, ispitivanjem oslobađanja lekovite supstance moguće je detektovati i najmanje izmene u formulaciji navedenih preparata, pa je ono od strane FDA preporučeno kao koristan test za karakterizaciju performansi polučvrstih dermatoloških lekova, nakon određenih izmena kod proporcionalnog povećanja šarže sa laboratorijskog na industrijski nivo proizvodnje (engl. *scale-up*) ili nakon stavljanja leka u promet (engl. *post approval changes*) (Chang i sar., 2013; Shah i sar., 2015). Nedavno, *in vitro* test oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata uključen je i u Američku farmakopeju, kao deo poglavlja <1724> *Semisolid Drug Products-Performance Tests*, kojim je propisana oprema i način izvođenja ovog ispitivanja (USP 37/NF 32). Dodatno, prema skorašnjem nacrtu dva vodiča koji je objavio FDA (za generičke lekove: aciklovir mast i ciklosporin emulziju za oči), *in vitro* test oslobađanja lekovite supstance predstavlja moguću opciju za dokazivanje bioekvivalentnosti (pod uslovom da su ispunjeni odgovarajući kriterijumi), te je, s tim u vezi, nedavno predložen kao osnov sistema klasifikacije topikalnih lekova (engl. *Topical Drug Classification System, TCS*), koji bi predstavljao pandan postojećem biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System, BCS*) za čvrste farmaceutske oblike za peroralnu primenu sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance (Shah i sar., 2015).

Ovo ispitivanje nalazi primenu kao rutinski test u kontroli kvaliteta različitih serija jednog proizvoda, kao i tokom razvoja polučvrstih preparata za primenu na koži, u proceni stabilnosti sistema u funkciji vremena/uslova skladištenja prilikom odabira završne formulacije, pre pristupanja odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima (Csoka i sar., 2005; Chang

i sar., 2013). S tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji, *in vitro* studija oslobađanja usninske kiseline iz kremova sa U-NK sprovedena je sa ciljem ispitivanja potencijala razvijene APG podloge kao sistema za isporuku aktivne supstance, radi odabira prototip formulacije finalnog proizvoda. Preciznije, uzimajući u obzir slabu rastvorljivost usninske kiseline u vodi (tabela 10), bilo je značajno ispitati da li razvijena APG podloga može uticati na njenu rastvorljivost i sledstveno, na brzinu i obim njenog oslobađanja, kao i da li je ovaj fenomen zavisian od koncentracije i/ili načina inkorporiranja ekstrakta (U-NK) u emulzioni sistem.



**Slika 18.** Rezultati *in vitro* „skrinig“-a oslobađanja usninske kiseline iz kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) a) suspendovanim u APG emulzionu podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i b) dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno). # označava statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u kumulativnoj količini usninske kiseline oslobođene posle 8h iz M2S u poređenju sa M2D, \* ukazuje na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u kumulativnoj količini usninske kiseline oslobođene posle 8h iz M4D u poređenju sa M1D i M2D)

U principu, kumulativna količina usninske kiseline oslobođena tokom 8h eksperimenta bila je prilično niska iz svih ispitivanih uzoraka, i kretala se od 42,01±0,84 µg/cm<sup>2</sup> iz uzorka M1D do 54,59±2,02 µg/cm<sup>2</sup> iz uzorka M2S (slika 18). Imajući u vidu da su eksperimentalni parametri podešeni tako da obezbede „sink“ uslove, mala količina oslobođene usninske kiseline može biti u vezi sa samom prirodom ovog jedinjenja, budući da su slični rezultati dobijeni i za druga jedinjenja slabe rastvorljivosti u vodi (Csoka i sar., 2005). Ipak, kumulativna količina usninske kiseline oslobođene na kraju eksperimenta od

8h, bila je veća iz svih S uzoraka u poredjenju sa odgovarajućim D uzorcima (slika 18). Isto se može reći i za brzinu oslobađanja, sem u slučaju uzoraka sa najvišim sadržajem ekstrakta (M4S i M4D) iz kojih se usninska kiselina oslobađala istom brzinom (slika 18). Ovakvi rezultati ukazuju na bimodalnu prirodu interakcije ekstrakta (U-NK) i podloge sa APG emulgatorima, ističući odlučujuću ulogu načina inkorporiranja ekstrakta na profile oslobađanja usninske kiseline.

U vezi sa napred navedenim, čini se logičnim zaključiti da razlike u oslobađanju usninske kiseline iz uzoraka S i D serije potiču prevashodno od prethodno diskutovanih razlika u njihovoj koloidnoj strukturi, a naročito različitoj distribuciji ekstrakta u sistemu. Naime, većina ekstrakta u D uzorcima je „zarobljena” u uljanim kapima okruženim tečnim kristalima, koji se ponašaju kao barijera za difuziju usninske kiseline iz njihove unutrašnjosti u spoljašnju fazu (Baudonnet i sar., 2004). Gotovo da nije bilo razlike u liberacionim profilima usninske kiseline iz uzoraka M1D i M2D, dok je dalje povećanje koncentracije ekstrakta u uzorku M4D dovelo do porasta brzine oslobađanja, kao i značajno veće kumulativne količine oslobođene usninske kiseline (slika 18b), ukazujući na njenu veću termodinamičku aktivnost u ovom uzorku (Walters i Brain, 2009). Nasuprot D uzorcima, pokazano je da je ekstrakt u uzorcima S serije lokalizovan u spoljašnjoj fazi, što može objasniti bolju liberaciju usninske kiseline (Baudonnet i sar., 2004). Ipak, porast koncentracije ekstrakta u S uzorcima nije doveo do komparativnog poboljšanja u oslobađanju usninske kiseline. Tako je finalno uzorkovanje otkrilo da se veća količina usninske kiseline oslobodila iz krema M2S, a ne M4S (slika 18a). Bez obzira na izostanak statističke značajnosti u kumulativnoj količini oslobođene usninske kiseline ( $p > 0,05$ ), trend poboljšanja u njenom oslobađanju iz uzorka M2S bio je očigledan počevši od četvrtog sata eksperimenta. Takođe, ovaj uzorak oslobodio je najveću količinu usninske kiseline i pokazao najveću brzinu liberacije ovog jedinjenja među svim ispitivanim uzorcima. Osim toga, M2S je jedini među uzorcima S serije oslobodio značajno veću kumulativnu količinu usninske kiseline u odnosu na odgovarajući uzorak D serije (slika 18).

U svetlu prethodno diskutovanih rezultata, može se pretpostaviti da u uzorku M2S, primećene interakcije čestica ekstrakta sa hidrofobnim domenima formiranih lamelarnih

mezofaza mogu dovesti do povećanja rastvorljivosti usninske kiseline, vodeći poboljšanju njenog oslobađanja iz ovog uzorka (Farkas i sar., 2001; Eros i sar., 2003).

Fitovanjem dobijenih profila oslobađanja kroz nekoliko kinetičkih modela koji se mogu primeniti na polučvrste sisteme (tabela 13), utvrđeno je da oslobađanje usninske kiseline iz svih ispitivanih kremova sa U-NK stabilizovanih APG emulgatorima najbolje opisuje kinetika nultog reda, bez obzira na način inkorporiranja/koncentraciju ovog ekstrakta. Slično kinetičko ponašanje opisano je i za druge hidrofobne supstance, poput tenoksikama (Makai i sar., 2003) ili paklitaksela (Hosmer i sar., 2011) u studijama oslobađanja ovih jedinjenja iz nosača stabilizovanih lamelarnim fazama.

**Tabela 13.** Kinetika oslobađanja usninske kiseline ( $R^2$ ) iz kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim  $CO_2$  (U-NK), koji odgovara sadržaju od 1, 2 i 4 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji, suspendovanim u APG emulziju podlogu (S uzorci: M1S, M2S i M4S, respektivno) i dispergovanim u masnoj fazi APG krema (D uzorci: M1D, M2D i M4D, respektivno)

Oznaka uzorka	Kinetika nultog reda	Kinetika prvog reda	Higuchi model	Hixon-Crowell model
M1S	<b>0,9964</b>	0,9062	0,9845	0,9543
M2S	<b>0,9970</b>	0,9164	0,9755	0,9646
M4S	<b>0,9970</b>	0,9467	0,9823	0,9742
M1D	<b>0,9956</b>	0,9077	0,9868	0,9531
M2D	<b>0,9960</b>	0,9105	0,9849	0,9556
M4D	<b>0,9966</b>	0,9119	0,9828	0,9580

Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije pokazali su da je uticaj dodatka U-NK na koloidnu strukturu podloge na bazi APG emulgatora zavisao i od njegove koncentracije i od načina inkorporiranja. Preciznije, uočen je potencijal čestica U-NK da učestvuju u koloidnoj strukturi ispitivanih kremova obe serije (S i D) putem sličnih mehanizama, koji su, međutim, rezultovali različitim karakteristikama odgovarajućih sistema, na koje je dodatno uticala i koncentracija dodatog ekstrakta. Sprovedeni eksperimenti pokazali su da

je suspendovanje U-NK u podlogu stabilizovanu APG emulgatorima pogodniji način njegovog inkorporiranja, sa aspekta koloidne strukture i fizičke stabilnosti. Dalja *in vitro* studija liberacije potvrdila je da navedene razlike u koloidnoj strukturi S i D uzoraka imaju odlučujuću ulogu kada je reč o oslobađanju usninske kiseline, ističući M2S kao uzorak sa najvećom brzinom i obimom liberacije ovog jedinjenja.

Iz navedenih razloga, uzorak M2S je izabran kao prototip formulacija finalnog proizvoda za dalje faze istraživanja. Dodatno, poređenja radi, istim postupkom izrade (suspendovanjem u gotovoj podlozi) i u istoj koncentraciji (2 % (m/m)) usninske kiseline u finalnoj formulaciji), ekstrakt talusa *U. barbata* dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) inkorporiran je u poredbenu podlogu-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 (uzorak N), a dobijeni poredbeni uzorak označen je kao N2S.

S tim u vezi, u sledećim odeljcima biće prikazani rezultati fizičko-hemijske karakterizacije (ispitivanja koloidne strukture i fizičko-hemijske stabilnosti) oba poredbena uzoraka (N i N2S), odnosno preliminarnog „*skrining*“-a biofarmaceutskih karakteristika poredbenog uzorka N2S (*in vitro* ispitivanje oslobađanja usninske kiseline). Pri tome, rezultati navedenih eksperimenata sprovedenih na poredbenim uzorcima biće diskutovani u kontekstu komparacije sa ranije opisanim nalazima odgovarajućih ispitivanja korespondentnih APG uzoraka (M i M2S). Konačno, na kraju odeljka 4.2. (Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada), biće predstavljena komparativna analiza dermalne raspoloživosti ekstrakta (praćeno preko usninske kiseline) iz formulisane APG i poredbene podloge (odnosno uzoraka M2S i N2S, respektivno) primenom *tape stripping* metode.

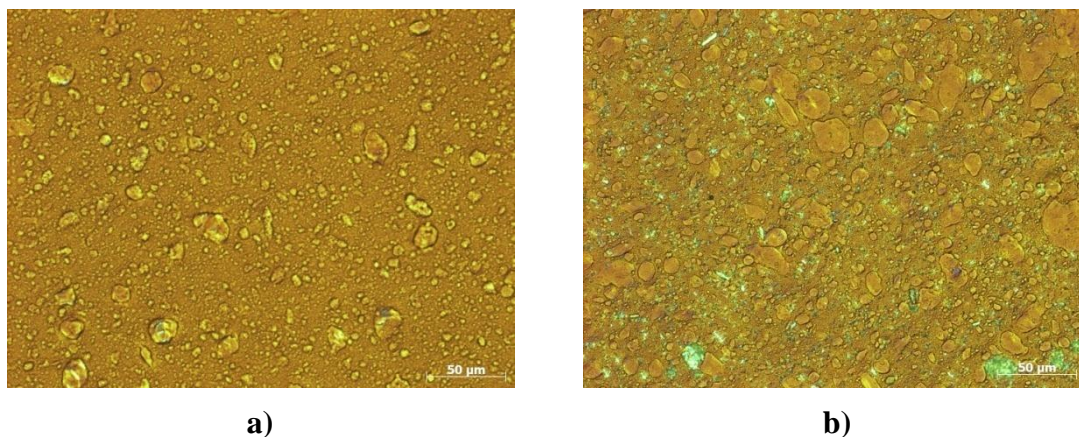
### **4.2.3. Ispitivanja poredbenih kremova**

#### **4.2.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija poredbenih kremova**

Organoleptičkim pregledom ispitivanih uzoraka, utvrđeno je da je oficinalna podloga (N) bila gušće konzistencije u odnosu na podlogu na bazi APG emulgatora (M). Uvidom u polarizacione mikrofografije, snimljene 7 dana nakon izrade, može se pretpostaviti da je uočena razlika u vezi sa različitom koloidnom strukturom navedenih podloga. Nasuprot APG podlozi stabilizovanoj lamelarnim mezofazama oba tipa (odeljak 4.2.2.1.1.), struktura

poredbene podloge (N) podsećala je na relativno gust matriks (slika 19a). Ovo je u skladu sa zapažanjima Jaksic i saradnika (2012), koji su matriksnu strukturu iste podloge objasnili nižim sadržajem vode (49,5 % (m/m)) u uzorku N naspram 64,5 % (m/m) u uzorku M (APG podloga)), ali i prisustvom visokog sadržaja cetostearil alkohola u ovom uzorku (tabela 5), što vodi dominantnom obrazovanju lipofilne gel faze koja imobilizuje dispergovanu fazu sastavljenu uglavnom od belog vazelina.

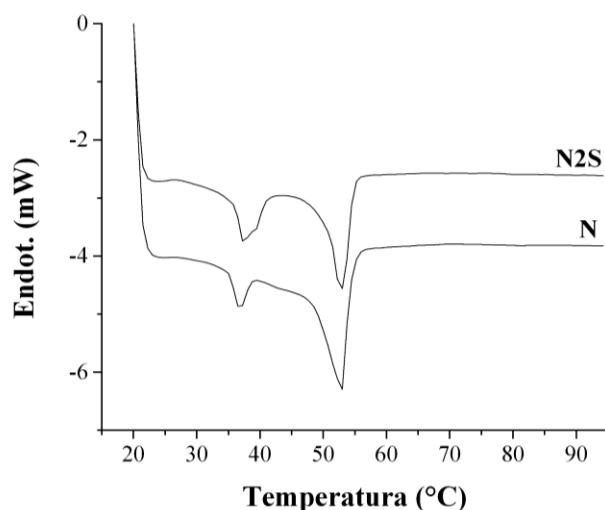
Uzorak poredbenog krema sa U-NK (N2S) bio je žukaste boje i očekivano gušće konzistencije u odnosu na odgovarajuću podlogu (N). Polarizaciona mikrografija ovog uzorka (slika 19b) ukazala je na prisustvo igličastih kristala U-NK raspoređenih u spoljašnjoj fazi krema, čija je struktura, kao i u slučaju korespondentne podloge (uzorak N), podsećala na gust matriks. Dodatno, slično nalazima Jaksic i saradnika (2012) za model lekovitu supstancu slabe rastvorljivosti u vodi (ketoprofen), primećena je i nešto manje homogena distribucija U-NK nakon suspendovanja u oficinalnu podlogu (uzorak N2S, slika 19b) u odnosu na onu stabilizovanu APG emulgatorima, u istoj koncentraciji ekstrakta (uzorak M2S, slika 12h).



**Slika 19.** Polarizacione mikrografije (200 x) a) poredbene podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011 (N), i b) odgovarajućeg poredbenog krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u podlogu N (N2S)

Dalja termoanalitička ispitivanja potvrdila su postojanje razlika u koloidnoj strukturi poredbenih (N i N2S) i odgovarajućih APG (M i M2S) uzoraka. Kada je reč o rezultatima

DSC merenja, ove razlike su se ogledale kako u obliku krive (slika 16, slika 20), tako i u temperaturnim maksimumima pikova i ukupnoj entalpiji endotermalnih prelaza (slika 16, tabela 14). Kao i u slučaju odgovarajućih APG uzoraka (M i M2S), DSC analiza nije uspela da pruži više podataka o uticaju suspendovanja U-NK na koloidnu strukturu poredbene podloge u koncentraciji koja odgovara 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji, uzimajući u obzir izostanak promena u praćenim parametrima u uzorku N2S u poređenju sa uzorkom N (slika 20, tabela 14).



**Slika 20.** Usporedni prikaz faznih prelaza poredbenih uzoraka: podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011 (N) i krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u podlogu N (N2S)

Slično se može reći i za nalaze termogravimetrijske analize, koji su ukazali na ujednačenu dinamiku gubitka mase u oba poredbena uzorka (N i N2S), ukazujući na činjenicu da dodatak U-NK u datoj koncentraciji nije značajno uticao na distribuciju vode u emulzionoj podlozi-Nejonskom hidrofilnom kremu, DAB 2011 (tabela 14). Naime, najveći gubitak mase u oba poredbena krema (tabela 14) detektovan je u drugom temperaturnom opsegu (50-70°C) koji odgovara tzv. „sekundarnoj” vodi, što je u vezi sa prethodno diskutovanim dominantnim formiranjem lipofilne gel faze u ovim emulzionim sistemima. Nasuprot tome, termogravimetrijska analiza odgovarajućih APG uzoraka (M i M2S) pokazala je da je u ovim sistemima najveći deo vode inkorporiran kao interlamelarno

vezana voda (slika 17a), pružajući dodatne dokaze o inherentnim razlikama u koloidnoj strukturi kremova na bazi APG emulgatora i Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011.

**Tabela 14.** Rezultati termalne analize (% gubitka mase tokom definisanih temperaturnih intervala, dobijenog TG analizom; ukupne entalpije topljenja ( $\Delta H$  (mJ/mg)) i temperature ( $T$  (°C)) endotermalnih prelaza, dobijenih u DSC merenjima) poredbenih uzoraka: podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011 (N) i krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u podlogu N (N2S)

Oznaka uzorka	Procenat gubitka mase*			Podaci DSC integracije	
	30-50°C (%)	50-70°C (%)	70-100°C (%)	$\Delta H$ (mJ/mg)	T (°C)
N	11,80±0,11	48,06±2,71	23,33±3,46	-18,95±0,25	52,60
N2S	14,33±1,44	47,74±2,20	11,88±1,60	-22,42±0,25	52,44

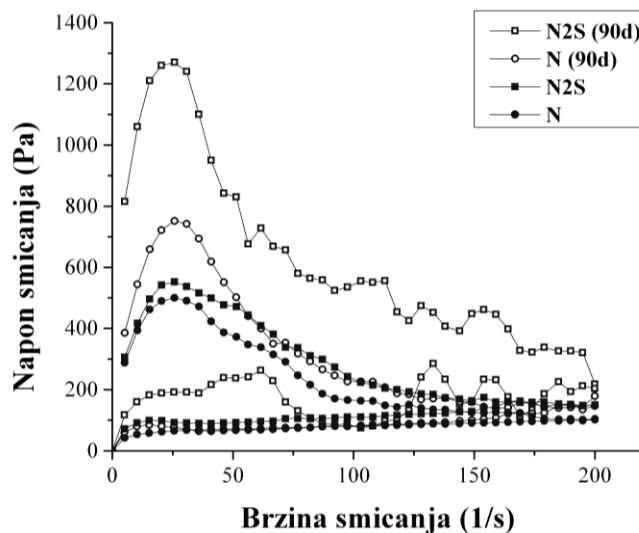
\* računato kao relativan procenat u odnosu na ukupan sadržaj vode u uzorku

Dodatno, dobijeni parametri kontinulanih reoloških merenja potvrdili su različite senzorne osobine navedenih emulzionih sistema stabilizovanih konvencionalnim nejonskim (N i N2S) i APG emulgatorima (M i M2S), koje su uočene vizuelnim ispitivanjem, i još jednom naglasile razlike u njihovoj koloidnoj strukturi, potvrđujući nalaze polarizacione mikroskopije i termoanalitičkih ispitivanja. Navedene razlike u reološkom ponašanju ogledale su se kako u samom izgledu krivih proticanja (slika 13, slika 21), tako i u vrednostima minimalnih,  $\eta_{\min}$  (0,179±0,001 Pa·s i 0,268±0,015 Pa·s za M i M2S, respektivno naspram 0,519±0,021 Pa·s i 0,751±0,012 Pa·s za N i N2S, respektivno) i maksimalnih prividnih viskoziteta,  $\eta_{\max}$  (2,98±0,09 Pa·s i 2,82±0,13 Pa·s za M i M2S, respektivno naspram 55,90±1,13 Pa·s i 59,80±0,96 Pa·s za N i N2S, respektivno). S tim u vezi, treba naglasiti da su kontinualna reološka merenja istakla značajno poboljšane estetske/aplikativne osobine (manji viskozitet i vrednost histerezne površine) uzoraka stabilizovanih APG emulgatorima u odnosu na poredbene, kao važnog svojstva preparata za primenu na koži, koje je često odlučujuće za komplijansu pacijenata (Loden, 2003).

U inicijalnom merenju (7 dana nakon izrade), kriva tečenja poredbene podloge otkrila je, kao i u slučaju podloge stabilizovane APG emulgatorima (slika 13), pseudoplastični tip



tečenja, ali sa izraženijom tiksotropijom (slika 21). Suspendovanje U-NK u oficinalnu podlogu (slika 21) u koncentraciji koja odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji (uzorak N2S) uslovalo je isti trend u promeni reoloških parametara (izvesno pomeranje krive tečenja ka višim vrednostima uz propratni porast histerezne površine) detektovan i u slučaju korespondentnog APG uzorka, M2S (slika 13a).



**Slika 21.** Krive tečenja poredbenih uzoraka: podloge- Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011 i krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanog u podlogu N (N2S), 7 i 90 dana (90d) nakon izrade

Ponovljena merenja reoloških parametara nakon 90 dana čuvanja poredbenih uzoraka na sobnoj temperaturi (vs. inicijalno izmerene vrednosti, slika 21), ukazala su na krajnje nehomogenu krivu tečenja i drastični porast vrednosti histerezne površine, u slučaju krema sa U-NK (N2S), naročito u odnosu na odgovarajuću podlogu (N). Ovakav nalaz može se tumačiti nezadovoljavajućom fizičkom stabilnošću, odnosno neodgovarajućim aplikativnim karakteristikama poredbenog uzorka N2S (Derkach, 2009). Podsećanja radi, u korespondentnom kremu stabilizovanom APG emulgatorima (M2S), pri istim uslovima skladištenja, detektovana je primetno manja promena praćenih reoloških parametara u odnosu na odgovarajuću podlogu (M) (slika 13a, slika 14a). S tim u vezi, nalazi kontinualnih reoloških merenja ukazali su na povoljniju fizičku stabilnost razvijene podloge

stabilizovane APG emulgatorima u odnosu na oficinalnu podlogu, u pogledu potencijala za inkorporiranje ekstrakta (U-NK) u datoj koncentraciji.

**Tabela 15.** Električna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) i pH poredbenih uzoraka: podloge- Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011 i krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim  $\text{CO}_2$  (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u podlogu N (N2S), 7, 30 i 90 dana nakon izrade

Oznaka uzorka	Električna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )			pH		
	7. dan	30. dan	90. dan	7. dan	30. dan	90. dan
N	73,70 $\pm$ 0,09	73,30 $\pm$ 0,23	110,70 $\pm$ 0,87	7,37 $\pm$ 0,23	7,15 $\pm$ 0,52	7,47 $\pm$ 0,07
N2S	83,60 $\pm$ 0,15	85,90 $\pm$ 1,02	131,60 $\pm$ 0,30	7,30 $\pm$ 0,01	7,32 $\pm$ 0,04	7,47 $\pm$ 0,17

Rezultati merenja električne provodljivosti poredbenih uzoraka, sprovedenih sa ciljem ispitivanja njihove koloidne strukture i procene fizičke stabilnosti, prikazani su u tabeli 15. Vrednost električne provodljivosti oficinalne podloge (N), dobijena u inicijalnim merenjima (7 dana nakon izrade), bila je više od očekivane (preko 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), odnosno u opsegu pravih u/v emulzionih sistema. Međutim, kao i u slučaju APG podloge (odjeljak 4.2.2.1.5.), visoke vrednosti ovog parametra (neuobičajene za emulzione sisteme stabilizovane nejonskim mešanim emulgatorima) mogu se pripisati uticaju slobodnih jona, a ne nedovoljnoj strukturiranosti emulzionog sistema, naročito ukoliko se u obzir uzmu nalazi TGA merenja (tabela 14). Sa druge strane, iako su jedini jonski entiteti u obe podloge poticali od konzervansa (kalijum-sorbata), koji je korišćen u istoj koncentraciji (0,5 % (m/m)), inicijalno izmerena električna provodljivost bila je znatno niža u oficinalnoj (73,70 $\pm$ 0,09  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) u odnosu na APG podlogu (204,40 $\pm$ 0,13  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), što se može pripisati različitom vremenu koje je potrebno za postizanje finalne koloidne strukture navedenih sistema. Ova pretpostavka je u skladu sa izmerenim vrednostima električne provodljivosti nakon 30 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, koje su, kao što je ranije opisano (odjeljak 4.2.2.1.5.), ukazale na primetno smanjenje provodljivosti u podlozi na bazi APG emulgatora (91,50 $\pm$ 0,54  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), za razliku od gotovo iste vrednosti ovog parametra u oficinalnoj podlozi (73,30 $\pm$ 0,23  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Nasuprot ovome, u obe ispitivane podloge uočen

je porast električne provodljivosti pri sledećem merenju, sprovedenom nakon 90 dana čuvanja uzoraka u navedenim uslovima ( $110,70 \pm 0,87 \mu\text{S/cm}$  za podlogu N, odnosno  $181,00 \pm 0,21 \mu\text{S/cm}$  za podlogu M).

Kada je reč o poredbenom uzorku N2S, čini se da je dodatak ekstrakta (U-NK) imao obrnut uticaj na električnu provodljivost odgovarajuće podloge (N), u odnosu na korespondentne APG uzorke (M2S i M). Naime, inicijalna merenja otkrila su da je inkorporiranje U-NK u oficinalnu podlogu dovelo do izvesnog porasta električne provodljivosti ( $83,60 \pm 0,15 \mu\text{S/cm}$  u uzorku N2S vs.  $73,70 \pm 0,09 \mu\text{S/cm}$  u uzorku N), odnosno do njenog smanjenja u slučaju dodatka ekstrakta u APG podlogu u istoj koncentraciji i istim postupkom inkorporiranja ( $199,50 \pm 0,56 \mu\text{S/cm}$  u M2S vs.  $204,40 \pm 0,13 \mu\text{S/cm}$  u M). Dodatno, oba krema sa U-NK (N2S i M2S) pratila su isti trend promene ovog parametra u funkciji vremena skladištenja kao i odgovarajuće podloge (N i M, respektivno) (tabela 12, tabela 15).

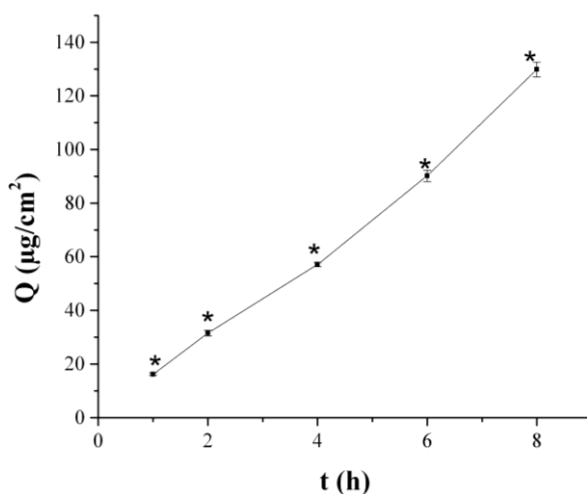
Poznato je da porast električne provodljivosti tokom skladištenja kremova može da ukaže na određene promene u fizičkim karakteristikama ovih emulzionih sistema, odnosno može se interpretirati pre svega kao odraz njihove fizičke nestabilnosti. S tim u vezi, smatra se da je stabilnost emulzionog sistema utoliko veća, ukoliko je porast električne provodljivosti manji i nastupi kasnije (Korhonen i sar., 2001). U našem istraživanju, u poredbenim i odgovarajućim APG uzorcima, sa izuzetkom APG podloge (M), uočen je porast provodljivosti tokom 90 dana čuvanja na sobnoj temperaturi, u odnosu na vrednosti izmerene 7 dana nakon izrade (tabela 12, tabela 15). Ukoliko se uzme u obzir inicijalno smanjenje ovog parametra kod oba APG uzoraka (M i M2S) u toku prvih 30 dana, njegov ukupan porast može se smatrati više izraženim u ovim uzorcima u odnosu na poredbene (N i N2S) (tabela 12, tabela 15). Ipak, dobro je poznato da se za definitivnu procenu fizičke stabilnosti emulzionog sistema relevantnim smatraju parametri dobijeni primenom više različitih metoda. U tom smislu, veći stepen porasta električne provodljivosti u APG uzorcima u odnosu na poredbene nije u skladu sa napred navedenim nalazima reoloških merenja. Sa druge strane, uzorak N2S bio je jedini u kojem je detektovan permanentan rast električne provodljivosti tokom perioda od 90 dana skladištenja na sobnoj temperaturi (tabela 15). Dodatno uzimajući u obzir prethodno diskutovane promene u reološkom

ponašanju ovog uzorka tokom perioda od 90 dana, navedena zapažanja trebalo bi uzeti u obzir pri evaluaciji njegove dugoročne stabilnosti. Uopšte uzev, usled određenih neslaganja reoloških i merenja električne provodljivosti, dodatna ispitivanja neophodna su za konačnu procenu fizičke stabilnosti poredbenog krema sa ekstraktom (N2S) u odnosu na korespondentni uzorak stabilizovan APG emulgatorima (M2S).

I u slučaju poredbenih uzoraka (N i N2S), inicijalno izmerene pH vrednosti potvrdile su pogodnost njihove primene na koži. Dodatno, izmerene vrednosti ostale su slične tokom perioda čuvanja od 90 dana na sobnoj temperaturi, ukazujući na njihovu zadovoljavajuću preliminarnu hemijsku stabilnost (tabela 15).

#### 4.2.3.2. *In vitro* ispitivanje liberacionih profila usninske kiseline iz poredbene podloge

*In vitro* „skrining“ oslobađanja ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub>, U-NK (praćeno preko usninske kiseline) sprovedena je iz poredbenog uzorka, N2S upotrebom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije, pri istim uslovima opisanim kod korespondentnog APG uzorka, M2S.



**Slika 22.** *In vitro* „skrining“ oslobađanja usninske kiseline iz krema sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji suspendovanim u podlogu-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 (N2S) (\* ukazuje na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u kumulativnoj količini usninske kieline oslobodene iz N2S u poređenju sa odgovarajućim APG uzorkom, M2S)

Statistička analiza liberacionih profila usninske kiseline ukazala je na značajno veći stepen oslobađanja ovog jedinjenja iz oficinalne u odnosu na APG podlogu, u svim tačkama ispitivanja (slika 22). Dodatno, sprovedeno ispitivanje liberacije usninske kiseline ukazalo je i na veću brzinu njenog oslobađanja iz oficinalne, u odnosu na APG podlogu (N2S vs. M2S, Slika 22). Kao i u slučaju odgovarajućeg APG uzorka (M2S), fitovanjem dobijenog profila oslobađanja kroz odgovarajuće kinetičke modele, utvrđeno je da liberacija usninske kiseline iz poredbenog uzorka (N2S) takođe prati kinetiku nultog reda ( $R^2=0,9929$ ).

Dobijeni profili oslobađanja usninske kiseline nisu bili očekivani, ukoliko se u obzir uzmu viskoziteti ispitivanih uzoraka. Preciznije, nejasno je kako je oslobađanje usninske kiseline intenzivnije iz daleko viskoznijeg uzorka (N2S), s obzirom da je generalno prihvaćeno da su stepen i brzina liberacije obrnuto proporcionalni viskozitetu nosača (Gallagher i sar., 2003). Ovo se može objasniti razlikama u specifičnoj koloidnoj strukturi poredbenog (N2S) i odgovarajućeg APG uzorka (M2S), odnosno specifičnom lokalizacijom/distribucijom ekstrakta talusa *U. barbata*-e dobijenog pomoću natkritičnog CO<sub>2</sub> (U-NK) u navedenim emulzionim sistemima.

Najpre, treba naglasiti da je ukupna količina oslobođene usninske kiseline na kraju eksperimenta generalno bila mala iz oba uzorka ( $129,86 \pm 2,77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  iz uzorka N2S, odnosno  $54,59 \pm 2,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  iz uzorka M2S, što bi u procentima iznosilo  $3,47 \pm 0,23 \%$  iz uzorka N2S, odnosno  $1,46 \pm 0,31 \%$  iz uzorka M2S). Osim ranije diskutovane hidrofobne prirode same supstance, mali procenat oslobođene usninske kiseline nakon 8h ispitivanja može se tumačiti svojevrsnim „zarobljavanjem” njenog najvećeg dela u ispitivanim emulzionim sistemima, te produženim (engl. *sustained*) oslobađanjem, koje je, s tim u vezi, u slučaju oba uzorka (M2S i N2S) pratilo kinetiku nultog reda. Ipak, u skladu sa rezultatima *in vitro* studije oslobađanja, čini se da je navedeni fenomen izraženiji u slučaju APG u odnosu na oficinalnu podlogu, sugerišući da je bolja liberacija usninske kiseline iz poredbenog uzorka (N2S) u vezi sa većom dostupnošću ovog jedinjenja za difuziju u odnosu na odgovarajući APG uzorak (M2S). Ovde se treba podsetiti prethodno diskutovanih rezultata ispitivanja emulzija stabilizovanih APG emulgatorima (odeljak 4.2.2.), koji su ukazali da U-NK u uzorku M2S stupa u interakciju sa hidrofobnim

domenima lamelarnih mezofaza (predominantno sa alkil lancima APG emulgatora u tečnokristalnoj fazi oko dispergovanih kapi uljane faze, ali i alkil lancima APG emulgatora i/ili masnog alkohola u lamelarnoj hidrofilnoj gel fazi), koja dovodi do poboljšanja rastvorljivosti usninske kiseline. Slično, Makai i saradnici (2003) pokazali su interlamelarnu lokalizaciju tenoksikama (kao model lekovite supstance slabe rastvorljivosti u vodi) u emulzionom sistemu na bazi poli-oksietilen-10-oleil etra, koja je uslovlila produženo oslobađanje ovog leka, takođe kinetikom nultog reda. Dodatno, u literaturi je opisana i hidrofobna interakcija same usninske kiseline sa alifatičnim lancima fosfolipida u flotirajućim monoslojevima (Andrade i sar., 2006) i dvoslojevima liposoma (Lira i sar., 2009). U vezi sa napred navedenim, logično je pretpostaviti da manja količina ekstrakta/usninske kiseline u uzorku M2S stupa u interakciju sa hidrofobnim domenima (alkil lancima) masnih alkohola u višku koji formiraju lipofilnu gel fazu. Sa druge strane, na osnovu rezultata ispitivanja koloidne strukture poredbenog uzorka N2S, kao i nalaza „*skringa*“ njegovih biofarmaceutskih karakteristika (*in vitro* ispitivanja oslobađanja usninske kiseline), može se pretpostaviti da se usninska kiselina u ovom uzorku prevashodno insertuje upravo u ovu (lipofilnu gel) fazu, kao dominantno razvijenu, čineći je lakše dostupnom za difuziju/oslobađanje. Ovakav nalaz istovremeno upućuje na odlučujuću ulogu hidrofobnih interakcija usninske kiseline i alkil lanaca tečno-kristalne, hidrofilne gel i/ili lipofilne gel faze na kontrolu njenog oslobađanja. Slične zaključke doneli su i Lira i saradnici (2009), koji su utvrdili da upravo snažna interakcija molekula usninske kiseline sa fosfolipidima iz liposoma kontroliše njeno oslobađanje iz ovih koloidnih nosača.

#### **4.2.4. Komparativna *in vivo* procena dermalne raspoloživosti usninske kiseline iz podloge stabilizovane APG emulgatorima i poredbene podloge**

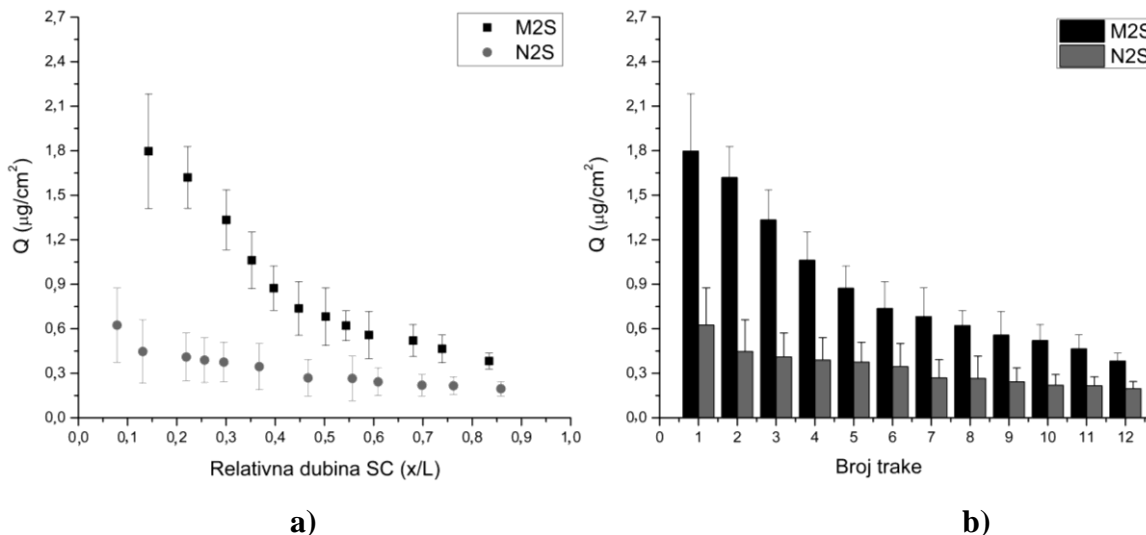
U daljim eksperimentima bilo je od značaja ispitati uticaj koloidne strukture razvijene APG i oficinalne podloge na dermalnu raspoloživost i time potencijalnu terapijsku efikasnost usninske kiseline, jedinjenja koje se, na osnovu literaturnih podataka, ali i rezultata prve faze eksperimenata (odeljak 4.1.2.2.) može smatrati odgovornim za antimikrobnu aktivnost ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK), korišćenog u funkciji aktivnog sastojka ispitivanih hidrofilnih kremova. Za tu

svrhu korišćena je *tape stripping* metoda, prema protokolu ispitivanja razvijenom od strane Pantelić (2013), za koji je pokazano da je dovoljno diskriminatoran da pruži podatke o stepenu penetracije lekovitih supstanci iz primenjenih podloga.

Stepen penetracije usninske kiseline iz ispitivanih podloga bio je značajno veći iz APG uzorka (M2S) u poređenju sa poredbenim (N2S), rezultujući višim nivoima ovog jedinjenja u svim slojevima *stratum corneum* (slika 23). Isto se ne može reći za brzinu penetracije, s obzirom da su oba uzorka uslovila istu dubinu isporuke usninske kiseline u kožu (slika 23). Primećeno poboljšanje stepena penetracije usninske kiseline iz APG u odnosu na oficinalnu podlogu pri istoj koncentraciji ekstrakta talusa *U. barbata* dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) inkorporiranog u emulzioni sistem istim postupkom (suspendovanjem u gotovu podlogu) ne može se dovesti u vezu sa njenim prethodno diskutovanim liberacionim profilom iz navedenih podloga. Ovakav nalaz bio je donekle očekivan, uzimajući u obzir ranija istraživanja emulzionih sistema za primenu na koži, koja su pokazala da nije moguće uspostaviti jasnu korelaciju između rezultata *in vitro* ispitivanja oslobađanja aktivne supstance iz nosača i njene perkutane apsorpcije, ispitane *in vivo* (Hosmer i sar., 2011; Pantelic i sar., 2014a).

Uočeni izostanak korelacije između liberacionih profila usninske kiseline i stepena njene penetracije iz ispitivanih podloga ide u prilog prethodno diskutovanoj (odjeljak 4.2.2.2.) upotrebi *in vitro* studija oslobađanja aktivne supstance kao validnog testa za procenu kritičnih atributa kvaliteta polučvrstih preparata za primenu na koži u kontekstu odabira završne (prototip) formulacije prilikom razvoja ovih proizvoda, pre pristupanja odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima. Ovo je u vezi sa fenomenima koji se dešavaju pri realnim uslovima primene topikalnih preparata, kao što su promene u strukturi samih nosača nakon aplikacije na kožu i interakcije komponenata formulacije sa *stratum corneum* (SC), koji mogu dovesti do povećanja ukupnog termodinamičkog potencijala aktivne susptance u SC-matriksu i sledstvenog poboljšanja njene penetracije (Hosmer i sar., 2011; Pantelic i sar., 2014a). S tim u vezi, rezultati dosadašnjih istraživanja emulzionih sistema sa APG emulgatorima pokazala su da se njihov inherentan potencijal za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci u kožu može dovesti u vezu sa interakcijama tečnokristalnih faza prisutnih u ovim sistemima i intercelularnih lipida SC, koje doprinose fluidnijem lipidnom

pakovanju i posledičnom povećanju njegove permeabilnosti, odnosno olakšane difuzije aktivnih supstanci (Makai i sar., 2003; Hosmer i sar., 2011; Pantelic i sar., 2014a).



**Slika 23.** Penetracioni profili usninske kiseline iz ispitivanih kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) u koncentraciji koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji, inkorporiranim suspendovanjem u gotovu podlogu (krem sa podlogom stabilizovanom APG emulgatorima (uzorak M2S) i poredbeni krem sa oficinalnom podlogom, Nejonskim hidrofilnim kremom, DAB 2011 (uzorak N2S)), kao odraz uticaja koloidne prirode primenjene podloge na njenu dermalnu raspoloživost *in vivo*: a) prikaz penetracionih profila usninske kiseline u SC(*stratum corneum*) (srednja vrednost, n=4), b) koncentracija usninske kiseline (µg/cm<sup>2</sup>) u različitim slojevima SC



### **4.3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada**

#### **4.3.1. Procena efikasnosti razvijene prototip formualcije krema stabilizovanog APG emulgatorima i odgovarajućeg poredbenog krema**

##### **4.3.1.1. *In vitro* procena antimikrobnog potencijala kremova sa ekstraktom**

U skladu sa rezultatima procene antimikrobne aktivnosti ekstrakta talusa *U. barbata* koji je dobijen ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (odeljak 4.1.2.2.), procena antimikrobne aktivnosti prototip formualcije finalnog proizvoda-krema na bazi APG emulgatora (uzorak M2S) i odgovarajućeg poredbenog krema (N2S) sprovedena je samo na G+ bakterijama (isti sojevi koji su korišćeni za ispitivanje ekstrakata).

Rezultati ispitivanja antimikrobnog potencijala ispitivanih kremova prikazani su u tabeli 16. Razvijena podloga stabilizovana APG emulgatorima (M) i poredbena/oficinalna podloga-Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 (N) poslužile su kao negativna kontrola za odgovarajuće kremove sa ekstraktom (M2S i N2S, respektivno). MIK vrednosti prikazane su za usninsku kiselinu kao aktivni sastojak ispitivanih kremova (teorijske vrednosti izračunate na osnovu MIK vrednosti dobijenih za odgovarajuće kremove sa ekstraktom i masenog udela usninske kiseline u njima) i za usninsku kiselinu kao intaktnu supstancu (MIK dobijene u prvoj fazi eksperimenata) (Asterholm i sar., 2010).

Nijedna od ispitivanih podloga (tabela 16) nije pokazala antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih mikroorganizama (MIK vrednosti veće od 2560,00 µg/ml). Sa druge strane, oba krema sa ekstraktom (M2S i N2S) pokazala su potencijal za inhibiciju rasta ispitivanih bakterija. U skladu sa tim, usninska kiselina kao aktivni sastojak ispitivanih kremova (M2S i N2S) pratila je isti trend (tabela 16). Teorijske MIK vrednosti izračunate za usninsku kiselinu bile su u dobroj korelaciji sa onima dobijenim za ovo jedinjenje *per se* (tabela 16), ukazujući na njenu zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost protiv testiranih bakterija, nakon inkorporiranja ekstrakta (U-NK) u ispitivane nosače u datoj koncentraciji. S tim u vezi, poređenjem antimikrobne aktivnosti kremova M2S i N2S utvrđeni su isti inhibicioni spektri oba ispitivana uzorka protiv bakterijskih sojeva MRSA ATCC 33591 i

kliničkog izolata *E. faecalis*, dok je uzorak M2S bio aktivniji protiv bakterija *S. aureus* ATCC 25923 i kliničkog izolata *S. epidermidis* (tabela 16).

**Tabela 16.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK vrednosti), izražene u µg/ml, ispitivanih uzoraka: APG podloge (M) i poredbene podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011(N) (negativna kontrola); kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji) suspendovanim u podlogu M (M2S), odnosno u podlogu N (N2S) i usninske kiseline (kao aktivnog sastojka krema (M2S i N2S) i *per se*)

Oznaka uzorka	MIK (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 33591	<i>S. epidermidis</i> (KI)	<i>E. faecalis</i> (KI)
M	-	-	-	-
M2S	1280,00	320,00	40,00	80,00
Usninska kiselina (kao aktivni sastojak M2S) <sup>a</sup>	25,60	6,40	0,80	1,60
N	-	-	-	-
N2S	2560,00	320,00	80,00	80,00
Usninska kiselina (kao aktivni sastojak N2S) <sup>b</sup>	51,20	6,40	1,60	1,60
Usninska kiselina ( <i>per se</i> )	10,00	5,00	1,25	2,50

<sup>a</sup>vrednost izračunata množenjem koncentracije usninske kiseline u M2S i MIK ovog uzorka

<sup>b</sup>vrednost izračunata množenjem koncentracije usninske kiseline u N2S i MIK ovog uzorka

#### 4.3.1.2. *In vivo* procena efekata ispitivanih podloga na nespecifične simptome infekcije kože

Pored ispitivanja kremova sa ekstraktom da inhibiraju rast bakterija koji uobičajeno izazivaju kutane infekcije, efikasnost ovih preparata u potencijalnoj lokalnoj terapiji navedene grupe kožnih bolesti dodatno je ispitana kroz procenu kapaciteta njihovih

podloga da poprave barijernu funkciju kože narušenu infekcijom i utiču na eritem, kao jedan od njenih nespecifičnih (pratećih) simptoma. Za tu svrhu korišćeno je *in vivo* merenje odgovarajućih biofizičkih parametara (TEGV i EI) veštački iritirane kože, primenom testa sa natrijum-laurilsulfatom (SLS).

Okluzivna primena SLS rezultirala je značajnim porastom TEGV u poređenju sa bazalno izmerenim vrednostima ovog parametra (tabela 17). Tretman APG (uzorak M) i poredbenom podlogom (uzorak N) značajno je redukovao TEGV već nakon 2 dana u poređenju sa vrednostima TEGV nakon iritacije, ali i onim izmerenim na netretiranom test-mestu koje je iritirano rastvorom SLS (netretirana iritirana kontrola, NIK). Dalja primena obe ispitivane podloge dodatno je smanjila vrednost TEGV, koji je bio na istom nivou kao pri inicijalnim merenjima (pre iritacije), ukazujući na njihov potencijal da repariraju narušenu barijernu funkciju kože nakon 4-dnevnog tretmana.

Kada je reč o EI, okluzivna primena SLS nije dovela do značajnog porasta ovog parametra ni na jednom test-mestu. Dodatno, nakon 4-dnevnog tretmana ispitivanim podlogama nije uočena statistički značajna promena EI u odnosu na inicijalno izmerene vrednosti i obe kontrole (tabela 17). S tim u vezi, nasuprot očekivanom, SLS test nije uspeo da pruži više podataka o uticaju ispitivanih podloga na eritem, kao jedan od uobičajenih simptoma koji prate infekcije kože.

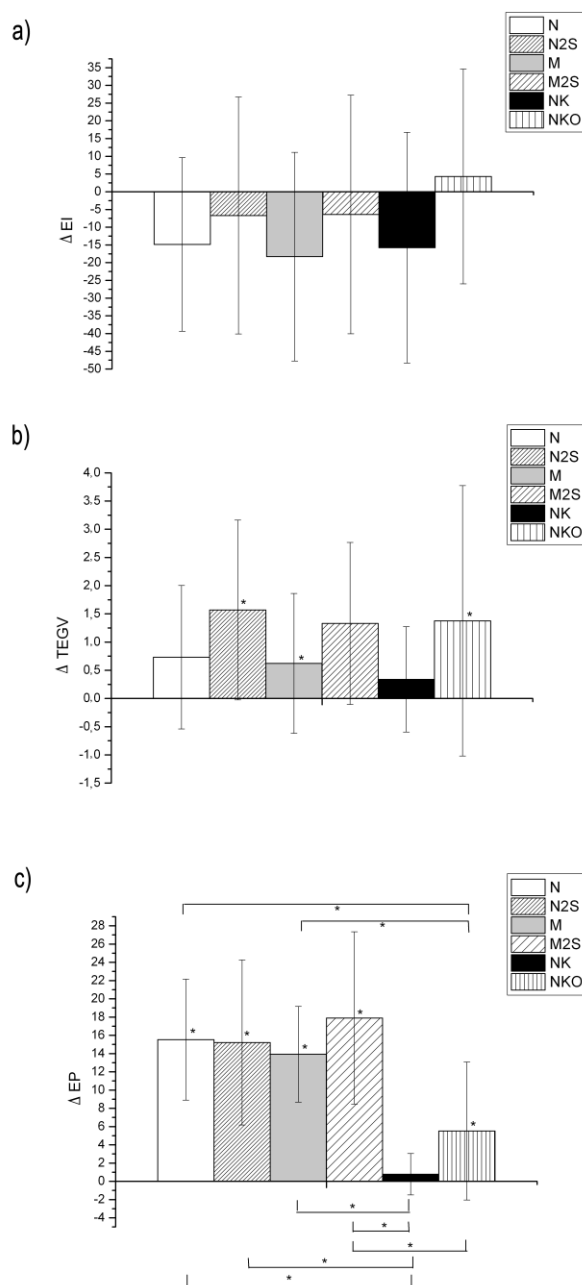
#### **4.3.2. *In vivo* procena bezbednosti razvijene prototip formulacije krema stabilizovanog APG emulgatorima i odgovarajućeg poredbenog krema**

Konačno, eksperimenti doktorske disertacije zaokruženi su evaluacijom preliminarnog bezbednosnog profila odabrane prototip formulacije finalnog proizvoda-krema stabilizovanog APG emulgatorima i odgovarajućeg poredbenog krema (kao i njihovih korespondentnih podloga), kroz procenu ključnih biofizičkih parametara kože nakon primene navedenih uzoraka.

Ispitivani uzorci pokazali su generalno zadovoljavajuće bezbednosne profile nakon sprovedene 24-h studije pod okluzijom (slika 24).

**Tabela 17.** Efekti ispitivanih podloga (APG podloge (M) i poredbene podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011(N)) na kožu humanih dobrovoljaca iritiranu natrijum-laurilsulfatom (SLS). Efekti testiranih podloga na transepidermalni gubitak vode (TEGV) i eritema indeks (EI) poređeni su među sobom i sa obe kontrole (netretirana iritirana kontrola, NIK i netretirana neiritirana kontrola, NNK). Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) su obeležene (\*) (ANOVA za ponovljena merenja, podaci u redovima) i (#) (jednofaktorska ANOVA, podaci u kolonama). Vrednosti koje su bile signifikantne nakon post-hok Tukey testa označene su u superskriptu odgovarajućih vrednosti (oznakama uzoraka M i N, odnosno kontrola, NIK i NNK), dok su signifikantne vrednosti nakon post-hok t-testa za sparene uzorke označene odgovarajućim slovima u superskriptu p vrednosti

Oznaka uzorka	Bazalna vrednost (a)	Nakon SLS iritacije (b)	Nakon 2-dnevnog tretmana (c)	Nakon 4-dnevnog tretmana (d)	p-vrednosti (ANOVA za ponovljena merenja)	
<b>TEGV</b>	Kontrola (NIK)	10,5±1,7	14,7±5,4	13,9±4,4 <sup>NNK,M,N</sup>	11,1±3,5 <sup>NNK, M,N</sup>	<b>&lt;0,001</b> *;a:b; a:c;a:d;b:d;c:d
	Kontrola (NNK)	10,4±1,2 <sup>M</sup>	9,5±1,0	9,3±1,7 <sup>NIK</sup>	8,6±1,2 <sup>NIK</sup>	<b>0,054</b>
	M	8,5±1,5 <sup>NNK</sup>	9,9±2,7	7,8±1,6 <sup>NIK</sup>	7,1±2,4 <sup>NIK</sup>	<b>0,004</b> *; a:b; b:c;b:d;c:d
	N	8,3±1,3	10,1±2,7	9,0±2,1 <sup>NIK</sup>	8,2±2,1 <sup>NIK</sup>	<b>0,001</b> *;a:b; b:c;b:d;c:d
<b>p-vrednosti (jednofaktorska ANOVA)</b>	<b>0,001<sup>#</sup></b>	<b>0,061</b>	<b>0,000<sup>#</sup></b>	<b>0,002<sup>#</sup></b>	-	
<b>EI</b>	Kontrola (NIK)	192,7±34,1	206,9±48,4	213,5±39,6	220,0±25,9	<b>0,059</b>
	Kontrola (NNK)	205,3±51,6	190,3±35,2	204,6±39,1	211,1±47,1	<b>0,110</b>
	M	183,3±58,0	188,2±42,4	184,5±32,5	192,1±5,1	<b>0,800</b>
	N	187,4±45,3	192,5±30,3	186,7±35,1	185,1±40,6	<b>0,846</b>
<b>p-vrednosti (jednofaktorska ANOVA)</b>	<b>0,801</b>	<b>0,468</b>	<b>0,215</b>	<b>0,282</b>	-	



**Slika 24.** Efekti podloga (APG podloge (M) i i poredbene podloge-Nejonskog hidrofilnog krema, DAB 2011(N) i kremova sa ekstraktom talusa *U. barbata* dobijenim ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (U-NK) (koji odgovara sadržaju od 2 % (m/m) usninske kiseline u finalnoj formulaciji suspendovanim u podlogu M (M2S) odnosno u podlogu N (N2S) na: a) eritema indeks (EI), b) transepidermalni gubitak vode (TEGV) i c) električnu provodljivost (EP). Rezulati su prikazani kao apsolutne promene srednjih vrednosti i standardnih grešaka srednje vrednosti prema baznoj liniji. Efekti testiranih formulacija su poređeni među sobom i sa obe kontrole (pod okluzijom, NKO i bez okluzije, NK). Statistički značajne razlike su obeležene \* (p<0,05)

Dva sata nakon uklanjanja okluzije nije bilo statistički značajne promene EI, koji je čak bio snižen u odnosu na inicijalna merenja bazalnih vrednosti na svim test-mestima (sa izuzetkom netretirane kontrole pod okluzijom, NKO), ukazujući na dobru podnošljivost ispitivanih formualcija na koži (slika 24a).

Što se tiče TEGV (slika 24b), ovaj parametar je bio značajno povišen na test-mestima tretiranim APG podlogom (M) i poredbenim kremom sa ekstraktom (N2S) u odnosu na odgovarajuće bazalne vrednosti, ali ne i vrednosti izmerene na mestima koja su ostavljena kao netretirane kontrole (bez okluzije, NK i pod okluzijom, NKO). Međutim, uočeno povećanje TEGV treba pripisati uticaju same okluzije kože Parafilmom, uzimajući u obzir činjenicu da je ovaj parametar bio značajno viši u odnosu na inicijalno izmerenu vrednost i na test-mestu NKO (Taylor i sar., 2002).

Kada je reč o EP, svi uzorci prouzrokovali su izvesno povećanje vrednosti datog parametra (slika 24c). Uočeno povećanje može se smatrati statistički značajnim u slučaju APG uzoraka (M i M2S) i oficinalne podloge (N) u poređenju sa bazalnim vrednostima i obe kontrole (NK i NKO). Sa druge strane, na test-mestu tretiranom poredbenim kremom sa ekstraktom (N2S) uočeno povećanje EP bilo je značajno u odnosu na bazalno izmerenu vrednost, kao i na vrednost detektovanu na test-mestu NK, ali ne i NKO.

## 5. ZAKLJUČAK

### *I faza eksperimentalnog rada*

1. Hemijska analiza ispitivanih ekstrakata talusa *U. barbata* ukazala je na najviši sadržaj ukupnih polifenola, odnosno usninske kiseline (kao glavnog identifikovanog fenolnog jedinjenja) u ekstraktu dobijenom pomoću natkritičnog CO<sub>2</sub> (U-NK), u odnosu na ekstrakte ovog lišaja dobijene konvencionalnim metodama (ekstrakcija po Soxhlet-u dietil-etrom i etanolom i maceracija etanolom).
2. Ekstrakt U-NK je pokazao i najbolju aktivnost među ispitivanim ekstraktima talusa *U. barbata* u svim testovima bioloških svojstava: ispitivanju citotoksičnosti prema tumorskim ćelijama (B16 mišji melanom i C6 pacovski gliom), kao i u ispitivanju antimikrobnog potencijala protiv odabranih bakterija koje izazivaju infekcije kože i testu antioksidativne aktivnosti (FRAP test).
3. Aktivnost ekstrakta U-NK bila je ekvivalentna usninskoj kiselini *per se* u ispitivanju antimikrobnog i antioksidativnog potencijala, dok je u testu citotoksičnosti prema tumorskim ćelijama, U-NK pokazao bolju aktivnost od čiste supstance, što se može dovesti u vezu sa oksidativnim stresom koji ovaj ekstrakt (nasuprot usninskoj kiselini) izaziva u ispitivanim ćelijama.
4. U-NK je, na osnovu najboljeg odnosa antimikrobnog potencijala protiv ispitivanih bakterija koje su izazivači infekcija kože i citotoksičnosti prema HaCaT humanim keratinocitima, odabran za dalje faze istraživanja.

### *II faza eksperimentalnog rada*

5. Primenom dva novija alkil poliglukozidna (APG) nejonska mešana emulgatora različite dužine ugljovodoničnog lanca: 1) C<sub>14-22</sub> alkohol i C<sub>12-20</sub> glukozid 2) koko glukozid i alkohol kokosovog oraha, uspešno je formulisana emulziona podloga tipa hidrofilnog krema (M), zadovoljavajućih senzornih (estetskih i aplikativnih) karakteristika (procenjeno organoleptički), što se smatra važnim svojstvom savremenih nosača za lekove koji se primenjuju na koži. Lakoća u primeni razvijene APG emulziona podloge potvrđena je i kontinualnim reološkim merenjima, dok su

polarizaciona mikroskopija i termoanalitička merenja ukazali na dobar potencijal upotrebljenih emulgatora u stvaranju lamelarnih mezofaza oba tipa (tečnokristalna i lamelarna gel faza), koje su obezbedile zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost sistema, što je potvrđeno odgovarajućim ponovljenim merenjima (pH, električne provodljivosti i reoloških parametara).

6. Fizičko-hemijske osobine ekstrakta U-NK, određene u preformulacionoj studiji, bile su uporedive sa čistom usninskom kiselinom, što je bilo očekivano s obzirom na visok sadržaj ovog jedinjenja u ispitivanom ekstraktu, ukazujući na njegovu veoma slabu rastvorljivost kako u polarnim (voda), tako i u nepolarnim rastvaračima (trigliceridi srednje dužine lanca), ipak sa izraženijim hidrofobnim karakterom, što je potvrđeno izmerenim particionim koeficijentom  $i$ , dodatno, određenim kontaktnim uglom, koji je istovremeno ukazao na svojstvo čestica ekstrakta da se adsorbuju na granici faza ulje-voda, dok je skenirajućom elektronskom mikroskopijom uočen naglašen afinitet ovih čestica ka agregaciji.
7. Fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih kremova pokazala je da je uticaj dodatka U-NK na koloidnu strukturu emulziona podloge sa APG emulgatorima (formiranje lamelarnih faza-utvrđeno polarizacionom mikroskopijom, reološko/fazno ponašanje i distribuciju vode-utvrđeno reološkim i termoanalitičkim merenjima) zavisao kako od njene koncentracije (koja je odgovarala sadržaju usninske kiseline od 1, 2 i 4 % (m/m) u finalnoj formulaciji), tako i od načina inkorporiranja (suspendovanjem u gotovu emulzionu podlogu (S uzorci) ili dispergovanjem u masnoj fazi krema, pre mešanja sa vodenom fazom (D uzorci)).
8. Primenom Raman spektralne mikroskopije, a u skladu sa rezultatima preformulacione studije ekstrakta, utvrđeno je da U-NK učestvuje u koloidnoj strukturi ispitivanih kremova obe serije (S i D) putem istih mehanizama i to: 1) agregacijom čestica ekstrakta, 2) adsorpcijom čestica ekstrakta na granici faza ulje-voda i 3) interakcijom čestica ekstrakta sa hidrofobnim domenima formiranih lamela. Ipak, variranje načina inkorporiranja ekstrakta u ispitivane kremove rezultovao je razlikama u njihovoj koloidnoj strukturi, na koju je dodatno uticala i koncentracija dodatog ekstrakta. S tim u vezi, pokazano je da je suspendovanje U-



NK u krem podlogu stabilizovanu APG emulgatorima pogodniji način njegovog inkorporiranja, sa aspekta preliminarne fizičke stabilnosti.

9. Dalja *in vitro* studija liberacije upotrebom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije, pokazala je da navedene razlike u koloidnoj strukturi S i D uzoraka imaju odlučujuću ulogu kada je reč o oslobađanju usninske kiseline, ističući M2S (u kojem je ekstrakt suspendovan u APG emulzionu podlogu u koncentraciji koja odgovara sadržaju usninske kiseline od 2 % (m/m) u finalnoj formulaciji) kao krem sa najvećom brzinom i obimom liberacije ovog jedinjenja, što se može dovesti u vezu sa njegovom poboljšanom rastvorljivošću u ovom uzorku, koji je posledica interakcije čestica U-NK sa hidrofobnim domenima formiranih lamelarnih mezofaza. Iz navedenih razloga, uzorak M2S je izabran za dalje faze istraživanja, kao prototip formulacija finalnog proizvoda na bazi APG emulgatora.
10. Uporedna fizičko-hemijska karakterizacija odabrane formulacije krema sa ekstraktom, stabilizovanog APG emulgatorima-M2S i odgovarajućeg poredbenog uzorka-N2S (izrađenog istim postupkom inkorporiranja U-NK tj. suspendovanjem u oficinalnu podlogu -Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011 (N) i u istoj koncentraciji (2 % (m/m)) usninske kiseline u finalnoj formulaciji), ukazala je na inherentne razlike u njihovoj koloidnoj strukturi. Naime, nasuprot koloidnoj stukturi APG uzoraka (M i M2S) zasnovanoj na prisustvu lamelarne mezofaze oba tipa, matriksna struktura poredbenih uzoraka (N i N2S), uočena primenom polarizacione mikroskopije, pripisana je dominantnom formiranju lipofilne gel faze u ovim uzorcima, što je potvrđeno i daljim termoanalitičkim ispitivanjima. Navedene razlike u koloidnoj stukturi ispitivanih kremova dodatno su potvrđene kontinualnom reološkom analizom, koja je istovremeno pokazala da postoje značajno poboljšane estetske/aplikativne osobine uzoraka stabilizovanih APG emulgatorima u odnosu na poredbene.
11. Pored toga, kontinualna reološka analiza pokazala je zadovoljavajuću sposobnost emulziona podloge sa APG emulgatorima da ostane fizički stabilna nakon dodatka U-NK u datoj koncentraciji (uzorak M2S), u poređenju sa poredbenom podlogom (uzorak N2S). Ipak, usled određenih neslaganja konduktometrijskih merenja sa

navedenim reološkim nalazima, dodatna ispitivanja su potrebna za konačnu procenu fizičke stabilnosti poredbenog krema sa ekstraktom (N2S) u odnosu na korespondentni uzorak stabilizovan APG emulgatorima (M2S). Sa druge strane, izmerene vrednosti pH tokom 90 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, koje su se minimalno menjale, ukazale su na zadovoljavajuću preliminarnu hemijsku stabilnost i APG i poredbenih uzoraka.

12. Preliminarnim „*skringom*“ biofarmaceutskih karakteristika poredbenog krema sa ekstraktom (N2S), uočen je značajno veći obim i brzina oslobađanja usninske kiseline u odnosu na korespondentni APG uzorak (M2S), pri istim uslovima ispitivanja (*in vitro* studija liberacije upotrebom sistema Franz-ove vertikalne difuzione ćelije). Iako je oslobađanje usninske kiseline bilo malo iz oba ispitivana krema, njeno značajno bolje otpuštanje iz daleko viskoznijeg poredbenog uzorka (N2S) u odnosu na odgovarajući APG uzorak (M2S), može se dovesti u vezu sa specifičnom distribucijom U-NK u navedenim emulzionim sistemima. Naime, zaključeno je da u oba uzorka, ekstrakt stupa u hidrofobne interakcije sa alkil lanacima surfaktanta i/ili masnog amfilila, koji vodi solubilizaciji usninske kiseline i posledično njenom boljem oslobađanju. Ipak, u uzorku M2S, navedene interakcije se dešavaju prevashodno na nivou hidrofobnih domena tečnokristalne i hidrofilne gel faze, a u manjoj meri u lipofilnog gel fazi, dok se u uzorku N2S ekstrakt, nakon suspendovanja u emulzionu podlogu (N), primarno uklapa upravo u ovu (lipofilnu gel) fazu, kao dominantno razvijenu, čineći usninsku kiselinu lakše dostupnom za difuziju i oslobađanje.
13. Nasuprot rezultatima *in vitro* studije liberacije, uporedno ispitivanje dermalne raspoloživosti usninske kiseline (što je preduslov za potencijalni terapijski efekat preparata sa ovim jedinjenjem) primenom *tape stripping* metode ukazalo je na poboljšanje stepena njene penetracije iz krema M2S u poređenju sa poredbenim uzorkom (N2S); to je u skladu sa literaturnim navodima o inherentnom potencijalu emulzionih podloga sa APG emulgatorima za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci u kožu. Dodatno, uočeni izostanak korelacije između liberacionih profila usninske kiseline i stepena njene penetracije iz ispitivanih podloga u kožu u skladu

je sa uobičajenom upotrebom *in vitro* studija oslobađanja aktivne supstance kao validnog testa za procenu kritičnih atributa kvaliteta polučvrstih preparata za primenu na koži, u kontekstu odabira završne (prototip) formulacije prilikom razvoja ovih proizvoda, pre pristupanja odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima.

### ***III faza eksperimentalnog rada***

14. Ispitivanje efikasnosti razvijene prototip formulacije finalnog proizvoda-krema sa APG emulgatorima (M2S), koji bi mogao naći potencijalnu primenu u lokalnoj terapiji infekcija kože, ukazalo je (primenom *in vitro* mikrodilucione metode u bujonu) na njenu zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost protiv odabranih G+ bakterija koje su uzročnici ovih infekcija; ova aktivnost bila je bolja u odnosu na onu pokazanu za poredbeni krem (N2S), protiv istih kutanih patogena. Pored toga, pokazan je potencijal APG podloge (M) da popravi barijernu funkciju kože narušenu infekcijom, koji je bio ekvivalentan onom uočenom za poredbenu podlogu (N); ovaj efekat procenjen je merenjem transepidermalnog gubitka vode (TEGV) u *in vivo* studiji na veštački iritiranoj koži, koja, sa druge strane, nije uspela da pruži više podataka o uticaju navedenih podloga na eritem, kao jedan od nespecifičnih simptoma koji prate infekcije kože.
15. Konačno, izostanak promene biofizičkih parametara kože poput eritema indeksa, TEGV i električne provodljivosti (kao mere njene hidratisanosti), nakon 24-h *in vivo* studije pod okluzijom, potvrdile su zadovoljavajući preliminarni bezbednosni profil razvijene prototip formulacije finalnog proizvoda-krema sa APG emulgatorima (M2S) i njene podloge (M), koji je bio ekvivalentan u poređenju sa odgovarajućim poredbenim uzorcima, u kojima je kao podloga korišćen Nejonski hidrofilni krem, DAB 2011(N2S i N).

## 6. LITERATURA

Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, Al-Jawhari DA. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins* 1996; 4: 96–102.

Al-Bawab A, Friberg SE. Some pertinent factors in skin care emulsion. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 313: 123-126.

Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Rashid M, Mahmood T, Fatima N. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated-tissues of *Piper nigrum* L. *Plant Cell Tiss Org* 2010; 102: 129–134.

Andrade CAS, Santos-Magalhaes NS, de Melo CP. Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid. *J Colloid Interf Sci* 2006; 298: 145–153.

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

Asterholm M, Karami N, Faergemann J. Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals – an *in vitro* study. *Acta Derm-Venerol* 2010; 90: 239-245.

Atalay F, Halici MB, Mavi A, Cakir A, Odabasoglu F, Kazaz C, Aslan A, Kufrevioglu OI. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Turk J Chem* 2011; 35: 647–661.

Aunhachoke K, Kulthanan K, Kullavanijaya P. A comparison of topical antibiotic mupirocin (Bactroban ®) and gentamicin (Garamycin ®) in the treatment of bacterial skin infection. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 1991; 9: 25-28.

Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv Colloid Interfac* 2003; 100–102: 503-546.

Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 37–44.

Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedorocko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 462-468.

Bagchi D, Preuss HG. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Prevention, Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2013.

Baudonnet L, Grossiord LJ, Rodriguez F. Physicochemical Characterization and In Vitro Release of Salicylic Acid from O/W Emulsions Prepared with Montanov 68®: Effect of Formulation Parameters. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 975-984.

Behera BC, Mahadik N, Morey M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharm Biol* 2012; 50: 968–979.

Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15–27.

Bessadottir M, Egilsson M, Einarsdottir E, Magnusdottir IH, Ogmundsdottir MH, Omarsdottir S, Ogmundsdottir HM. Proton-shuttling lichen compound usnic acid affects mitochondrial and lysosomal function in cancer cells. *PLoS One* 2012; 7: e51296.

Bezivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Med* 2004; 70: 874–877.

Binks BP, Clint JH. Solid Wettability from Surface Energy Components: Relevance to Pickering Emulsions. *Langmuir* 2002; 18: 1270-1273.

Binks BP, Desforges A. Synergistic Stabilization of Emulsions by a Mixture of Surface-Active Nanoparticles and Surfactant. *Langmuir* 2007; 23: 1098-1106.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199–1200.

Bogdanovic Markovic D, Tasic-Kostov M, Lukic M, Isailovic T, Krstonosic V, Daniels R, Savic S. Physicochemical characterization and *in vivo* skin performance of a novel alkyl polyglucoside emulsifier in natural cosmetic cream-bases. *Tenside Surfact Det* 2014; 51: 133-145.

Brandao LF, Alcantara GB, Matos Mde F, Bogo D, Freitas Ddos S, Oyama NM, Honda NK. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem Pharm Bull* 2013; 61: 176–183.

Breneman DL. Use of mupirocin ointment in the treatment of secondary infected dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 886-892.

- Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytother Res* 2013; 27: 431–437.
- Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med* 2009; 75: 607–613.
- Campanella L, Delfini M, Ercole P, Iacoangeli A, Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochimie* 2002; 84: 329–334.
- Cansaran D, Kahya D, Yurdakulola E, Atakol O. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C* 2006; 61: 773-776.
- Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiani O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 667–672.
- Castro M, Fernandez Cirelli A, Kovensky J. Synthesis and interfacial properties of sugar-based surfactants composed of homo- and heterodimers. *J Surfact Deterg* 2006; 9: 279-286.
- Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* 2013; 15: 41-52.
- Chen S, Dobrovolsky VN, Liu F, Wu Y, Zhang Z, Mei N, Guo L. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol Sci* 2014; 142: 33-44.
- Clerc P. Species concepts in the genus *Usnea* (lichenized Ascomycetes), *Lichenologist* 1998; 30: 321–340.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twentieth informational supplement, CLSI document M100-S20, Wayne, 2010.
- Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002; 89: 137–146.
- Csoka I, Csanyi E, Zapantis G, Nagy E, Feher-Kiss A, Horvath G, Blazso G, Eros I. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. *Int J Pharmaceut* 2005; 291: 11-19.

- Daniels R, Knie U. Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; 5: 367-382.
- Daniels R, Grysko MK. Betulsions – An innovative formulation concept for emulsifier-free w/o emulsions. *Arhiv za farmaciju* 2010; 60: 696-704.
- De Paz GA, Raggio J, Gomez-Serranillos MP, Palomino OM, Gonzalez-Burgos E, Carretero ME, Crespo A. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 165–171.
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012; Article ID 645460.
- Derkach SR. Rheology of emulsions. *Adv Colloid Interfac* 2009; 151: 1–23.
- Deutscher Arzneimittel Codex, Neues Rezeptur Formularium (DAC/NRF), Stuttgart: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn Deutscher Apotheker Verlag; 2007.
- Deutsches Arzneibuch (DAB), Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2011.
- Drucker CR. Update on topical antibiotics in dermatology. *Dermatol Ther* 2012; 25: 6–11.
- Drugs, 2015. Dostupno sa: <http://www.drugs.com> (poslednji pristup 23.12.2015.)
- Eccleston GM. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloid Surface A* 1997; 123/124: 169-182.
- Einarsdottir E, Groeneweg J, Bjornsdottir GG, Harethardottir G, Omarsdottir S, Ingolfssdottir K, Ogmundsdottir HM. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med* 2010; 76: 969–974.
- Elo H, Matikainen J, Peltari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften* 2007; 94: 465–468.
- EMA/HMPC/678891/2013. European Union herbal monograph on *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l., thallus, 2014. Dostupno sa: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2015/02/WC500182211.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2015/02/WC500182211.pdf) (poslednji pristup 23.12.2015.)
- EMA/H/C/757. European public assessment report (EPAR) Altargo, 2007. Dostupno sa [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000757/WC500024403.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000757/WC500024403.pdf) (poslednji pristup 22.11.2015).

- Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods*. 1990; 131: 269-275.
- Engel K, Schmidt U, Reuter J, Weckesser S, Simon-Haarhaus B, Schempp CM. *Usnea barbata* extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *J Photoch Photobio B* 2007; 89: 9-14.
- Engel K, Reuter J, Seiler C, Schulte Mönning J, Jakob T, Schempp CM. Antiinflammatory effect of pimecrolimus in the sodium lauryl sulphate test. *J Eur Acad Dermatol* 2008; 22: 447-450.
- Eros I, Abu-Eida EY, Csoka I, Santa Z, Cserne A, Kover T. Optimization of Drug Release from Dermatological Semisolid Preparations. *Drug Develop Res* 2003; 59: 316-325.
- European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (Ph. Eur. 8.0), Strasbourg: Council of Europe, 2014.
- Farkas E, Zelko R, Torok G, Racz I, Marton S. Influence of chlorhexidine species on the liquid crystalline structure of vehicle. *Int J Pharmaceut* 2001; 213: 1-5.
- Ferringer T, Elston DM. Bacterial infection: overview and antibiotics for bacterial infections of the skin, U: Elston DM, Sher RK, eds., *Clinical management of uncomplicated and skin-structure infections*, West Islip: Professional Communications, 2009.
- Fimia GM, Piacentini M. Toward the understanding of autophagy regulation and its interplay with cell death pathways. *Cell Death Differ* 2009; 16: 933-934.
- Fischer H, Ibach W, Dampel H, Sanchen D. A confocal Raman imaging study on emulsions. *Spectroscopy* 2010; 25: S19.
- Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol* 1997, 111: 69-74.
- Gallagher S, Trottet L, Heard C. Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness. *Int J Pharm* 2003; 268: 37-45.
- Gollapudi SR, Telikepalli H, Jampani HB, Mirhom YW, Drake SD, Bhattiprolu KR, Vander Velde D, Mitscher LA. Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *J Nat Prod* 1994; 57: 934-938.



Gomez-Serranillos MP, Fernandez-Moriano C, Gonzalez-Burgos E, Divakar PK, Crespo A. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features, RSC Adv 2014; 4: 59017-59047.

Grumezescu AM, Saviuc C, Chifiriuc MC, Hristu R, Mihaiescu DE, Balaure P, Stanciu G, Lazar V. Inhibitory activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/oleic acid/usnic acid-core/shell/extrashell nanofluid on *S. aureus* biofilm development. Ieee T Nanobiosci 2011; 10: 269–274.

Grumezescu AM, Cotar AI, Andronescu E, Fikai A, Ghitulica CD, Grumezescu V, Vasile BS, Chifiriuc MC. *In vitro* activity of the new water-dispersible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ usnic acid nanostructure against planktonic and sessile bacterial cells. J Nanopart Res 2013; 15: 1766–1776.

Grumezescu AM, Holban AM, Andronescu E, Mogosanu GD, Vasile BS, Chifiriuc MC, Lazar V, Andrei E, Constantinescu A, Maniu H. Anionic polymers and 10 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@UA wound dressings support human foetal stem cells normal development and exhibit great antimicrobial properties. Int J Pharmaceut 2014a; 463: 146–154.

Grumezescu V, Holban AM, Grumezescu AM, Socol G, Fikai A, Vasile BS, Trusca R, Bleotu C, Lazar V, Chifiriuc CM, Mogosanu GD. Usnic acid-loaded biocompatible magnetic PLGA-PVA microsphere thin films fabricated by MAPLE with increased resistance to staphylococcal colonization. Biofabrication 2014b; 6: 1–12.

Grysko M, Daniels R. Evaluation of the mechanism of gelation of an oleogel based on a triterpene extract from the outer bark of birch. Pharmazie 2013; 68: 572-577.

Guo L, Shi Q, Fang J-L, Mei N, Ali AA, Lewis SM, Leakey JEA, Frankos VH. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. J Environ Sci Heal C 2008; 26: 317–338.

Gupta VK, Verma S, Gupta S, Singh A, Pal A, Srivastava SK, Srivastava PK, Singh SC, Darokar MP. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 3375–3383.

Hager: Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Bd. 6, Teil C, Berlin: Springer-Verlag, 1979.

Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. Biochem Pharmacol 2004; 67: 439–451.

Holmberg K. Natural surfactants. Cur Opin Colloid Interface Sci 2001; 6: 148-159.

Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol 2002; 3: 1033-1040.

Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phase on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci* 2011; 100: 1444-1455.

Iglauer S, Wu Y, Shuler P, Tang Y, Goddard WA. Analysis of the influence of alkyl polyglycoside surfactant and cosolvent structure on interfacial tension in aqueous formulations versus n-octane. *Tenside Surfact Det* 2010; 47: 87-97.

Ingolfssdottir K. Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61: 729-736.

Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, Chan KW, Sarfraz RA, Uddin MK. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 6651-6664.

Ivanova V, Backor M, Dahse HM, Graefe U. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*, *Prep Biochem Biotechnol* 2010; 40: 377-388.

Ivanović JZ. Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2011.

Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Daniels R, Savic S. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: Physicochemical and in vitro/in vivo characterization – A ketoprofen case study. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80: 164-175.

Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res* 2008; 22: 1605-1609.

Jin J, Rao Y, Bian X, Zeng A, Yang G. Solubility of (+)-usnic acid in water, ethanol, acetone, ethyl acetate and n-hexane. *J Solution Chem* 2013; 42: 1018-1027.

Jugoslovenska farmakopeja, 4. izdanje (Ph. Jug. IV), Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1984.

Junginger HE. Multiphase emulsions. U: Rieger MM, Rhein LD, eds., *Surfactants in cosmetics*. New York: Marcel Dekker, 1997.

Jurado E, Vicaria JM, Fernandez-Arteaga A, Chachalis P, Garcia-Martin JF. Wetting power in aqueous mixtures of alkylpolyglucosides and ethoxylated fatty alcohols. *J Surfact Deterg* 2010; 13: 497-501.

Keck CM, Kovačević A, Müller RH, Savić S, Vuleta G, Milić J. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *Int J Pharmaceut* 2014; 474: 33-41.

Ki V, Rostein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can J Infec Dis Med Microbiol* 2008; 19: 173-184.

Kish TD, Chang MH, Fung HB. Treatment of skin and soft tissue infections in the elderly: a review. *Am J Geriatr Pharmac* 2010; 8: 485-513.

Kligman A. The future of cosmeceuticals. *Dermatol Surg* 2005; 31: 890-891.

Kohlhardt-Floehr C, Boehm F, Troppens S, Lademann J, Truscott TG. Prooxidant and antioxidant behavior of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation—studies on human cells. *J Photochem Photobiol B* 2010; 101: 97–102.

Konya M, Sorrenti M, Ferrari F, Rossi S, Csoka I, Caramella C, Bettinetti G, Eros I. Study of the microstructure of oil/water creams with thermal and rheological methods. *J Therm Anal Calorim* 2003; 73: 623-632.

Koparal AT, Tuylu BA, Turk H. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat Prod Res* 2006; 20: 1300-1307.

Korhonen M, Niskanen H, Kiesvaara J, Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharmaceut* 2000; 197: 143–151.

Korhonen M, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations-effect of storage time and conditions. *Int J Pharmaceut* 2001; 221: 187-196.

Korponyai C, Kovacs RK, Eros G, Dikstein S, Kemeny L. Antiirritant properties of polyols and amino acids. *Dermatitis* 2011; 22: 141-146.

Kovačević A. Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2014.

Kristmundsdottir T., Aradottir HA, Ingolfssdottir K, Ogmundsdottir HM. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1447-1452.

Kuhn A, Neubert R. Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharm Res* 2004; 21: 2347-2353.

Kumar KC, Muller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 1999; 62: 821-823.

Langford JH, Artemi P, Benrimoj SI. Topical antimicrobial prophylaxis in minor wounds. *Ann Pharmacother* 1997; 31: 559-563.

Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HML, Galetti FCS, Simioni AR, Santos NP, Egito EST, Silva CL, Tedesco AC, Santos-Magalhaes NS *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res* 2009; 19: 49-58.

Loden M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 771-788.

Lohezic-Le Devehat F, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, Boustie J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *J Nat Prod* 2007; 70: 1218-1220.

Lopez P, Ferraro G, Anesini C. Comparative antioxidant activity of an extract of *Lithraea molleoides* and an isolated 5-alkyl resorcinol derivative. Effects on the proliferation of normal and tumoral lymphocytes. *Phytother Res* 2011; 25: 271-276.

Lourith N, Kanlayavattanukul M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int J Cosmetic Sci* 2009; 31: 255-261.

Lukic M, Pantelic I, Daniels R, Müller-Goymann C, Savic M, Savic S. Moisturizing emulsion systems based on the novel long-chain alkyl polyglucoside emulsifier The contribution of thermoanalytical methods to the formulation development. *J Therm Anal Calorim* 2013; 111: 2045-2057.

Lukic M, Pantelic I, Savic S. Emulsion systems: From stability concerns to sensory properties, U: Pantelic I, ed., *Alkyl Polyglucosides: From natural- origin surfactants to prospective delivery systems*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

Lukic M, Pantelic I, Savic S. An overview of novel surfactants for formulation of cosmetics with certain emphasis on acidic active substances. *Tenside Surfact Det* 2016; 53: 7-19.

Madamombe T, Afolyan AJ. Evaluation of antimicrobial activity of extracts from South African *Usnea barbata*. *Pharm Biol* 2003; 41: 199-202.

Makai M, Csanyi E, Nemeth Zs, Palinkas J, Eros I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 2003; 256: 95-107.

Manojlovic N, Rankovic B, Kosanic M, Vasiljevic P, Stanojkovic T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19: 1166–1172.

Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 36<sup>th</sup> edition, London: The Pharmaceutical Press, 2009.

Martinelli A, Bakry A, D'Ilario L, Francolini I, Piozzi A, Taresco V. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly(L-lactide) microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; 88: 415–423.

McClements DJ. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Adv Colloid Interfac* 2012; 174: 1-30.

Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Harhaji L, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica-Stojkovic M, Trajkovic V. Antiglioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 589–598.

Milutinovic MD, Siler-Marinkovic SS, Antonovic DG, Mihajlovski KR, Pavlovic MD, Dimitrijevic-Brankovic SI. Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espreso kafe. *Hem Ind* 2011; 67: 261–267.

Molnar K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch* 2010; 65: 157–173.

Muller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biot* 2001; 56: 9–16.

Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F, eds., Lichen flora of the Greater Sonoran Desert region, Vol. 1, Tempe: Lichens Unlimited, 2002.

Neubert R. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77: 1-2.

Niraula B, King TC, Misran M. Evaluation of rheology property of dodecyl maltoside, sucrose dodecanoate, Brij 35p and SDS stabilized O/W emulsion: effect of head group structure on rheology property and emulsion stability. *Colloid Surface A* 2004; 251: 59-74.

Nishijima S, Ohshima S, Higashida T, Nakaya H, Kurokawa I. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo patients between 1994 and 2000. *Int J Dermatol* 2003; 42: 23–25.

NRL, 2015. Nacionalni registar lekova, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije. Dostupno sa <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/2015/04/NRL-2015-alims.pdf> (poslednji pristup 29.07.2015).

Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 59–65.

Ohmura Y. A synopsis of the lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Taiwan, *Mem Natl Mus Nat Sci* 2012; 48: 91-137.

Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, Horstkotte MA, Aepfelbacher M, Kirschner N, Behne MJ, Moll I, Brandner JM. Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative staphylococcus strains. *J Investig Dermatol*, 2008; 128: 906-916.

Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 1995; 61: 113–115.

Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci.* 2009; 31: 1-19.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001; 61: 439–444.

Palma M, Taylor L. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 5044-5048.

Pangilinan R, Tice A, Tillotson G. Topical treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: review of the literature. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 957-965.

Pantelic I, ed. Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems, Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

Pantelic I, Cuckovic B. Alkyl Polyglucosides: An emerging class of sugar surfactants, U: Pantelic I, ed., Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems, Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

Pantelic I, Lukic M, Daniels R, Karls E, Savic S. Alkyl Polyglucoside-based delivery systems: *In vitro/in vivo* skin absorption assessment, U: Pantelic I, ed., Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014a.

Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Daniels R, Vesic S, Vuleta G, Savic S. Effect of small changes in natural origin-based emulsion systems on hydrocortisone skin absorption and performance: a comparison of two *in vivo* methods. *Pharm Dev Technol* 2014d; 19: 55-64.

Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Lusiana, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Milic J, Daniels R, Savic S. Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous *in vitro/in vivo* characterization methods of skin performance. *Drug Dev Ind Pharm* 2014c; 40: 960-971.

Pantelic I, Lukic M, Vuleta G, Savic S. Towards Alkyl Polyglucoside-stabilized formulations: Influence of some common excipients, U: Pantelic I, ed., Alkyl Polyglucosides: From natural-origin surfactants to prospective delivery systems. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014b.

Pantelić I. Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2013.

Parish LC, Jorizzo JL, Breton JJ, Hirman JW, Scangarella NE, Shawar RM, White SM. Topical retapamulin ointment (1%, wt/wt) twice daily for 5 days versus oral cephalexin twice daily for 10 days in the treatment of secondarily infected dermatitis: results of a randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 1003-1013.

PDR for Herbal Medicines, Gordon: Thomson Healthcare, 2004.

Pereira CG, Meireles MAM. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technol* 2010; 3: 340–372.

Pettigrew M, Thirion DJG, Libman M, Zanotti G. Cost comparison of linezolid versus vancomycin for treatment of complicated skin and skin-structure infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Quebec. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2012; 23: 187-195.

Polat Z, Aydin E, Turkez H, Aslan A. *In vitro* risk assessment of usnic acid compound, *Toxicol Ind Health* 2013 (*in press*) doi:10.1177/0748233713504811.

Pramyothin, P.; Janthasoot, W.; Pongnimitprasert, N.; Phrukudom, S.; Ruangrunsi, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 381–387.

PubChem Substance, 2015. Dostupno sa <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=74204#x27>. (poslednji pristup 29.07.2015).

Rankovic B, Misic M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*, *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24: 1239–1242.

Rankovic B, Kosanic M, Stanojkovic T, Vasiljevic P, Manojlovic N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 14707–14722.

Ribeiro HM, Morais JA, Eccleston GM. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *Int J Cosmetic Sci* 2004; 26: 47-59.

Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Goncalves ECP, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhaes NS. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul* 2004; 21: 371–384.

Roy S, Elgharably H, Sinha M, Ganesh K, Chaney S, Mann E, Miller C, Khanna S, Bergdall VK, Powell HM, Cook CH, Gordillo GM, Wozniak DJ, Sen CK. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. *J Pathol* 2014; 233: 331–343.

Santos LC, Honda NK, Carlos IJ, Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia* 2004; 75: 473–479.

Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira ECG, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhaes NS. Usnic acid-loaded nanocapsules: An evaluation of cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Tec* 2005; 15: 355–361.

Santos NPD, Nascimento SC, Wanderley MSO, Pontes NT, da Silva JF, de Castro CMMB, Pereira EC, da Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhaes NS. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 64: 154–160.

Santos-Magalhaes NS, Santos NPS, Lira MCB, Ferraz MS, Pereira EC, Silva NH. Colloidal nanocarrier systems as a tool for improving antimycobacterial and antitumor activities and reducing the toxicity of usnic acid, U: Fanun M, ed., *Colloids in drug delivery*, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010.

Savic S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goymann CC. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym Sci* 2005; 283: 439–451.



Savic S, Tamburic S, Kovacevic A, Daniels R, Müller-Goymann C. Natural surfactant-based emulsion systems: The influence of common pharmaceutical excipients on colloidal structure and physical stability. *J Dispersion Sci Technol* 2008; 29: 1276-1287.

Savic S, Weber C, Tamburic S, Savic M, Müller-Goymann C. Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: the influence of two polyols on the colloidal structure and *in vitro/in vivo* skin performance. *J Pharm Sci-US* 2009; 98: 2073-2090.

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

Savic S, Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Milic J. Behind the Alkyl Polyglucoside- based structures: Lamellar liquid crystalline and lamellar gel phases in different emulsion systems, U: Pantelic I, ed., *Alkyl Polyglucosides: From natural- origin surfactants to prospective delivery systems*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

Savić S. Fizičko-hemijski aspekti i *in vitro/in vivo* karakterizacija emulzionih sistema sa nejonskim emulgatorom tipa šećernog estra. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2004.

Savić S, Savić M, Vesić S, Vuleta G, Müller-Goymann C. Vehicles based on a sugar surfactant: Colloidal structure and its impact on *in vitro/in vivo* hydrocortisone permeation. *Int J Pharm* 2006; 320: 86-95.

Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone *in vitro/in vivo* permeation. *Eur J Pharm Sci*. 2007; 30: 441-50.

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

Savić S, Tamburić S, Savić MM. From conventional towards new - natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010; 7: 353-69.

Savić Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek Sirov* 2014; 34: 93-103.

- Shah VP, Yacobi A, Radulescu FS, Miron DS, Lane ME. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *Int J Pharm* 2015; 491: 21-25.
- Schempp CM, Jocher A, Engel K, Huyke C. Pharmaceutical composition comprising old man's beard (*Usnea barbata*) and St. John's wort (*Hypericum perforatum*) and their use. US patent 7687083 B2, 2010.
- Schmeda-Hirschmann G, Tapia A, Lima B, Pertino M, Sortino M, Zacchino S, Arias AR, Feresin GE. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytother Res* 2008; 22: 349–355.
- Schwartz RA, Al-Mutairi N. Topical antibiotics in dermatology: An update. *The Gulf Journal of Dermatology and Venereology* 2010; 17: 1-19.
- Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, Villa P, Malecore M, Mancuso S. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. *Minerva Ginecol* 1999; 51: 255–260.
- Scott MJ, Jones MN. The biodegradation of surfactants in the environment. *BBA-Biomembranes* 2000; 1508: 235-251.
- Seppic, Francuska, Katalog–Simulgreen™18-2, 2002.
- Seppic, Francuska, Katalog–Montanov™L, 2006a.
- Seppic, Francuska, Katalog–Montanov™S, 2006b.
- Shrestha G, St. Clair LL. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs, *Phytochem Rev* 2013; 12: 229–244.
- Singh G, Divakar PK, Dal Grande F, Otte J, Parmen S, Wedin M, Crespo A, Lumbsch HT, Schmitt I. The sister-group relationships of the largest family of lichenized fungi, Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycota). *Fungal Biol* 2013; 117: 715–721.
- Spigno G, De Faveri DM. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J Food Eng* 2007; 78: 793-801.
- Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, Hirschmann JV, Kaplan SL, Montoya JG, Wade JC. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 147-159.
- Sultana N, Afolayan AJ. A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton, *J Asian Nat Prod Res* 2011; 13: 1158–1164.

Surber C, Tassopoulos T, Smith EW. Ointments, creams and lotions used as topical drug delivery vehicles, U: Bronaugh R, Maibach H, eds. Topical absorption of dermatological products, New York: Marcel Dekker, 2001.

Taresco V, Francolini I, Padella F, Bellusci M, Boni A, Innocenti C, Martinelli, A, D'Ilario, L, Piozzi A. Design and characterization of antimicrobial usnic acid loaded-core/shell magnetic nanoparticles. *Mat Sci Eng C-Bio S* 2015; 52: 72–81.

Tasic-Kostov MZ, Reichl S, Lukic MZ, Jaksic IN, Savic SD. Does lactobionic acid affect colloidal structure and skin moisturizing potential of the alkyl polyglucoside-based emulsion systems? *Pharmazie* 2011b; 66: 862-870.

Tasic-Kostov M, Reichl S, Lukic M, Jaksic I, Savic S. Two alkyl polyglucoside natural surfactants varying in chain length in stabilization of lactobionic acid containing emulsions: physicochemical characterization and *in vitro* irritation potential assessment. *Riv Ital Sostanze Gr* 2011a; 88: 256-264.

Tasic-Kostov M, Vesic S, Savic S. Objective skin performance evaluation: How mild are APGs to the skin?, U: Pantelic I, ed., Alkyl Polyglucosides: From natural- origin surfactants to prospective delivery systems. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

Tasić-Kostov M. Dermokozmetičke emulzije sa lamelarnom tečno-kristalnom fazom kao nosač za laktobionsku kiselinu – ispitivanje koloidne strukture, efikasnosti i bezbednosti. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2013.

Taylor LJ, Lee RS, Long M, Rawlings A, Tubek J, Whitehead L, Moss G. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *Int J Pharm* 2002; 249: 157–164.

Thadhani VM, Choudhary MI, Ali S, Omar I, Siddique H, Karunaratne V. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Nat Prod Res* 2011; 25: 1827–1837.

The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biological, New York: Merck & Co. Inc, 1983.

Tognetti L, Martinelli C, Berti S, Hercogova J, Lotti T, Leoncini F, Moretti S. Bacterial skin and soft tissue infections: review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment: a collaboration between dermatologists and infectivologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26: 931-941.

Toledo Marante FJ, Garcia Castellano A, Estevez Rosas F, Quintana Aguiar J, Bermejo Barrera J. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol* 2003; 29: 2049–2071.

United States Pharmacopoeia 37, The National Formulary 32 (USP 37/NF 32), Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2014.

Vadgarna B, Harris DK. Measurements of the contact angle between R134a and both aluminum and copper surfaces. *Exp Therm Fluid Sci* 2007; 31: 979-984.

Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C. Self-preserving cosmetics. *Int J Cosmetic Sci* 2009; 31:163–175.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998, 46: 4113–4117.

Vijayakumar CS, Viswanathan S, Kannappa Reddy M, Parvathavarthini S, Kundu AB, Sukumar E. Antiinflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; 71: 564–566.

Vucinic-Milankovic N, Savic S, Vuleta G, Vucinic S. The physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of natural surfactants-based emulsions as vehicles for diclofenac diethylamine. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33: 221-234.

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

Walters KA, Brain KR. *Topical and Transdermal Delivery*, U: Gibson M, ed., *Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*, New York: Informa Healthcare, 2009.

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. *Phytomedicine* 2007; 14: 508–516.

White PAS, Oliveira RCM, Oliveira AP, Serafini MR, Araujo AAA, Gelain DP, Moreira JCF, Almeida JRGS, Quintans JSS, Quintans-Junior LJ, Santos MRV. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules* 2014; 19: 14496-14527.

Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr Virus activation. *Chem Pharm Bull* 1995; 43: 1388–1390.

Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem* 1996; 241: 103–108.

Zhang L, Somasundaran P, Maltesh C. Adsorption of n-Dodecyl-b-D-maltoside on Solids. *J Colloid Interf Sci* 1997; 191: 202-208.

Zizovic I, Ivanovic J, Mistic D, Stamenic M, Djordjevic S, Kukic-Markovic J, Petrovic S. SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L. J Supercrit Fluid 2012; 72: 7-14.

Zugic A, Djordjevic S, Arsic I, Markovic G, Zivkovic J, Jovanovic S, Tadic V. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Ind Crop Prod 2014; 52: 519–527.

## 7. Prilozi

### 7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

#### Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu–M21:

Zugic A, Jeremic I, Isakovic A, Arsic I, Savic S, Tadic V. Evaluation of anticancer and antioxidant activity of a commercially available CO<sub>2</sub> supercritical extract of old man's beard (*Usnea barbata*). Plos One 2016; 11(1): e0146342 (IF 3,057/2015).

#### Radovi u međunarodnim časopisima–M23:

Zugic A, Lunter DJ, Daniels R, Pantelic I, Tasic Kostov M, Tadic V, Misic D, Arsic I, Savic S. *Usnea barbata* CO<sub>2</sub>-supercritical extract in alkyl polyglucoside-based emulsion systems: Contribution of Confocal Raman imaging to the formulation development of a natural product. Pharm Dev Technol, 2016; 21 (5): 563-575 (IF 1,566/2015).

Žugić AR, Lukić MZ, Tasić Kostov MZ, Tadić VM, Arsic IA, Mišić DR, Petrović SD, Savić SD. Alkyl polyglucoside-stabilized emulsion as a prospective vehicle for *Usnea barbata* CO<sub>2</sub>-supercritical extract: assessing stability, safety and efficiency of a topical formulation. Hem Ind 2015; 69 (6): 703–712 (IF 0,437/2015).

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini-M33

Zugic A, Tadic V, Lunter DJ, Daniels R, Pantelic I, Arsic I, Savic S. *Usnea barbata* L. supercritical extract in APG-based emulsion system: Considerations of colloidal structure using Raman spectral imaging. 9<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisabon, Portugal, 31. mart-03. april 2014, CD-ROM.

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu-M34

Žugić AR, Tadić VM, Arsić IA, Đorđević SM, Mišić DR, Savić SD. CO<sub>2</sub>-supercritical extract of *Usnea barbata* L., Usneaceae in a topical formulation: evaluation of antimicrobial activity. 8<sup>th</sup> CMAPSEEC, Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Drač, Albanija, 19.-22. maj 2014., Book of Abstracts, str. 129.

#### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu-M64

Žugić A, Tasić-Kostov M, Naumović S, Arsić I, Tadić V, Mišić D, Savić S. *Usnea barbata* CO<sub>2</sub> natkritični ekstrakt u emulziji stabilizovanoj alkil poliglukozidnim emulgatorima: procena efikasnosti i bezbednosti, VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 15.-19. oktobar 2014, Beograd, Srbija. Zbornik sažetaka, str.147. (usmena prezentacija).

### **Tehničko rešenje kategorije M82-nova proizvodna linija, novi materijal, industrijski prototip-M82**

Irena Žižović, Vanja Tadić, Ivana Arsić, Dušan Mišić, Sofija Đorđević, Ana Žugić, Marija Tasić-Kostov, Snežana Savić, Slobodan Petrović, Slobodanka Jovanović, Jelena Ašanin, Jasna Ivanović, Dušanka Runjaić-Antić. Razvoj novog proizvoda - biljni krem sa antimikrobnim delovanjem.

Pozitivna recenzija recenzenata prof. dr Dušanke Kitić i prof. dr Mihajla Stanković prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, 28.12.2012. godine.

### **Patent-M90**

Irena Žižović, Ivana Arsić, Vanja Tadić, Dušan Mišić, Slobodan Petrović, Slobodanka Jovanović, Sofija Đorđević, Jasna Ivanović, Marko Stamenić, Stoja Milovanović, Ana Žugić, Snežana Savić, Jelena Ašanin, Natalija Milčić Matić, Marija Tasić-Kostov. Bioaktivni polučvrsti i tečni fitopreparati.

Zahtev za priznanje patenta podnet Zavodu za intelektualnu svojinu 26.5.2014.

## **7.2. Biografija autora**

Ana Žugić rođena je 10.6.1983. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i VI Beogradsku gimnaziju. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2002/2003. godine, a diplomirala je 11.7.2008. sa prosečnom ocenom 9,23 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2009/2010. godine. 2012. godine dobila je stipendiju Službe nemačke akademske razmene (DAAD) za tromesečni istraživački boravak u Nemačkoj. Saradnju sa Institutom za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tibingenu koju je tom prilikom ostvarila nastavila je kroz još jednu dvonedeljnu istraživačku posetu u aprilu 2013. godine.

Od decembra 2008. godine zaposlena je u Odseku za farmaceutska istraživanja i razvoj Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, gde je 2010. godine izabrana u zvanje istraživača saradnika.

Od 2009. do 2010. godine učestvuje kao saradnik na projektu tehnološkog razvoja pod nazivom “Savremeni koncept korišćenja lekovitih prirodnih činilaca (lekovita voda, lekovito blato, lekovito bilje) Banje Vrujci” (TR-20137), a od 2011. godine na dva projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja pod nazivom “Funkcionalni fiziološki aktivni biljni materijali sa dodatkom vrednošću za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji” (III-45017) i “Biološki mehanizmi i nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: unapređenje ishrane u Srbiji” (III-41030) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Govori engleski (nivo A, Careers Abroad language Center- CALC Certificate) i služi se nemačkim jezikom (nivo CEF A 2.2, škola stranih jezika Berlitz).



### 7.3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Ana Žugić  
broj indeksa: 24/09

#### Izjavljujem

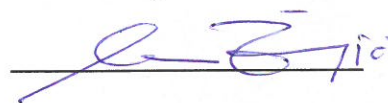
da je doktorska disertacija pod naslovom

Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Parmeliaceae u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim emulgatorima: preformulaciona i formulaciona istraživanja

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 8.7.2016. godine

Potpis doktoranda



#### **7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: Ana Žugić

Broj indeksa: 24/09

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije

Naslov rada: Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg.,  
Parmeliaceae u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim  
emulgatorima: preformulaciona i formulaciona istraživanja

Mentor: prof. dr Snežana Savić

Potpisana: Ana Žugić

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 8.7.2016. godine

**Potpis doktoranda**



## 7.5. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Parmeliaceae u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim emulgatorima: preformulaciona i formulaciona istraživanja

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 8.7.2016. godine

Potpis doktoranda

