

UNIVERZITET CRNE GORE

MEDICINSKI FAKULTET

Đulija Hadžibeti

**ISPITIVANJE FARMACEUTSKO-
TEHNOLOŠKIH KARAKTERISTIKA
POLUČVRSTIH PREPARATA SA
ETARSKIM ULJEM SMILJA I NJIHOVOG
ANTIINFLAMATORNOG DJELOVANJA NA KOŽI**

Doktorska disertacija

Podgorica, 2026.

UNIVERSITY OF MONTENEGRO

FACULTY OF MEDICINE

Đulija Hadžibeti

**STUDY OF THE PHARMACEUTICAL,
TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
SEMI-SOLID IMMORTELE PRODUCTS AND
THEIR ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS ON
THE SKIN**

Doctoral Dissertation

Podgorica, 2026.

PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Doktorand

Ime i prezime: Đulija Hadžibeti

Datum rođenja: 13. 8. 1987. godine

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Farmaceutski fakultet Univerziteta Tirana, 2011. godine

Mentor

Doc. dr Tanja Vojinović, docent doktor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet (Studijski program Farmacija)

Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata

Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – predsjednik

Doc. dr Tanja Vojinović, docentkinja Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – mentor

Prof. dr Milena Đurović, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – član

Prof. dr Ana Barjaktarević, vanredna profesorica Fakulteta medicinskih nauka u Univerziteta u Kragujevcu – član

Prof. dr Nataša Duborija Kovačević, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – član

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – predsjednik

Doc. dr Tanja Vojinović, docentkinja Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – mentor

Prof. dr Milena Đurović, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – član

Prof. dr Ana Barjaktarević, vanredna profesorica Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu – član

Prof. dr Nataša Duborija Kovačević, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – član.

Datum odbrane: 29. 4. 2026. godina

Pisanje doktorske disertacije nije bio samo akademski poduhvat, već i lično putovanje – puno izazova, učenja, sumnji, ali i rasta, podrške i zahvalnosti. Ova stranica je možda najvažnija u cijelom radu jer ovdje želim da izrazim duboku zahvalnost svima koji su me na tom putu pratili.

Iskrenu zahvalnost dugujem svojoj mentorki doc. dr Tanji Vojinović na nesebičnoj pomoći, motivaciji, pružanju velike podrške, dragocjenim savjetima i idejama, kao i za svu smirenost i optimizam koji mi je pružila tokom cijelog toka mog naučno-istraživačkog rada.

Dugujem zahvalnost prof. dr. Mileni Đurović sa Katedre za dermatovenerologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore u Podgorici na stručnoj pomoći, divnoj saradnji i korisnim savjetima u ispitivanju uzoraka kod ispitanika i tumačenju rezultata.

Veliko hvala mojim kolegama, saradnicima, prijateljima – na svim razgovorima, zajedničkim dilemama, savjetima i osmjesima u prolazu.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su me učili da se znanje i poštenje uvijek isplate, čak i kada put traje dugo. Posebna i najsrčanija zahvalnost mojim sestrama i bratu za razumijevanje, strpljenje, vjeru, odricanje, svakom "možeš ti to" i svu ljubav i podršku koju su mi pružili. Hvala mom Urimu, koji, iako kilometrima daleko, sa palube broda negdje na pučini, nikada nije bio daleko od mog srca. I mom malom anđelu Eidiyu koji me je pratio tokom cijelog pisanja moje disertacije. Zato ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.

Đulija

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv doktorskih studija: Doktorske akademske studije Univerziteta Crne Gore, Medicinski fakultet, Doktorski studijski program Farmacija

Naslov doktorske disertacije: Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja i njihovog antiinflamatornog djelovanja na koži

Datum prijave doktorske teze: 30. 4. 2025.

Datum sjednice Senata Univerziteta Crne Gore na kojoj je prihvaćena teza: 7. 4. 2026.

Rezime/Izvod iz teze:

Uvod: Naučno-istraživački interes u farmaciji u posljednje vrijeme prevashodno je usmjeren na proučavanje prirodnih resursa (autohtono bilje), kao i na njihovu potencijalnu primjenu u farmakoterapiji. Biljne supstance se često koriste u formulacijama za topikalnu primjenu. One se inkorporiraju u podlogu koja predstavlja njihov nosač i omogućava njihovo farmakološko djelovanje. Etarska ulja su najkoncentrovaniji oblik, ljekovitih sastojaka jedne biljke. Dobijaju se pomoću destilacije, ekstrakcije ili nekom drugom metodom izolacije. Sve je veća primjena prirodnih etarskih ulja i polučvrstih preparata sa dodatkom ovih ulja u liječenju kožnih upalnih bolesti, odnosno polučvrstih preparata sa biljnim supstancama. U ovoj disertaciji analizirano je etarsko ulja smilja i polučvrsti preparati sa ovim uljem. Zapaženo je da ulje smilja pozitivno utiče na inflamatorne procese kože. Smilje je biljka za koju je dokazano da ima uticaj na regeneraciju ćelija kože i poboljšanje njene teksture. U cilju dobijanja novih biološki aktivnih dermalnih preparata, sa antimikrobnim i antiinflamatornim potencijalom, sa manje neželjenih efekata, koji neće štetiti koži i koji će omogućiti vremenski dužu upotrebu ovih preparata kod hroničnih upalnih procesa kože, analizirana je farmaceutske-tehnološka stabilnost polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja, kao i hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja dobijenog iz biljnih vrsta *Helichrysum italicum*-a metodom parne destilacije iz područja ulcinjske obale. Ispitan je i *in vivo* antiinflamatorni efekat polučvrstih preparata (mast i krem) sa etarskim uljem smilja na uzorku od 100 ispitanika sa upalnim procesima kože kod atopijskog dermatitisa.

Ciljevi: Opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije jeste ispitivanje mogućnosti primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja kod upalnih procesa kože, atopijskog dermatitisa. Cilj prve faze eksperimentalnog rada odnosi se na ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja smilja sa ulcinjske obale, zatim na njegova fizička, hemijska i antimikrobna svojstva. Druga faza eksperimentalnog rada ima za cilj definisanje farmaceutske-tehnološkog postupka izrade polučvrstih preparata (mast, krem i gel) kao podloga koja će omogućiti inkorporaciju optimalne koncentracije (0,5%) aktivnog sastojka – etarsko ulje smilja. Cilj treće faze eksperimentalnog rada je definisanje farmaceutske-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja, sa ciljem dobijanja zadovoljavajućih teksturnih i senzornih karakteristika.

Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada je procjena farmakološkog dejstva (antiinflamatornog efekta) polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja u liječenju upalnih procesa kože, atopijskog dermatitisa, kod 100 ispitanika upoređujući njihov efekat sa placebo efektom.

Metode: Eksperimentalni rad je bio podijeljen u četiri faze. U prvoj fazi je dobijeno etarsko ulje metodom parne destilacije, zatim su definisane njegove fizičko-hemijske karakteristike sljedećim metodama: gasnom hromatografijom u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC/MS). U narednom dijelu, ispitana je i antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja protiv 7 sojeva mikroorganizama, tri Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i četiri Gram negativne bakterije: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NCIMB 8267, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* NCTC 6017 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskog ulja *H. italicum* je korišćena mikrodiluciona metoda u bujonu, izvedena u skladu sa smjernicama Evropskog komiteta za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobna sredstva (engl. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST 2020, 2023). U drugoj fazi eksperimentalnog rada su izrađeni polučvrsti preparati (mast, krem i gel) kao podloge. Nakon toga se u te podloge inkorporiralo 0,5% etarskog ulja smilja kao aktivna supstanca. Preparati su izrađeni ručno u tarioniku ili pateni uz pomoć magnetne miješalice (*ISOLAB Laborgeräte GmbH, Germany*) i vodenog kupatila (engl. *Water Bath*, WB-2R4H-15). U trećoj fazi eksperimentalnog rada su ispitane farmaceutsko-tehnološke karakteristike ovih preparata. Osim toga, izvršena je analiza organoleptičkih karakteristika vizuelnom i aplikativnom metodom. Mjerenje električne provodljivosti sprovedeno je posredstvom konduktometra CDM 230 (Radiometar, Danska) direktnim uranjanjem konduktometarske sonde u uzorak kreme i masti, na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), kao i direktnim učitavanjem rezultata u digitalnoj formi. Mjerenje pH vrijednosti je izvedeno potenciometrijski pomoću elektrode pH metra (engl. *The Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter*, Woonsocket, Rhode Island, USA). Potom je uslijedila evaluacija stabilnosti tokom izazvanog ubrzanog starenja preparata. Korišćena je Laboratorijska centrifuga (Tehtnica, Slovenija). Nakon toga, navedeni preparati su bili izloženi stresnim uslovima, imitirajući na ovaj način spoljašnje ekstremne uslove, budući da su bili podjednako izloženi i niskim i visokim temperaturama. Korišćena je klimatska komora, Sutjeska, Srbija i Frižider, Gorenje, Slovenija.

Nakon toga su praćene promjene u organoleptičkim i aplikativnim karakteristikama. Teksturna analiza (engl. *Texture Profile Analysis* (TPA)) je izvedena korišćenjem uređaja CT3 *Texture Analyzer* (Brookfield, AMETEK Inc., Middleborough, MA, USA). Sonda instrumenta uranja se u posudu za uzorke (koja je 75% ispunjena uzorkom, bez inkorporacije vazduha) i izranja iz nje. Senzorna ispitivanja polučvrstih preparata sprovedena su koristeći upitnik koji su popunili 20 dobrovoljnih ispitanika. Za svaku senzornu karakteristiku data je lista deskriptivnih pojmova. Ispitana je i mikrobiološka stabilnost izrađenih preparata, koristeći mikrobiološke testove stabilnosti i sigurnosti proizvoda, gdje se proizvod inokulira u određenim sojevima mikroorganizama i inkubira na odgovarajućim hranljivim agarima ili u bujonima. Zatim se prati rast mikroorganizama u različitim vremenskim intervalima. U četvrtoj fazi eksperimentalnog rada analizom je obuhvaćena antiinflamatorna aktivnost polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja na uzorku od 100 ispitanika koji su imali upalne procese na koži duže od 7 dana. Od 100 ispitanika, polovina je koristila polučvrste preparate sa etarskim uljem smilja, dok je druga polovina koristila placebo. Placebo je predstavljao samu podlogu bez dodatka etarskog ulja smilja. Za procenjivanje uspešnosti liječenja koristili smo SCORAD indeks (Scoring Atopic Dermatitis). Navedeni indeks je najšire zastupljen i najšire prihvaćen. On predstavlja najviše validirani sistem bodovanja (engl. *scoring system*) za atopijski dermatitis. SCORAD je standardizovani upitnik i sistem bodovanja koji se koristi za procjenu težine atopijskog dermatitisa. Upitnik obuhvata: procjenu površine zahvaćene kože, ocjenu intenziteta kožnih promjena, i subjektivne simptome pacijenta (svrab i nesanica). Na osnovu prikupljenih podataka iz upitnika izračunava se ukupan SCORAD rezultat (0–103), koji pokazuje da li je bolest blaga, umjerena ili teška. Postoje dvije vrste SCORAD indeksa. Klasični (standardni) SCORAD indeks, kojeg procjenjuje lekar uz saradnju sa pacijentom i PO-SCORAD (Patient-Oriented SCORAD), kojom sam pacijent procjenjuje ozbiljnost svog atopijskog dermatitisa, prateći promjene simptoma kroz vrijeme. U ovoj disertaciji se koristio klasični SCORAD indeks. Pacijenti su u saradnji sa dermatologom popunili upitnik, gdje je bio zastupljen objektivni i subjektivni dio procjene njihovog stanja.

Rezultati: Na osnovu rezultata prve faze istraživanja, detektovano je prisustvo 43 aktivne supstance u etarskom ulju smilja sa dominacijom mono- i seskviterpena sa antiinflamatornim, antimikrobnim efektima. Najzastupljenija supstanca je bila α -pinene (16,62%) i γ -curcumene (14,06%). Značajne supstance su i β -selinene (7,39%), neryl acetate (6,04%), β -caryophyllene (5,02%), α -selinene (4,92%). Veće prisustvo α -pinen-a koje ima izražen antiinflamatorni efekat,

i antimikrobni efekat potvrđuje benefite samog etarskog ulja smilja. γ -curcumene ima antimikrobni efekat. α i β -selinene ima antiinflamatorni efekat. Neryl acetate kao četvrta najzastupljenija komponenta u ovom ulju osim antimikrobnog i antiinflamatornog efekta predstavlja najznačajniju komponentu koja ima uticaj na kožnu barijeru, zatim, ima značajan uticaj na proces diferencijacije keratinocita, ali istovremeno promoviše i formiranje i jačanje kožne barijere, utičući na sintezu lipida i ceramida na koži. Sadržaj etarskog ulja iz ulcinjske obale može se uporediti sa etarskim uljem smilja iz drugih područja (Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Italija, Francuska, i dr.). Može se zaključiti da je kod ispitanih Gram pozitivnih bakterija istaknutiji antimikrobni efekat etarskog ulja smilja *H. Italicum*-a u odnosu na razmatrane Gram negativne bakterije. Rezultati druge faze ekperimentalnog rada ukazuju na izradu stabilnih polučvrstih preparata kao što su: mast i krem sa etarskim uljem smilja. Preparat sa gel podlogom je organoleptički nakon izrade izgledao stabilno, ali se nakon 72 h pojavilo otečnjavanje i izdvajanje faza, tako da na tom preparatu nijesmo mogli izvršiti dalja ispitivanja. Rezultati treće faze eksperimentalnog istraživanja ukazuju na to da izrađeni dermalni preparati – mast i krem sa etarskim uljem smilja – pokazuju zadovoljavajući stepen fizičke stabilnosti i efikasnosti. Promjena sastava masne faze i prisustva vodene faze kod kremova – dovela je do blagih razlika u rezultatima pH vrijednosti, električne provodljivosti i teksturnih analiza. Primijećene su sličnosti u pogledu određenih senzornih karakteristika kao što su: sjaj, masnoća, razmazivost i rezidualni film masti i kremova, dok su manje ili više značajne razlike uočene između drugih atributa. Međutim, svi preparati su mikrobiološki stabilni. Uzimajući u obzir rezultate četvrte faze eksperimentalnog istraživanja, a u odnosu na statističku obradu dobijenih rezultata, oni evidentno ukazuju na progresivno smanjenje simptoma upale kože kod pacijenata, tokom trajanja tretmana smiljem sa značajnim efektom ispoljenim nakon 14 i 21 dana tretmana u poređenju sa placebo, pri čemu se prvi rezultati vide nakon intenzivnog korišćenja duže od 7 dana (I kontrola), dok se najveći efekat postiže nakon intenzivnog tretiranja upalnih procesa u periodu od 21 dana i duže. Korisnici placebo preparata su osjetili izvjesno poboljšanje, najviše nakon početka korišćenja, što može biti emolijentni efekat same podloge. Međutim, njihov progres poboljšanja je opao nakon II i III kontrole. Dužina trajanja tretmana pokazala se kao presudan faktor terapijske efikasnosti. Najbolji rezultati zabilježeni su kod ispitanika koji su preparate sa smiljem primjenjivali kontinuirano tokom 21 dana i duže, dok su kraći tretmani (do 7 dana) pokazali slabiji efekat.

Zaključak: GS-MS metodom dokazano je prisustvo 43 bioloških jedinjenja u etarskom ulju smilja sa antiinflamatornim i antimikrobnim efektima. Zahvaljujući mikrodilucionoj metodi u bujonu, potvrđen je antimikrobni efekat etarskog ulja smilja *H. Italicum*-a kod ispitanih Gram pozitivnih bakterija kao daleko naglašeniji u odnosu na ispitane Gram negativne bakterije. Mast i krem sa etarskim uljem smilja pokazuju farmaceutsko-tehnološke optimalne karakteristike za korišćenje, dok gel sa etarskim uljem smilja pokazuje otečnjavanje i nije primjeren za upotrebu. Osim toga, neophodno je naglasiti postojanje razlike u teksturnim i senzornim karakteristikama između masti i krema sa etarskim uljem smilja. Shodno tome, trebalo bi izabrati proizvod u zavisnosti od težine promjena i njihove lokalizacije. U slučaju da je koža suva i perutava, savjetuje se da se koristi mast sa etarskim uljem smilja. Ako je koža dehidrirana sa izraženim osjećajem svraba, trebalo bi upotrebljavati lipofilni krem sa etarskim uljem smilja. Polučvrsti preparati (mast i krem) sa etarskim uljem smilja uspješno djeluju na tretiranje upalnih procesa kože, atopijskog dermatitisa. U cilju postizanja značajnog efekta, potrebno je tretirati upalne procese duže od 7 dana. Za postizanje optimalnog terapijskog efekta potrebno je da tretman traje duže od sedam dana, pri čemu su najbolji rezultati ostvareni nakon tri sedmice redovne primjene preparata na bazi smilja.

Ključne riječi: polučvrsti preparati; etarsko ulje smilja; *Helichrysum italicum*; upalni procesi kože; atopijski dermatitis; farmaceutsko-tehnološke karakteristike; antiinflamatorna aktivnost; antimikrobna aktivnost, prirodni preparati.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija i kozmetologija

UDK broj:

DATA ON THE DOCTORAL DISSERTATION

Name of doctoral studies: Doctoral academic studies at the University of Montenegro, Faculty of Medicine, Doctoral study program Pharmacy

Doctoral thesis title: Study of the pharmaceutical, technological characteristics of semi-solid immortelle products and their anti-inflammatory effects on the skin

Thesis application date: 30. 4. 2025.

Thesis acceptance date (UoM Senate Session): 7. 4. 2026.

Abstract/Thesis Overview:

Introduction: In the recent period, scientific research interest in pharmacy and has primarily been focused on studying natural resources (indigenous herbs) and their potential application in pharmacotherapy. Herbal substances are frequently and effectively used in topical formulations. Essential oils are the most concentrated form of a plant's medicinal constituents. They are obtained through distillation, extraction, or other isolation methods. The use of natural essential oils, as well as semi-solid preparations containing these oils, is increasingly common in the treatment of inflammatory skin diseases, i.e., semi-solid preparations with plant-derived substances. There is an increasing use of natural semi-solid preparations for treating skin inflammatory diseases, specifically semi-solid preparations with plant substances. In this dissertation, essential oil of *Helichrysum italicum* and semi-solid preparations containing this oil were analyzed. It was observed that *Helichrysum* oil has a positive effect on inflammatory processes in the skin. *Helichrysum* is a plant that has gained popularity in the skincare industry due to its ability to regenerate skin cells and improve skin texture. This study aimed to develop new biologically active dermal preparations with antimicrobial and anti-inflammatory properties, minimized adverse effects, skin compatibility, and suitability for prolonged use in chronic inflammatory skin conditions. The pharmaceutical and technological stability of semi-solid preparations containing *Helichrysum italicum* essential oil was evaluated, alongside the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil obtained from *Helichrysum italicum* plants harvested along the Ulcinj coast using steam distillation. The *in vivo* anti-inflammatory effect of semi-solid preparations (ointment and cream) with essential oil of immortelle was also tested on 100 subjects with skin inflammatory processes with acute and chronic inflammatory skin conditions.

Objectives: The main objective of this doctoral dissertation is to investigate the possibilities of applying semi-solid preparations with essential oil of immortelle in inflammatory skin processes (atopic dermatitis). The goal of the first phase of experimental work refers to examining the chemical composition of the essential oil of immortelle from the Ulcinj coast, its physical, chemical, and biological properties, and to investigate its antimicrobial activity. The second phase of experimental work aims to define the pharmaceutical and technological process for the production of semi-solid preparations (ointment, cream, and gel) as a base that would allow the incorporation of an optimal concentration (0.5%) of the active ingredient — *Helichrysum italicum* essential oil. The goal of the third phase of experimental work is to define the pharmaceutical and technological characteristics of semi-solid preparations with essential oil of immortelle, with the aim of achieving satisfactory textural and sensory characteristics. The goal of the fourth phase of experimental work is to assess the pharmacological effect (anti-inflammatory effect) of semi-solid preparations with essential oil of immortelle in the treatment of acute and chronic inflammatory processes (atopic dermatitis) of the skin in 100 participants, comparing their effect with that of a placebo.

Methods: The experimental work was divided into four phases. In the first phase, essential oil was obtained by steam distillation, and then its physicochemical characteristics were defined using the following methods: gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS). In the following part, the antimicrobial activity of the essential oil of immortelle was examined against 7 strains of microorganisms, three Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and four Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NCIMB 8267, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of *H. italicum*, a microdilution method in broth was used, conducted in accordance with the guidelines of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. In the second phase of the experimental work, semi-solid preparations (ointment, cream, and gel) were made by incorporating 0.5% of immortelle essential oil as the active substance. The preparations were made manually in a mortar and pestle with the help of a magnetic stirrer (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Germany) and a water bath (Water Bath, WB-2R4H-15).

In the third phase of the experimental work, the pharmaceutical and technological characteristics of these preparations were examined. In addition, organoleptic characteristics were analyzed using visual and applicative methods. The measurement of electrical conductivity was performed using a CDM 230 conductometer (Radiometer, Denmark) by directly immersing the conductometric probe into the cream and ointment sample at room temperature (22 ± 2 °C) and directly loading the results in digital form. The measurement of pH value was performed potentiometrically using the electrode of the pH meter pH 211 Microprocessor pH Meter (The Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA). Stability testing was conducted during accelerated aging of the preparations. A laboratory centrifuge was used (Libra, Slovenia). These preparations were then exposed to stressful conditions, imitating external extreme conditions, considering the fact that they were exposed equally to low and high temperatures. Climatic chamber was used, Sutjeska, Serbia and Refrigerator, Gorenje, Slovenia. Subsequently, changes in organoleptic and applicative characteristics were monitored. Texture Profile Analysis (TPA) was performed in the CT3 Texture Analyzer (Brookfield, AMETEK Inc., Middleborough, MA, USA). The instrument's probe was immersed in the sample container (which was 75% filled with sample, with no air incorporation) and emerged from it. Sensory tests of semi-solid preparations were performed using a questionnaire filled in by 20 self-chosen respondents. The microbiological stability of the prepared preparations was also tested using microbiological tests of product stability and safety, where the product was inoculated in specific strains of microorganisms and incubated at appropriate nutrient agars or broths. The growth of microorganisms was then monitored at different time intervals. In the fourth phase of the experimental work, the anti-inflammatory activity of semi-solid preparations with immortelle essential oil was examined on the sample of 100 subjects who had inflammatory processes on the skin for more than 7 days. Of the 100 participants, half used semi-solid preparations containing *Helichrysum italicum* essential oil, while the other half received a placebo. The placebo consisted of the base formulation without the addition of *Helichrysum italicum* essential oil. To assess the success of treatment, we used the SCORAD index. The above-mentioned index is the most widely represented and widely accepted. It is the most validated scoring system for inflammatory skin diseases. SCORAD is a standardized questionnaire and scoring system used to assess the severity of atopic dermatitis. The questionnaire includes an evaluation of the affected skin area, the intensity of skin lesions, and the patient's subjective symptoms (itch and sleep disturbance). Based on the collected data, a total SCORAD score (0–103) is calculated, indicating whether the disease is mild, moderate, or severe.

There are two types of SCORAD indices: the classical (standard) SCORAD, assessed by a physician in collaboration with the patient, and PO-SCORAD (Patient-Oriented SCORAD), which is self-assessed by the patient to monitor symptom changes over time. In this dissertation, the classical SCORAD index was used. Patients completed the questionnaire in collaboration with a dermatologist, incorporating both objective and subjective components of their condition

Results: Based on the results of the first phase of the study, 43 active substances were detected in immortelle essential oil with a predominance of mono- and sesquiterpenes with anti-inflammatory and antimicrobial effects. The most abundant compounds were α -Pinene (16.62%) and γ -Curcumene (14.06%). Other significant constituents included β -Selinene (7.39%), Neryl acetate (6.04%), β -Caryophyllene (5.02%), and α -Selinene (4.92%). The high content of α -Pinene, which exhibits pronounced anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects, supports the beneficial properties of *Helichrysum italicum* essential oil. γ -Curcumene possesses antimicrobial activity. Both α - and β -Selinene demonstrate antioxidant and anti-inflammatory effects. Neryl acetate, the fourth most abundant component of this oil, in addition to its antimicrobial and anti-inflammatory properties, plays a key role in supporting the skin barrier. It significantly influences keratinocyte differentiation and promotes the formation and strengthening of the skin barrier by affecting lipid and ceramide synthesis in the skin. The content of the essential oil from the Ulcinj coast can be compared with the essential oil of immortelle from other areas (Bosnia and Herzegovina, Croatia, Italy, France, etc.). It can be concluded that the antimicrobial effect of immortelle essential oil *H. italicum* is more prominent in the tested Gram-positive bacteria compared to the examined Gram-negative bacteria. The results of the second phase of experimental work indicate the production of stable semi-solid preparations of ointment and cream with immortelle essential oil. The preparation with a gel base looked organoleptically stable even after the production, but after 72 hours there was runoff and phase separation, so we could not perform further tests on that preparation. The results of the third phase of the experimental research indicate that the dermocosmetic preparations ointment and cream with immortelle essential oil show satisfactory physical stability and efficiency. The change in the composition of the fat phase and the presence of the water phase in creams led to slight differences in the results of pH values, electrical conductivity and textural analyses. Some similarities were noticed as regards specific sensory characteristics such as gloss, fat, spreadability, and residual film of ointments and creams, whereas more or less significant differences were obtained between other attributes.

However, all products were microbiologically stable. The results of the fourth phase of the experimental study, according to the statistical processing of the results obtained, clearly showed a progressive reduction in the symptoms of skin inflammation in patients during the duration of immortelle treatment with a significant effect after 14 and 21 days of treatment compared to placebo. The initial results were observed after intensive use for more than seven days (first assessment), while the greatest effect was achieved after intensive treatment of inflammatory processes over a 21-day period. Participants using the placebo experienced some improvement, mainly at the beginning of the treatment, which may be attributed to the emollient effect of the base formulation. However, their progression plateaued during the second and third assessments. Treatment duration proved to be a critical factor for therapeutic efficacy. The best results were recorded in participants who applied *Helichrysum italicum* preparations continuously for 21 days, whereas shorter treatments (up to 7 days) showed a weaker effect.

Conclusions: The GS-MS method has proven the presence of 43 biological compounds in immortelle essential oil with anti-inflammatory, antimicrobial effects. Due to the method of microdilution method in broth, the antimicrobial effect of immortelle essential oil *H. italicum* was proved in the examined Gram-positive bacteria as being far more prominent compared to the tested Gram-negative bacteria. Semi-solid preparations (ointment and cream) with immortelle essential oil successfully act on the treatment of inflammatory skin processes, atopic dermatitis. To achieve a significant effect, it is necessary to treat inflammatory processes for more than 7 days. Ointment and cream with immortelle essential oil show pharmaceutical and technological optimal characteristics for use, while gel with immortelle essential oil shows swelling and is not suitable for use. In addition, it is important to emphasize differences in textural and sensory characteristics between ointments and creams with immortelle essential oil. The product should be selected depending on the type of skin changes and their localization. If the skin is dry and flaky then ointment with immortelle essential oil should be used. If dehydrated with itchy itching, a lipophilic cream with immortelle essential oil should be used. To achieve optimal therapeutic effect, the treatment should last longer than seven days, with the best results observed after three weeks of regular use of *Helichrysum italicum*-based preparations.

Keywords: semi-solid preparations; immortelle essential oil; *Helichrysum italicum*; inflammatory processes of the skin; atopic dermatitis; pharmaceutical and technological characteristics; anti-inflammatory activity; antimicrobial activity, natural products.

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical technology and cosmetology

UDC number:

PREDGOVOR

Koža je najveći organ ljudskog tijela i kao takva obavlja funkciju prve linije odbrane od spoljašnjih uticaja. Posredstvom kože ostvaruje se komunikacija između unutrašnjosti organizma i spoljašnjeg ambijenta. Kožne bolesti predstavljaju sve učestaliju pojavu koja se vezuje za razne uzročnike (genetska predispozicija, poremećaj imunološkog sistema, nutritivni alergeni, dejstvo faktora spoljašnje sredine i sl.). Među najzastupljenijim kožnim oboljenjima nalaze se prevashodno inflamatorne kožne bolesti (atopijski dermatitis, ekcem, psorijaza, itd.) Nauka je u stalnom procesu potrage za novim supstancama sa biološkom aktivnošću koje mogu pomoći u procesu njenog tretiranja. U posljednje vrijeme je sve veća primjena prirodnih polučvrstih preparata u liječenju kožnih upalnih bolesti, odnosno polučvrstih preparata sa biljnim supstancama. Istraživanjem raznih biljnih vrsta, nastoji se da dođe do onih koje će poslužiti kao novine u liječenju različitih kožnih oboljenja. Posebna pažnja se posvećuje biljnim vrstama i sekundarnim metabolitima koji mogu tretirati upalne procese i infekcije na koži.

U cilju dobijanja novih biološki aktivnih dermalnih preparata, koji neće imati neželjene efekte, neće štetiti koži u ovoj disertaciji analiziran je hemijski sastav i biološka aktivnost *in vitro* i *in vivo* uzorka etarskog ulja smilja, ekstrahovanog iz biljnih vrsta *Helichrysum italicum* iz područja ulcinjske obale.

U radu je korišćeno ulje smilja koje je dobijeno parnom destilacijom; nakon čega je uslijedilo ispitivanje biološke aktivnosti pomoću metode gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GS-MS). Potom su izrađeni polučvrsti preparati sa mast, krem i gel podlogom – inkorporiranjem 0,5% etarskog ulja smilja. Fizičko–hemijskom karakterizacijom utvrđeno je prisustvo mono- i seskviterpena kao dominantne komponente. Glavne detektovane komponente su: α -pinene (16,62%) i γ -curumene (14,06%). Osim toga, od važnosti su i naredna jedinjenja u etarskom ulju: β -selinene (7,39%), *neryl acetate* (6,04%), β -caryophyllene (5,02%), kao i α -selinene (4,92%). Prema literaturnim podacima ova jedinjenja posjeduju antimikrobne i antiinflamatorne aktivnosti.

Nakon karakterizacije ulja uzeta je u razmatranje njegova antimikrobna aktivnost. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *H. italicum* je testirana na sedam laboratorijskih kontrolnih sojeva mikroorganizama, na tri Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Enterococcus faecalis* ATCC

29212, i na četiri Gram negativne bakterije: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NCIMB 8267, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* NCTC 6017 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskog ulja *H. italicum* – korišćena je mikrodiluciona metoda u bujonu, izvedena u skladu sa smjernicama Evropskog komiteta za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobna sredstva (engl. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST 2020, 2023). Etarsko ulje smilja je pokazalo najbolju antimikrobnu aktivnost protiv *E. faecalis* (MIC je 0,012 mg/ml), zatim protiv *S. epidermidis* (MIC je 0,021 mg/ml) i *S. aureus* (MIC je 0,053 mg/ml).

Nakon izrade polučvrstih preparata (mast, krem i gel), pristupljeno je ispitivanju njihovih farmaceutsko-tehnoloških karakteristika i mikrobiološke stabilnosti. Kod formulacija sa gel podlogom se pojavilo otečnjavanje, tako da u tom pogledu nije bilo moguće nastaviti sa analizama. Međutim, sprovedena su sljedeća ispitivanja: organoleptička ispitivanja, provodljivost, pH vrijednost, test centrifugiranja, teksturna analiza, analiza senzorne karakteristike i mikrobiološke stabilnosti. Ovako dobijeni rezultati su ukazali na stabilnost preparata, kao i na optimalne karakteristike za njihovu direktnu primjenu na koži.

Polučvrsti preparati su ispitani *in vivo* kod 100 ispitanika, duplo slijepom metodom u kojoj je 50 ispitanika dobilo preparat sa etarskim uljem smilja (sa mast ili krem podlogom), dok je 50 ispitanika dobilo placebo preparat (samo podlogu bez aktivne supstance). Za procjenu efektivnosti se koristio SCORAD test. U pitanju je najviše validirani *scoring* sistem za atopijski dermatitis. Upravo ovaj indeks primijenjen je kako bi se u velikom broju radova utvrdio stepen uspješnosti liječenja. Dio intenziteta SCORAD-a se sastoji od 6 stavki: eritem, edem/papulacija, ekzorijacije, lihenifikacija, kruste i suvoća, pri čemu se svaka stavka može ocijeniti na skali od 0 do 3. Pored toga, SCORAD indeks sadrži i 2 subjektivna kriterijuma: nesanica (eng. *Sleep disturbances*) i svakodevni svrab (eng. *Itching*). Stepene se može ocijeniti od 0 do 100. Formula SCORAD indeksa je: $A / 5 + 7B / 2 + C$. U ovoj formuli, A je definisano kao stepen kožnih lezija (0 – 100), B je definisano kao intenzitet (0 – 18), a C je definisano kao subjektivni simptom (0 – 20). Maksimalni rezultat SCORAD indeksa je 103. Komponenta A mjeri stepen kožnih lezija koristeći pravilo devetki. Komponenta B procjenjuje intenzitet bolesti na osnovu 6 specifičnih simptoma (eritem, edem/papulacija, curenje/kore, ekzorijacija, lihenifikacija, suvoća).

Posljednji dio, komponenta C, fokusira se na subjektivno iskustvo pacijenta sa svrabom i gubitkom sna. Postoje dvije verzije SCORAD indeksa: klasični (standardni) SCORAD, koji procjenjuje ljekar u saradnji sa pacijentom, i PO-SCORAD (engl. *Patient-Oriented SCORAD*), koji pacijent sam koristi za praćenje težine svog atopijskog dermatitisa kroz vrijeme. U ovoj disertaciji korišten je klasični SCORAD indeks, pri čemu su pacijenti u saradnji sa dermatologom popunili upitnik, uključujući i objektivni i subjektivni dio procjene svog stanja.

Ispitanici su dobili SCORAD upitnik prije tretiranja dermatoze i na svakoj kontroli 7, 14 i 21 dana, koji su popunili uz praćenje simptoma od strane dermatologa. Osigurana je anonimnost i saglasnost svih ispitanika.

Dobijeni rezultati govore u prilog činjenici da izrađeni preparati sa etarskim uljem smilja nakon 7 dana redovnog korišćenja – daju pozitivne rezultate kod atopijskog dermatitisa, kao i da dovode do poboljšanih rezultata na svakoj sljedećoj kontroli u odnosu na placebo. Ovakav rezultat neizostavno ukazuje na njihov potencijal, budući da imaju i mogućnost implementacije koncepta personalizovane terapije kod različitih stanja kože.

Skraćenice

UV – ultraljubičasto zračenje

SZO – Svjetska zdravstvena

organizacija Ph. Eur. – Evropska

farmakopeja

Uredba EU – Uredba Evropske unije (engl. *Regulation of the European Parliament*)

SC – Stratum corneum

NMF – prirodno vlažeći faktor (engl. *Natural Moisturising Factors*)

TEWL – transepidermalni gubitak vode (eng. *Transepidermal water*

loss) FLG – filagrin

AD – atopijski dermatitis

H. italicum – *Helichrysum italicum*

HIEU – *Helichrysum italicum* etarsko

ulje PAF – trombocit-aktivirajući faktor

PVP – polivinilpirolidon

SCORAD – indeks za utvrđivanje težine atopijskog dermatitisa (engl. *SCORing Atopic Dermatitis*)

PO-SCORAD - pacijentu prilagođena verzija SCORAD indeksa (eng. *Patient-Oriented SCORAD*)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *Minimum Inhibitory Concentration*)

MBK – minimalna baktericidna koncentracija (engl. *Minimum Bactericidal Concentration*)

MRSA– Meticilin rezistentni stafilokokus aureus (engl. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

DMSO – dimetil sulfoksid

TIS – indeks koji ispituje tri parametra težine atopijskog dermatitisa (engl. *Three Item Severity*)

CETI – Centar za ekologiju i

tehnologiju MHB – Mueller-Hinton

bujon

MF 2008 – Magistralne formule 2008

INCI – Međunarodna nomenklatura sastojaka kozmetičkih proizvoda (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*)

AM – aktivna

mast PM –

placebo mast

AK – aktivna

krema PK –

placebo krem

AG – aktivni

gel PG –

placebo gel

TPA – profil teksturne analize

TA-STF – teksturna analiza – specifična sonda za teksturnu analizu

SPSS (engl. *Statistical Package for the Social Sciences*) – Statistički program za društvene nauke.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Rast trenda upotrebe ljekovitog bilja.....	1
1.1.1 Upotreba ljekovitog bilja u topikalnim preparatima.....	2
1.1.2 Struktura kože.....	2
1.1.3 Inflamatorne bolesti kože.....	5
1.2. Etarska ulja.....	8
1.2.1 Istorijat.....	8
1.2.2 Opšte karakteristike etarskih ulja.....	10
1.2.3 Hemijski sastav etarskih ulja.....	11
1.2.4 Terapijska upotreba i značaj etarskih ulja.....	13
1.2.5 Biološka aktivnost etarskih ulja.....	14
1.3. Etarsko ulje smilja.....	14
1.3.1 Terapijska upotreba i biološka aktivnost etarskog ulja smilja	16
1.3.2 Hemijski sastav etarskog ulja smilja (<i>H. Italicum</i>)	17
1.3.3 Antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja	19
1.4. Antiinflamatorna aktivnost etarskog ulja smilja na koži	23
1.5. Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja	24
1.5.1 Karakteristike podloga	25
1.5.2 Emolijentne podloge.....	26
1.5.3 Zahtjevi koje podloge moraju da ispune	32
1.6. Ispitivanje <i>in vivo</i> antiinflamatornog efekta polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja	37
1.6.1 SCORAD test	37
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	43
3. EKSPERIMENTALNI DIO	44
3.1 I faza eksperimentalnog rada	44
3.1.1 Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika ulja smilja.....	44
3.1.2 Ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja smilja.....	46
3.1.3 Ispitivanje antimikrobnih aktivnosti etarskog ulja smilja.....	47
3.2 II faza eksperimentalnog rada.....	48
3.2.1 Izrada polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja.....	48

3.3 III faza eksperimentalnog rada	54
3.3.1 Farmaceutsko – tehnološka ispitivanja polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja.....	54
3.3.2 Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta formulacija	58
3.4 IV faza eksperimentalnog rada	60
3.4.1 Ispitivanje antiinflamatornog efekta polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja na kožne inflamatorne procese	60
3.4.2 Dizajn studije	60
3.4.3 Statistička analiza	63
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	64
4.1 Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada	64
4.1.1 Organoleptički izgled etarskog ulja smilja.....	64
4.1.2 Hemijska karakterizacija etarskog ulja smilja	64
4.1.3 Antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja	69
4.2 Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada	71
4.2.1 Organoleptičke karakteristike polučvrstih preparata	71
4.2.2 Provodljivost.....	73
4.2.3 pH vrijednost polučvrstih preparata.....	74
4.2.4 Test centrifugiranja	75
4.2.5 Teksturna analiza	76
4.2.6 Senzorna procjena ispitivanih uzoraka	82
4.3 Mikrobiološki kvalitet ispitanih formulacija	86
4.4 Rezultati i diskusija IV faze eksperimentalnog rada	87
4.4.1 Statistička obrada podataka <i>in vivo</i> ispitivanja	87
4.4.2 Faktori koji su uticali na efikasnost preparata	103
4.5 Ograničenja.....	106
4.5.1 Mali uzorak	106
4.5.2 Otečnjavanje gel podloge	107
4.5.3 Kratko vrijeme.....	107
4.5.4 Procjena antiinflamatornog efekta preko SCORAD indeksa.....	107
4 5.5 Odsustvo uporedne analize sa standardnom kortikosteroidnom terapijom	108
5. ZAKLJUČAK.....	109
6. LITERATURA	111

1. UVOD

1.1 Rast trenda upotrebe ljekovitog bilja

Naučno-istraživački interes u farmaciji u posljednje vrijeme prevashodno je usmjeren na proučavanje prirodnih resursa (autohtono bilje), kao i na njihovu potencijalnu primjenu u farmakoterapiji. Ljekovite biljke su historijski dokazale svoju vrijednost kao izvor molekula sa terapijskim potencijalom, a danas i dalje predstavljaju važan potencijal za identifikaciju novih lijekova. Posljednjih decenija, farmaceutska industrija se uglavnom fokusirala na sintetička jedinjenja kao izvor otkrivanja lijekova. Međutim, u isto vrijeme postoji trend opadanja u broju novih lijekova koji dolaze na tržište, i zbog toga utiču na naučno interesovanje za otkrivanje lijekova iz prirodnih izvora, uprkos poznatim izazovima (1). Intenzivno i kontinuirano interesovanje za ljekovito bilje dovelo je do današnjeg modernog i sofisticiranog načina njihove obrade i upotrebe.

Biljni proizvodi nalaze se, posljednjih godina, u fokusu naučnih istraživanja zbog njihove velike potencijalne efikasnosti i boljeg bezbjednosnog profila, niske toksičnosti, biokompatibilnosti, kao i niže cijene (2). Naučnim ispitivanjima potvrđena su brojna empirijska iskustva, a farmakološkim i kliničkim studijama afirmisana realna terapijska svojstva velikog broja ljekovitih biljnih sirovina. Pored toga, mnogo napora je uloženo u proučavanje uslova proizvodnje, uzgoja ljekovitog bilja i njihovog tretiranja za izolovanje aktivnih supstanci. U upotrebi su fitopreparati sa definisanim aktivnim komponentama, verifikovanim djelovanjem i terapijskim efektom. Ovim je utvrđena naučna osnova za racionalnu fitoterapiju. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), 70 – 95% svjetske populacije oslanja se na tradicionalnu medicinu u pogledu primarne zdravstvene zaštite. Potvrđena je upotreba ljekovitih biljaka u 170 država svijeta (3). Metode i parametri ispitivanja kvaliteta ljekovitog bilja, kao i sirovina za njihovu izradu, nalaze se u regionalnim i nacionalnim farmakopejama. Kao zlatni standard se koristi Evropska farmakopeja (engl. *Ph. Eur.*). Kvalitet biljnih droga i preparata mora neizostavno biti u skladu sa farmakopejskim standardima i zahtjevima.

1.1.1 Upotreba ljekovitog bilja u topikalnim preparatima

Prirodni sastojci se vjekovima koriste za tretman i njegu kože. Interesovanje za farmakološke efekte biljaka najviše je poraslo zbog njihove sigurnosti i primjenljivosti u formulaciji farmaceutskih i dermalnih preparata. S obzirom na postojeće kriterijume u pogledu kvaliteta, bezbjednosti i efikasnosti, savremeni dermalni i dermokozmetički proizvodi za njegu kože trebalo bi da ispune cjelokupan niz zahtjeva. Sa jedne strane, Uredba EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima (engl. *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament*) definiše zahtjeve koji se moraju ispuniti, a sa druge strane, sami korisnici/potrošači postavljaju uslove koji se, prije svega, odnose na senzorne karakteristike proizvoda (4).

Biljne supstance se često i efikasno koriste za topikalnu primjenu gdje ostvaruju lokalni ili sistemski efekat. One se inkorporiraju u podlogu koja predstavlja njihov nosač i omogućava njihovo farmakološko djelovanje. Kao podloga sa inkorporiranim djelovima biljke ili njihovim metabolitima mogu ostvariti terapijske efekte lokalno na koži ili sistemske. Primjeri ovih terapijskih efekata su: tretiranje akni, hiperpigmentacija, inflamatorne bolesti kože, alergija na koži, smanjenje bora i sl. (4). Shodno tome, istraživanja se pojavljuju u polju dermalnih i kozmetičkih preparata usklađujući svoje interese sa zdravstvenim i ekonomskim izazovima. Da bismo shvatili kako jedan preparat djeluje na kožu, važno je da shvatimo njenu strukturu, kao i funkciju njenih ćelija.

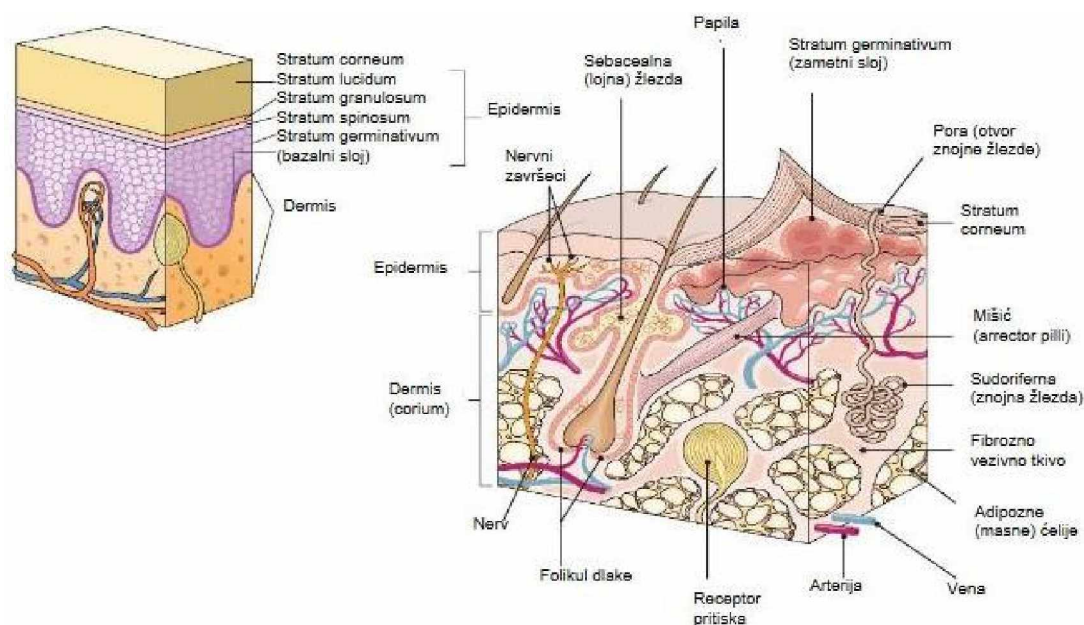
1.1.2 Struktura kože

Koža je naš najveći organ, koji čuva kosti, mišiće, ligamente i unutrašnje organe od mehaničkih stimulansa, mikroorganizma, ultraljubičastog (UV) zračenja, alergena i iritanasa. Ona funkcioniše na taj način što obezbjeđuje neophodno povezivanje između unutrašnjeg i spoljašnjeg okruženja i faktora. Njena jedinstvena uloga i funkcija, direktno je povezana i rezultat je njene strukture i sastava, posebno najpovršnijeg dijela, epidermisa. Naime, epidermis, dermis i hipodermis (engl. *Subcuties*) predstavljaju 3 glavna sloja kože. Svaki sloj se sastoji od nekoliko podslojeva. Glavna ćelijska komponenta epidermisa uključuje: keratinocite, melanocite, Merkelove ćelije, $\gamma\delta$ T-limfocite i Langerhansove ćelije. Epidermis je spoljašnji sloj koji mi vidimo i možemo da dodirnemo. Sastoji se od 5 podslojeva ćelija 2 keratinocita.

Ove ćelije se proizvode u najdubljem bazalnom sloju. Iz najdubljeg sloja one migriraju gore prema površini kože. Dok migriraju, one prolaze kroz dinamične procese i promjene. Ovaj proces se naziva keratinizacija. Keratinociti u bazalnom sloju epidermisa čuvaju svoju sposobnost da se razmnožavaju prema gore u cilju formiranja spinoznog sloja i zrnastog sloja (5). Glavni podslojevi epidermisa su: *bazalni sloj* (lat. *stratum basale*), najdublji unutrašnji sloj u kojem se proizvode keratinociti, *spinozni sloj* (lat. *stratum spinosum*) u kome dolazi do proizvodnje keratina (proteinskih vlakana) od strane keratinocita, koja kasnije poprimaju oblik vretena, zatim *zrnasti sloj* (lat. *stratum granulosum*), u kojem se proizvode tvrde granule, koje se kreću dinamično prema gornjim djelovima epidermisa, gdje se transformišu u keratin i epidermalne lipide (masne ćelije kože), *svijetli sloj* (lat. *stratum lucidum*) gdje su ćelije ravne, gusto raspoređene, bez vidljivih granica između njih i *rožnati sloj* (lat. *stratum corneum*) koji predstavlja najviši sloj epiderme sa približno 20 podslojeva pljosnatih, mrtvih ćelija. Broj podslojeva zavisi od dijela tijela. Sloj mrtvih ćelija se redovno ljušti (one diferenciraju) u procesu poznatom kao ljuštenje kože. Debljina epidermisa se kreće od oko 0,05 do 1,5 mm, zavisno od dijela tijela. Za potpunu izmjenu (eng. *Turnover*) epidermisa potrebno je 4 nedjelja. U slučaju povrede ili upale, povećava se kapacitet proliferacije keratinocita. U rožnatom sloju se nalaze pore znojnih žlijezda, kao i otvori lojnih žlijezda. Ćelije rožnatog sloja se međusobno povezuju sa epidermalnim lipidima. Ovi lipidi su važni za vitalnost kože, jer formiraju zaštitnu barijeru i vezuju vlagu. Kad nedostaju lipidi rožnatog dijela, koža postaje suva, u nekim slučajevima zategnuta i gruba. Lipidni dvosloj je sastavljen od gusto zbijene laminarne strukture koja u svom sastavu sadrži: ceramide (50%), holesterol (25%) i masne kiseline (10-20%). Ceramidi koji čine dominantni sastojak lipidnog sloja ključni su za očuvanje zdrave kože. Tokom vremena, unutrašnji i spoljašnji faktori dovode do smanjenja prisustva ceramida, što rezultira dehidriranom, suvom i iritiranom kožom. Epiderma je zaštićena i pokrivena emulzijom vode i lipida koji se definiše kao hidrolipidni film. Cjelina ovog filma se održava od sastojaka znojnih i lojnih žlijezda, djelujući pritom kao dodatna antimikrobna barijera. Navedena barijera pripisuje se slaboj kiselosti pH površine kože. Integritet *stratum corneum*-a (SC) predstavlja integritet barijere kože i njene propustljivosti. Hidratacija SC-a je takođe ključna za integritet SC-a i održavanje homeostaze kožne barijere. Komponente prirodnog vlažećeg faktora (engl. *Natural Moisturising Factors*) (NMF) unutar korneocita doprinose hidrataciji SC-a. Sastav NMF-a uključuje: slobodne aminokiseline, pirolidon karboksilnu kiselinu, mliječnu kiselinu,

urokansku kiselinu, organske kiseline, peptide, šećere, ureu, citrate, glicerol, itd. Filagrin (FLG), jedan od terminalnih markera diferencijacije epidermisa, takođe pomaže u hidrataciji SC-

a. Filagrin je veliki (37-kD) histidinom bogat protein nazvan po svojoj sposobnosti da agregira keratinske intermedijarne filamente (filament agregirajući protein). FLG je važan epidermalni strukturni protein, neophodan za strukturu i funkciju rožnatog sloja (SC) i u velikoj mjeri je uključen u održavanje funkcije kožne barijere. Nedostatak ili disfunkcija FLG-a može se povezati sa različitim kožnim poremećajima kao što su: kseroza, *Ichthyosis vulgaris* i atopijski dermatitis (AD). Predloženo je da na nivo FLG-a i njegovih produkata razgradnje utiču ne samo mutacije gubitka funkcije FLG-a, već i endogeni ili egzogeni faktori. Filagrin se razgrađuje u slobodne aminokiseline u SC-u. Ove aminokiseline se dalje metabolizuju u higroskopne derivate kao što su: pirolidon, karboksilna kiselina iz glutamina i urokainska kiselina iz histidina, što čini filagrin jednim od glavnih faktora koji utiču na status hidratacije SC-a (6, 7). Na Slici 1 (8) predstavljena je struktura kože i njeni djelovi.



Slika 1. Struktura kože (preuzeto i prilagođeno iz:

http://www.essentialdayspa.com/Skin_Anatomy_And_Physiology.htm) (8)

Bazalna membrana predstavlja granicu između epidermisa i dermisa. Njena uloga je barijerna funkcija i omogućava razmjenu različitih supstanci sa dermisom. Dermis je vaskularizovano vezivno tkivo i nalazi se ispod epidermisa. Ima potpornu i nutritivnu ulogu. Sadrži nerve, krvne i limfne sudove. Sastoji se od površinskog papilarnog i dubljeg retikularnog dermisa. Papilarni dermis u svom sastavu se sastoji od mreže mikrofibrila i elastičnih vlakana kao što su kolagen i elastin. Efekat UV zraka na vlakna elastina u dermisu je glavni uzrok starenja kože i gubljenja volumena kože. Retikularni sloj u svom sastavu ima gusto vezivno tkivo sastavljeno od fibroblasta koji su uronjeni u ekstracelularni matriks. Ekstracelularni matriks se sastoji od glikozaminoglikana (hijaluronska kisjelina i dermatan sulfat) i vlaknastih proteina (kolagen, elastin, fibronektin, laminin) (5).

Hipodermis (masno tkivo ili potkožno tkivo) je treći i posljednji sloj kože. Smanjenje ovog masnog tkiva može uzrokovati opuštenost i bore. Ovo predstavlja najdublji i najdeblji sloj kože. U ovom dijelu kože se nalaze: adipociti (masne ćelije), fibroplasti, makrofagi i prekursorne ćelije. U njemu se nalaze i znojne žlijezde i ima zadatak očuvanja topline, pogodne tjelesne temperature i zaštite vitalnih organa (5).

1.1.3 Inflamatorne bolesti kože

Kožne bolesti predstavljaju česte zdravstvene probleme koji pogađaju sve uzraste, od novorođenčadi do starijih, i uzrokuju negativne efekte na više načina. Inflamatorne kožne bolesti, uključujući akne, kontaktne alergijske, iritantne, atopijske dermatitis i druge vrste ekcema, kao i psorijazu između ostalog, obuhvataju glavnu oblast u dermatologiji (6). Ove bolesti su izazvane širokim spektrom stanja kao što su: genetska predispozicija, alergijske reakcije, izloženost faktorima iz okoline, kao i autoimune bolesti. Ekcem kao tipična inflamatorna bolest kože je složena patologija, koja je rezultat interakcije više genetskih i višestrukih faktora životne sredine. Studije pokazuju da je bolest u velikoj mjeri naslijeđena, naglašavajući snažnu ulogu genetske predispozicije, dok brzi porast prevalencije ekcema u razvijenom svijetu naglašava važnost spoljašnjih faktora. Genetska predispozicija je povezana sa gubitkom funkcije FLG gena, koji kodira protein kožne barijere filagrina. Genetički određeni nedostatak filagrina u koži značajno povećava rizik od svake bolesti u koži – tzv. „atopijski marš“, uključujući: ekcem, atopijsku astmu, atopijski dermatitis, psorijazu, alergijski rinitis i alergiju na kikiriki.

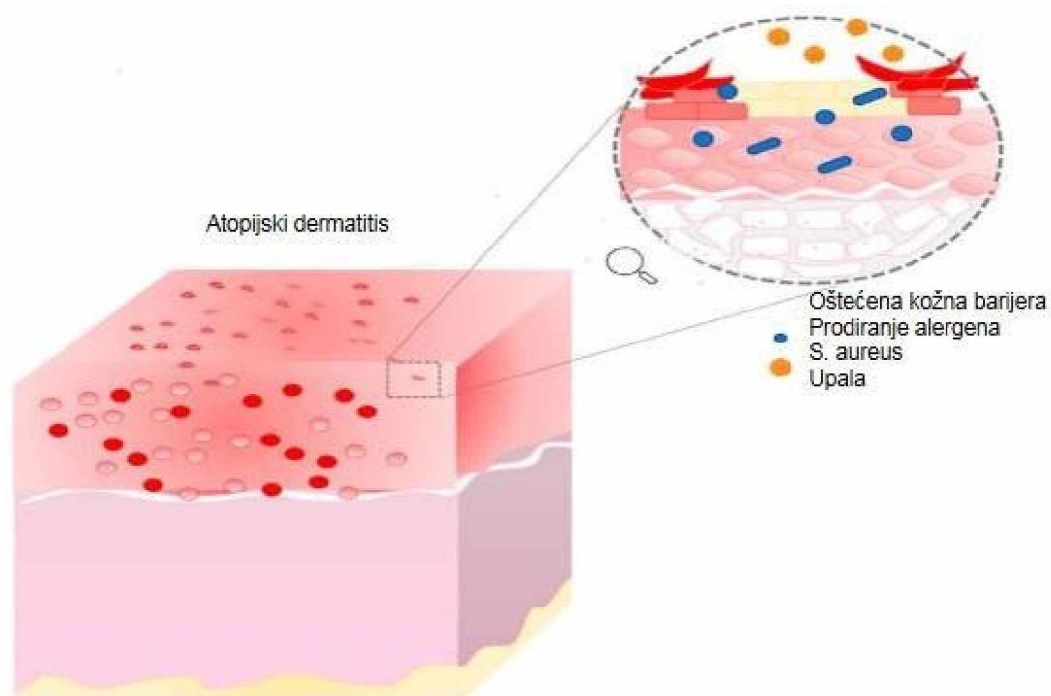
Neophodno je naglasiti da je filagrin strukturni, S100 kalcijum vezujući epidermalni *stratum corneum* (SC) protein. Uključen je u normalnu funkciju SC-a u smislu hidratacije i održavanja kožne barijere. Takođe je odgovoran za vezivanje keratinskog filamenta za proizvodnju mikro-fibrila. Tokom epidermalne diferencijacije, njegov nerastvorljivi prekursor, profilagrin, je defosforiliran i postaje rastvorljiviji. Zatim, različite proteaze cijepaju molekul u monomere, formirajući konačnu strukturu (7). Uloga FLG-a je da generiše prirodne vlažeće faktore (NMF) i da obezbijedi potporu za ekstracelularni lipidni matriks. Ako se filagrin ne sintetizuje pravilno ili ako postoji mutacija, onda će diferencijacija keratinocita biti disregulisana, a barijera će biti ugrožena (5, 7).

Atopijski dermatitis se definiše kao hronična inflamatorna bolest kože u kojoj su glavni sljedeći simptomi: kseroza, suva koža sa svrabom i pojava ekcema. U ovom stanju, kožna barijera je ugrožena, a pojedini pacijenti su više izloženi sekundarnim infekcijama, prodiranju alergena i transepidermalnom gubitku vode (engl. *Transepidermal water loss*, TEWL). Štaviše, i druge karakteristike kao što su upala, imunološka disregulacija i mutacija filagrina mogu uticati na pacijente sa AD-om (6).

Psorijaza je papuloskvamozna, inflamatorna dermatosa hroničnog toka koja se najčešće javlja na kapilicijumu, laktovima, koljenima, noktima i rjeđe na semimukozi i mukozi. Javlja se u bilo kojoj životnoj dobi, najčešće između 20. i 50. godine života. Podjednako obolijevaju i žene i muškarci. Najviše je zastupljena *Psoriasis vulgaris* koja je imunogenetski predisponiran, inflamatorni i proliferativni poremećaj. Genetske i imunološke karakteristike psorijaze su istovjetne kao i kod drugih autoimunih bolesti. Patogeneza psorijaze počinje inflamacijom T-limfocita u dermisu. Nakon toga nastaje hiperproliferacija epidermalnih ćelija, ubrzavanjem vremena zamjene sa 23 – 28 dana na 3 – 5 dana (6, 7).

Patogeneza inflamatornih bolesti kože se pripisuje i disfunkciji epidermalne barijere i hroničnoj upali na koži. Kod zdrave kožne barijere, korneociti zadržavaju vlagu, dok lipidni dvosloj sprečava gubitak vode između korneocita. Sa druge strane, narušena kožna barijera dovodi do suvoće kože, smanjuje se količina vlažećih faktora, a neadekvatan lipidni dvosloj pruža nedovoljnu permeabilnost barijere. Upravo ovaj narušeni dvosloj lipida omogućava prolaz za gubitak vode, ulazak iritansa i alergena. Kod dermatitisa, hidratacija SC-a se smanjuje i povećava se transepidermalni gubitak vode (TEWL). Povećani TEWL je prisutan kao prekursor ekcema u ranom djetinjstvu, zahvaljujući čemu se uništava barijera kože, dovodeći do njene suvoće i pucanja.

Na ovaj način poremećena barijerna funkcija u velikoj mjeri doprinosi alergijskoj senzibilizaciji, kao i razvijanju udruženih patologija kao što su infekcije kože, upravo zbog rasta i razvijanja mikroorganizama (slika br. 2) (7). Glavni simptomi su: peckanje, svrab, crvenilo, izražena suvoća kože, praćena sa reminentnim tokom i egzacerbacijama koje povremeno mogu da se manifestuju kao bol i grebanje i nedostatak sna. Kožne bolesti ne uzrokuju samo spoljašnje probleme, već negativno utiču i na kvalitet života pacijenata, smanjuju produktivnost i normalno funkcionisanje. Kod 40% pacijenata atopijski dermatitis iz djetinjstva traje i u odrasloj dobi (5). Oslanjajući se na ova zapažanja, nedavna klinička ispitivanja su proizvela dokaze koji ukazuju na to da intenzivna upotreba emolijentnih preparata sa antiinflamatornim djelovanjem, s ciljem poboljšanja kožne barijere, smanjuje učestalost ekcema za i do 50% (6, 7).



Slika 2. Uništena barijera kože kod atopijskog dermatitisa (preuzeto i prilagođeno iz: <https://encyclopedia.pub/entry/31460>) (9)

Dok lokalni kortikosteroidi, koji predstavljaju svojevrsan oblik steroidnih antiinflamatornih lijekova, ostaju primarna opcija liječenja za mnoge kožne bolesti, njihova dugotrajna upotreba, međutim, dovodi do visoke stope recidiva i značajnih neželjenih efekata, posebno u pedijatrijskoj starosnoj grupi (7, 9).

Glavni principi liječenja dermatitisa su: izbjegavanje alergena i iritansa, upotreba emolijenasa, lokalna ili sistemska upotreba antiinflamatornih preparata. Zbog udruženih bakterijskih infekcija osim antiinflamatornog potrebno je korišćenje i antibakterijskog preparata. (7, 8). Dokazano je da upotreba emolijensa za ekcematozni dermatitis kao što je atopijski dermatitis (AD) – poboljšava funkciju barijere, obnavljanjem hidratacije u SC-u i smanjenjem transepidermalnog gubitka vode (TEWL).

Neke biljke i njihovi djelovi se često koriste za liječenje ovih bolesti. Upotreba biljaka je stara koliko i samo čovječanstvo. Takođe, pogodna je sirovina za proizvodnju novih sintetičkih sredstava. Iako ljekovito bilje ima čitav niz aktivnih komponenata, etarsko ulje se ističe sa najvećim udjelom i sadržajem bioaktivnih sastojaka.

1.2. Etarska ulja

1.2.1 Istorijat

Neizbježno je govoriti o istoriji etarskih ulja, a ne spomenuti činjenicu da je riječ o nerazdvojnoj i usko povezanoj cjelini sa istorijskom evolucijom medicine – o čemu svjedoče reference pronađene u drevnim medicinskim tekstovima, raspravama, umjetničkim djelima, slikama i artefaktima, kao dragocjeno nasljeđe civilizacija čije postojanje je zabilježeno prije više od 5,000 godina (10, 11). Upotreba etarskih ulja je varirala u različitim kulturama, od isključivo religiozne primjene do tretiranja raznih bolesti. Ne postoji precizno definisan podatak o tome kada je počela era njihove primjene kao efikasnih ljekovitih sredstava, ali se može potvrditi da je posljednjih godina stepen poznavanja njihove adekvatne upotrebe i opštih karakteristika podignut na viši nivo širom svijeta. Na Bliskom istoku, upotreba etarskih ulja datira još od 4000 godina prije nove ere, prema istorijskim podacima kao što su tablice pronađene na tlu stare Mesopotamije. S obzirom na činjenicu da je ovaj region predstavljao centar trgovine biljem i smolama, upravo su etarska ulja na ovim prostorima tada imala duboko definisanu ulogu u religijskim, medicinskim i svakodnevnim praksama. (11, 12).

Uviđajući značaj tradicionalne medicine, brojni naučnici su sredinom XX vijeka nastojali da u potpunosti iskoriste sve pogodnosti podataka o korišćenju ljekovitog bilja drevnih naroda – u cilju dobijanja novih lijekova, uz neizbježnu primjenu i potvrdu savremenih naučnih radova i zaključaka (10). Osim toga, utvrđivanjem činjenice da biljke mogu proizvesti stotine ili čak hiljade metabolita – podstaknuto je ogromno interesovanje za fitohemijsko istraživanje njihovih dijelova (11). Shodno tome, posljednjih godina sprovedena su intenzivna biološka i fitohemijska ispitivanja sekundarnih metabolita biljaka (12). Realizacijom brojnih studija *in vitro* i *in vivo*, ostvareni su rezultati koji neizostavno govore u prilog uspješnosti upotrebe etarskih ulja za tretiranje, kao i u liječenju brojnih upalnih procesa, infekcija, ali i sistemskih i lokalnih oboljenja (11, 12).

Uzimajući u obzir brojne prednosti koje se pripisuju etarskim uljima u odnosu na sintetičke agense, neosporno je da posljednjih godina njihovo istraživanje u cilju većeg korišćenja nije samo interes već i potreba. Neke od ovih prednosti uključuju sljedeće: netoksičnost, biorazgradivost, kao i smanjenje rizika od pojave rezistentnosti. Biljke i biljna jedinjenja djeluju putem višestrukih aktivnih principa, odnosno različitih mehanizama djelovanja, što im omogućava uticaj na više oboljenja u odnosu na sintetička sredstva (12, 13).

Biljke vjekovima služe kao izvor biološki aktivnih supstanci, što potvrđuje činjenica da približno 40% svih lijekova ima biljno porijeklo. Iako od oko 250.000 poznatih cvjetnica samo mali procenat (oko 6%) je testiran na potencijalnu biološku aktivnost, dok je 15% podvrgnuto fitohemijskim analizama ovi podaci ističu veliki neiskorišćeni potencijal ovog područja. Zbog raznovrsnih bioloških svojstava, biljni metaboliti su našli primjenu u farmaceutskoj industriji, kozmetici, aromaterapiji i savremenoj medicini širom svijeta. (13, 14, 15).

1.2.2 Opšte karakteristike etarskih ulja

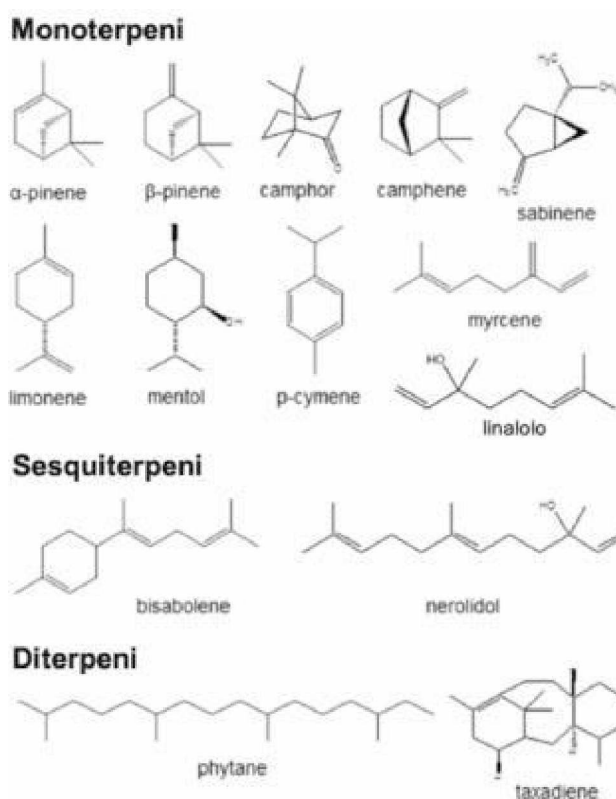
Etarska ulja (lat. *Aetherolea*) se definišu kao prirodni produkti koji se dobijaju iz biljnih sirovina, kao njihovi metaboliti. Predstavljaju isparljive mješavine različitih hemijskih jedinjenja karakterističnog mirisa i ukusa, uljane konzistencije. Sintetiziraju se u svim biljnim organima: cvjetovima, listovima, sjemenkama, plodovima, korijenju i kori. Danas je poznato blizu 3000 različitih vrsta etarskih ulja, od kojih 300 vrsta ima komercijalni značaj (16). Zahvaljujući svom hemijskom sastavu, mogu djelovati: protivupalno, analgetski, antiseptički, antimikrobno, virucidno, antiparazitski, fungicidno i/ili insekticidno. Međutim, činjenica je da sastav etarskog ulja može biti varijabilan u jednoj istoj biljci. Hemijski sastav etarskih ulja može značajno varirati i između različitih primjeraka iste vrste. Ova varijabilnost je povezana s uslovima sredine u kojoj biljka raste, prije svega klimatskim faktorima, ali i činjenicom da većina biljaka korišćenih za proizvodnju etarskih ulja, bilo da se radi o kultivisanim vrstama, posjeduje brojne varijetete, podvarijetete, sorte, klonove i hibride. Zbog visokog genetičkog diverziteta biljaka, hemijski sastav ulja može biti znatno neujednačen (17). Osim toga, etarska ulja predstavljaju mješavine velikog broja različitih hemijskih jedinjenja. U tom pogledu, utvrđeno je više od 500 hemijskih jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja. Kad je riječ o organskim jedinjenjima, mogu se nabrojati: ugljovodonici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, estri, etri, laktoni i dr. Dijelevi ih prema skeletu ugljovodonika, sastojci etarskih ulja obično se dijele u tri velike grupe na: terpene, fenilpropanske derivate i ostala jedinjenja (18). Prema zaključcima dosadašnjih ispitivanja, prihvaćeno je mišljenje da je kvalitativni sastav etarskih ulja pod genetičkom kontrolom vezan za vrstu ili podvrstu biljke, dok su variranja u kvantitativnom sadržaju komponenata pod uticajem spoljašnjih faktora (19).

Aromatične biljke iz kojih se ekstrahuju etarska ulja se uglavnom nalaze u područjima umjerene do tople klime, kao što je Mediteran, gdje predstavljaju važan dio tradicionalne i narodne medicine. Etarsko ulje se uglavnom nalazi u slobodnom obliku u biljnom materijalu i dobija se direktnim podvrgavanjem biljnog materijala destilaciji. Metode destilacije koje se koriste su: vodena destilacija, vodeno-parna destilacija, parna destilacija, hidrodifuzija, kao i vakuum-destilacija. Tokom procesa destilacije dobijaju se dva različita proizvoda: etarsko ulje i hidrolat. Prvi navedeni proizvod, etarsko ulje, sadrži sastojke rastvorljive u masti i predstavlja koncentrisani, aromatični proizvod, dobijen iz biljnih materijala kao što su: cvjetovi, listovi,

korijen, kora ili smola. Zbog njihove koncentracije i intenzivnog mirisa se koriste u malim količinama. Drugi predstavljeni proizvod, hidrolat, ili floralna voda sadrži sastojke biljke koji mogu da se rastvore u vodi. Za razliku od etarskog ulja, sadrži vodu gdje su rastvorene manje količine esencijalnih sastojaka biljke, uključujući komponente rastvorljive u vodi. Samim tim, hidrolati su blaži i manje koncentrisani u odnosu na etarska ulja. Zbog manje koncentracije i potentnosti, smatraju se pogodnijim za direktnu primjenu na koži (18).

1.2.3 Hemijski sastav etarskih ulja

Etarska ulja predstavljaju složene mješavine koje mogu da sadrže više (od 20 do 60) komponenata u različitom kvantitativnom odnosu (Slika 3). Veoma često, u sastavu etarskih ulja ulaze 3-4 glavne komponente, čija je koncentracija veća (20-95%) u odnosu na ostale komponente koje su prisutne u manjem procentu. Glavne komponente etarskih ulja su terpeni/terpenoidi i aromatična i alifatična jedinjenja male molekulske mase. Na Slici 3, predstavljene su hemijske strukture glavnih komponenti koje ulaze u sastav etarskih ulja (20).



Slika 3. Hemijske strukture odabranih komponenti etarskih ulja (preuzeto i prilagođeno iz: Eslahi, H.; Fahimi, N.; Sardarian, A. Chemical Composition of Essential Oils: Chemistry, Safety and Applications. Ess. Oils in Food Proc. 2017) (119-171) (10.1002/9781119149392.ch4) (20)

Terpeni

Terpeni su glavna jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja i daju karakterističan miris biljnom materijalu. Pripadaju grupi prirodnih jedinjenja opšte formule $(C_5H_8)_n$. Prema broju ugljenikovih atoma u njihovoj molekulskoj strukturi, terpeni se klasifikuju u nekoliko glavnih grupa: hemiterpeni (C_5), monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}), tetraterpeni (C_{40}), politerpeni ($>C_{40}$). Terpeni se često nazivaju i izoprenoidi. U sastav etarskih ulja ulaze naredne grupe terpenskih jedinjenja: monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni. U sastavu etarskih ulja najčešće ulaze monoterpeni i seskviterpeni (20).

Hemiterpeni se definišu kao najjednostavniji terpeni, sačinjeni iz jedne izoprenske jedinice. Ova jedinjenja rijetko ulaze u sastav etarskih ulja. Monoterpeni nastaju kondenzacijom dvije izoprenske jedinice (tačka ključanja $140 - 1800\text{ }^{\circ}C$), dok su seskviterpeni građeni na osnovu tri izoprenske jedinice (tačka ključanja je preko $2000\text{ }^{\circ}C$). Imajući u vidu građu ugljenikovog skeleta, obje navedene grupe terpena mogu biti aciklične, mono- i biciklične. Svi terpeni sintetišu se prema biosintetskom izoprenskom pravilu, prema kome svi terpeni u prirodi nastaju iz mavalonske kiseline preko mavalonskog puta iz nekoliko prostih acikličnih jedinjenja (20).

Fenilpropanski derivati

Fenilpropanski derivati pripadaju prirodnim jedinjenjima C_6-C_3 strukture i obuhvataju: aldehide, fenole i feniletere. U istu skupinu spadaju i kumarini (α -pironi). Posebna grupa fenilpropanskih struktura se sastoji od jedinjenja sa skraćenim ili eliminisanim bočnim lancem. Ovo uključuje fenilkarboksilne kiseline (C_6-C_1 -tijela) ili jednostavne fenole. Što se tiče količine, najvažniji derivat fenilpropana u prirodi je lignin, glavni sastojak drveta.

Strukture fenilpropana učestvuju u izgradnji različitih supstanci, na primjer: flavonoida, tanina i mnogih alkaloida (18, 20).

Ostala jedinjenja

Ostale komponente etarskog ulja uključuju jedinjenja ugljovodonika i njihove derivate sa kiseonikom. Ovdje spadaju i jedinjenja sa azotom i sumporom kao što su: sulfidi, derivati antranilne kiseline i acetilenski derivati (18, 20).

1.2.4 Terapijska upotreba i značaj etarskih ulja

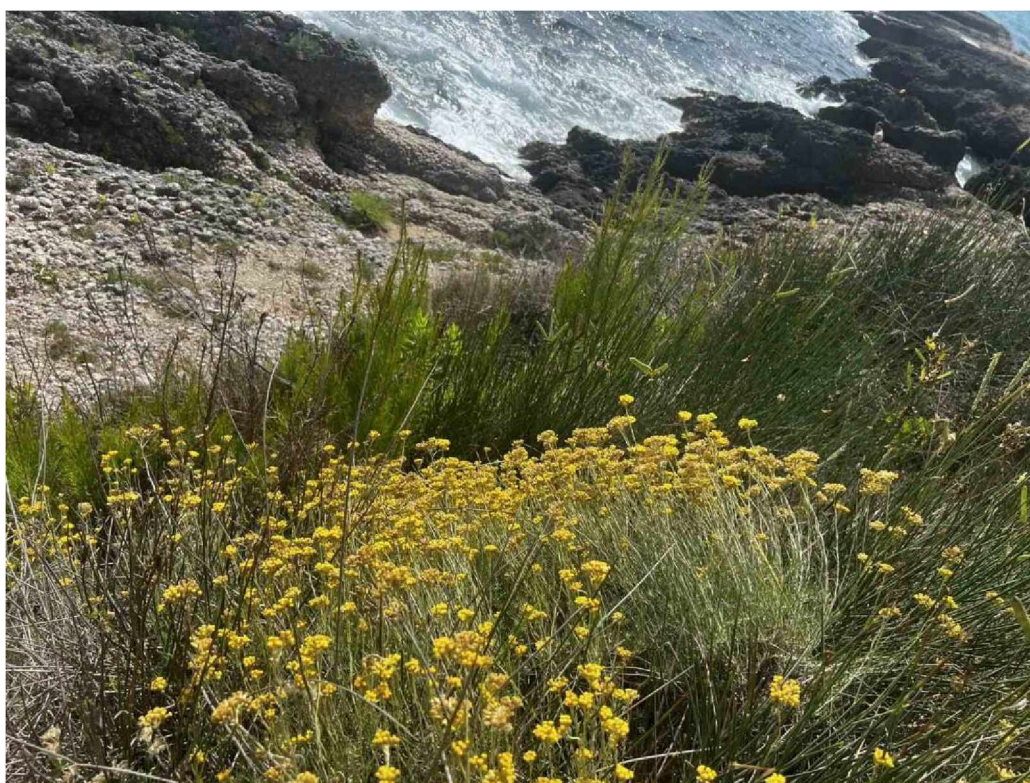
Aromatične biljke koje sadrže etarska ulja, korišćene su od davnina i upotrebljavaju se za razne namjene uključujući i medicinske tretmane, zatim kao konzervansi i začini. Etarska ulja su se primjenjivala u medicini još u starim civilizacijama Egipta i Kine, o čemu postoje pisani podaci (21). Hipokrat, koji se smatra ocem medicine, pisao je o upotrebi aromatičnih biljaka. Po prvi put je termin etarsko ulje upotrebljen u 16. vijeku u knjizi Paracelzusa van Hoanejma. U starom Egiptu etarska ulja su korišćena za prevenciju i u liječenju različitih oboljenja. Kasnije, Grci i Rimljani su naslijedili praksu korišćenja etarskih ulja u aromaterapiji i znatno proširili njihovu primjenu (22). Farmakoterapija, zasniva se na liječenju i prevenciji bolesti primjenom farmakološkog djelovanja etarskih ulja, uključujući ublažavanje bola, tretiranje rana i ožiljaka, kao i liječenje i prevenciju infektivnih i inflamatornih oboljenja (23). Industrijska eksploatacija etarskih ulja počela je u Francuskoj 1700. godine, a od 1800. god. do danas razvijeni su postupci i protokoli za produkciju velikog broja ulja. Prema literaturnim podacima, poznato je oko 3000 različitih vrsta etarskih ulja, dok oko 300 vrsta ima komercijalnu upotrebu. Upotreba etarskih ulja i njihovih komponenata se primjenjuje u izradi kozmetičkih proizvoda, u farmaciji, stomatologiji i medicini, zatim u poljoprivredi kao konzervansi, aditivi i kao prirodni medikamenti (16, 24).

1.2.5 Biološka aktivnost etarskih ulja

Efekti etarskih ulja temelje se na njihovom biološkom potencijalu. Istraživanja koja se intenzivno objavljuju pokazuju da etarska ulja posjeduju: antimikrobnu (25, 26, 27), antiinflamatornu (28), antioksidativnu (29, 30, 31), antiviralnu (32, 33), insekticidnu (34, 35), citotoksičnu (36, 37), antibiofilm (38, 39) aktivnost, kao i mnoge druge aktivnosti. Jedna od novih istraženih bioloških aktivnosti jeste i učinkovitost protiv starenja kože (engl. *Anti-aging*) i očuvanja struktura kože (40).

1.3. Etarsko ulje smilja

Helichrysum italicum (lat. *H. italicum*) je tipična mediteranska biljka koja se na našem jeziku naziva smilje. Pripada porodici Asteraceae. Osim Mediterana, može se naći i u Africi i Americi. Porijeklo njenog imena izvodi se iz grčkog izraza: *helios* (što znači „sunce“) i *hrios* (što znači „zlato“). Karakterišu je jarko žuto obojeni cvjetovi koji ne venu i dobro podnose visoke ljetnje temperature (40, 41) (Slika 4 i



Slika 4. Smilje sa ulcinjske obale



Slika 5. Cvijet smilja sa ulcinjske obale

Cvjeta u periodu od aprila do jula. Smilje (lat. *Helichrysum italicum*) raste na specifičnim sunčanim kamenjarima i padinama Crne Gore, u pukotinama između stijena, u napuštenim vinogradima i uz ivice puteva. Najviše se nalazi uz jadransku obalu, na otocima i u centralnim dijelovima Crne Gore. *Helichrysum italicum* se često naziva primorsko smilje. Biljka je dobro prilagođena sredinama bez vode, jer prirodno raste na alkalnom, suvom, pjeskovitom i siromašnom tlu. Stablo je uspravno i obraslo svilenkastim, gustim dlačicama, visine do 40 centimetara. Raste kao grm ili podgrm. Na vrhu stabla se nalaze žuti cvjetići koji se koriste za dobijanje ulja. Donji i srednji listovi su izduženi, linearni, sa tupim vrhom, dlakavi, zeleni na gornjoj strani i srebrnasti na donjoj strani. Gornja strana listova je rijetko žljezdana, dok je donja strana tomentozna i žljezdana. *Helichrysum italicum* se obično koristi za izolaciju etarskog ulja. Nizak sadržaj etarskog ulja u biljci (0,2 – 0,3%) doprinosi njenoj izuzetno visokoj cijeni (30 – 120 €/5 ml), pošto tona cvijetnih vrhova proizvodi samo oko 900 g do 1,5 kg etarskog ulja.

Hemijski sastav etarskog ulja obično se određuje gasnom hromatografijom u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC/MS). Ovo hemijsko ulje je bilo predmet opservacije nekoliko studija, koje su utvrdile prisustvo velikog stepena varijabilnosti u njegovom hemijskom sastavu, koji se pripisuje sljedećim parametrima: uticaju geografskog porijekla, spoljašnjim faktorima okoline, sezoni sakupljanja, fazi rasta, starosti biljke i genotipu (42).

Rod *Helichrysum* Miller obuhvata više od hiljadu vrsta, među kojima su najpoznatije i najistraženije sljedeće vrste: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (43), *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (44) i *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (45). *H. italicum* i *H. stoechas*, koje su rasprostranjene po cijelom Mediteranu (46), ali su posebno karakteristične za jadransku regiju

(47) i Pirinejsko poluostrvo, dok se *H. arenarium* uglavnom nalazi u srednjoj Evropi (48). Viegas i saradnici (46), predstavili su veoma složenu taksonomsku klasifikaciju *Helichrysum italicum*-a u šest podvrsta (subsp.), koje su raspoređene u žarištima biodiverziteta mediteranskih zemalja:

- (1) subsp. *italicum* (Korzika, Italija, Kipar, izolovani lokaliteti u Maroku),
- (2) subsp. *microphyllum* (Balearska ostrva, Sardinija, Korzika, Krit i Kipar),
- (3) subsp. *picardii* (Francuska, Italija, Portugalija i Španija),
- (4) subsp. *pseudolitoreum* (Argentina, Gargano i planina Konero (engl. *Mount Conero*)),
- (5) subsp. *serotinum* (Pirinejsko poluostrvo)
- (6) subsp. *siculum* (Sicilija) (46).

Smilje iz područja Crne Gore spada u vrstu *Helichrysum italicum*, podvrsta (subsp.) *italicum* (43).

1.3.1 Terapijska upotreba i biološka aktivnost etarskog ulja smilja

Smilje je biljna vrsta koja se godinama primjenjuje ne samo u jasno definisanim medicinskim okvirima, već je i u industriji hrane osvjedočena upotreba ovog bilja kao začina i konzervansa za hranu i pića. Istovremeno, etarsko ulje smilja se koristi i u kozmetičkoj industriji za izradu dermalnih i kozmetičkih preparata, budući da ispoljava definisane biološke aktivnosti. U ovom širokom spektru bioloških aktivnosti koje smilje posjeduje, sadržana su antimikrobna, antiinflamatorna i antioksidativna svojstva (49). Sa druge strane, njegova tradicionalna upotreba vezuje se za liječenje respiratornih, digestivnih i 16 inflamatornih stanja.

Zapaženo je da ulje smilja pozitivno utiče na inflamatorne procese kože. *H. italicum* je biljka koja je stekla popularnost u industriji njege kože, zbog svoje sposobnosti da regeneriše ćelije kože i poboljša njenu teksturu

(46). Često se koristi u proizvodima protiv starenja i može pomoći u smanjenju pojave finih linija i bora. Jedna od novih indikacija *H. italicum*-a odnosi se na njena citotoksična svojstva detektovana u zdravim i kancerogenim ćelijskim kulturama. Zaključuje se da je *H. italicum* svestrana biljka sa različitim upotrebama i potencijalnim zdravstvenim prednostima (49, 50).

1.3.2 Hemijski sastav etarskog ulja smilja (*H. Italicum*)

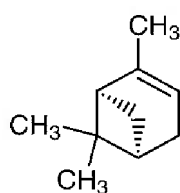
Etarsko ulje smilja najčešće se dobija metodom parne destilacije. Parna destilacija predstavlja destilaciju tokom koje se usitnjeni biljni materijal nalazi u kotlu na rešetki podignutoj od dna, a vodena para dolazi iz generatora pare smještenog izvan kotla i prolazi kroz biljnu masu. Pritom, generator pare je povezan sa sistemom cijevi sa aparatom za destilaciju. Para pomaže oslobađanje isparljivih jedinjenja prisutnih u biljkama, koji se zatim prenose u komoru za kondenzaciju gde se hlade i razdvajaju u etarska ulja i vodu. Etarska ulja, koja se ne miješaju sa vodom, izdižu se na površinu, omogućavajući im da se lako sakupljaju. Kondenzacija ulja je korak koji je od ključnog značaja, jer omogućava odvajanje ulja od vode, što rezultira čistim, koncentrisanim etarskim uljem (18).

Za fizičko-hemijsku karakterizaciju se najčešće koristi metoda pod nazivom gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS). Ova analitička metoda kombinuje karakteristike gasno-tečne hromatografije i masene spektrometrije u cilju identifikacije različitih supstanci u nekom uzorku (51). U tom pogledu, znatno je brža u odnosu na druge analitičke metode. To su zapravo dvije tehnike čijim se kombinovanjem formira jedinstvena metoda analize smješa hemikalija. Gasna hromatografija razdvaja komponente smješe na pojedinačne komponente, dok masena spektrometrija karakteriše svaku od komponenti pojedinačno, vršeći istovremeno njihovu identifikaciju. Kombinovanjem navedenih tehnika, može se i kvalitativno i kvantitativno procijeniti sadržaj etarskih ulja, koja sadrže veliki broj aktivnih supstanci (52). Gasna hromatografija / masena spektrometrija (GC / MS) razdvaja hemijske smješe (GC komponenta) i identifikuje komponente na molekularnom nivou (MS komponenta). Princip rada GC komponente zasniva se na razdvajanju smješe na pojedinačne supstance u momentima zagrijavanja.

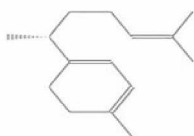
Zatim, uzorak se ubrizgava u GC ulaz gdje isparava i preplavljuje se u hromatografsku kolonu od strane nosača gasa (helijuma). Nosač gasa mora da bude hemijski inertan. Uzorak teče kroz kolonu i pritom dolazi do odvajanja jedinjenja koja sadrže supstance od interesa – na osnovu njihove relativne interakcije sa premazom kolone (stacionarna faza) i nosačem gasa (mobilna faza). Drugi dio kolone prolazi kroz zagrijanu liniju prenosa i završava na ulazu u jonski izvor, gdje se jedinjenja koja se izlučuju iz kolone pretvaraju u jone. Snop elektrona jonizira molekule uzorka, što rezultira formiranjem molekulskih jona, kao i manjih jona sa karakterističnim relativnim obiljem koji pružaju „otisak prsta“ za tu molekulsku strukturu. Najzad, analizator mase razdvaja jone i zatim ih detektuje (51,52).

Prema dosadašnjim fitohemijskim ispitivanjima, zabilježeno je prisustvo terpenskih jedinjenja kao što su: *α-pinene*, *neryl acetate*, *nerol*, *α-curcumene*, *ar-curcumene* i *geranyl acetate*. Ostala terpenska jedinjenja koja su pronađena u uzorcima su: *limonene*, *β-selinene*, *α-selinene*, *β-caryophyllene*, *α-copaene*, *italicene* i *bisabolene*. Njihova hemijska struktura je prikazana na Slici 6. Međutim, hemijski sastav varira u odnosu na geografsko porijeklo, vegetacioni ciklus, kao i u zavisnosti od činjenice da li je korišćen svjež ili sušen biljni materijal

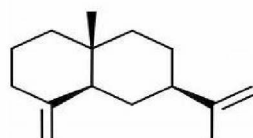
(53). Da bi se proizvelo etarsko ulje, smilje se bere kada je biljka u punom cvatu. Cvjetovi se režu iznad prvih listova u dužini od 15 do 20 cm (50).



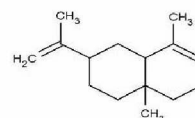
α-pinene



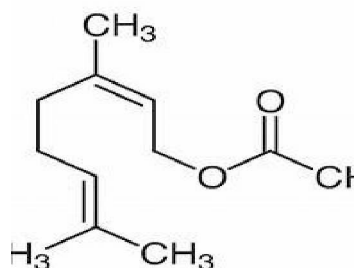
γ-curcumene



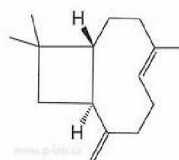
β-selinene



α-selinene



neryl acetate



β-caryophyllene

Slika 6. Prikaz glavnih hemijskih struktura komponenata u HIEO-u (preuzeto i prilagodjeno iz: Eslahi H., Fahimi N., Sardarian A. Chemical Composition of Essential Oils: Chemistry, Safety and Applications. Ess. Oils in Food Proc. 2017; 119–171. (10.1002/9781119149392.ch4) (20).

Izvjestan broj najkarakterističnijih bioaktivnih jedinjenja koji su tokom istraživanja otkriveni kod *H. italicum-a* – pokazala su da posjeduju antioksidativne, antiinflamatorne efekte kao alfa-pinen, neril-acetat sa antibakterijskim i antiviralnim karakteristikama. Takođe, utvrđeno je da neril-acetat jača funkciju kožne barijere povećanjem sadržaja lipida i ceramida u rožnom sloju, kao i povećanjem ekspresije enzima povezanih sa sintezom ceramida. Veći sadržaj *neryl acetate* ukazuje na sljedeće: visok kvalitet etarskog ulja smilja (54), zatim γ -*curcumene* sa antiinflamatornim efektima, β -*selinene* sa antibakterijskim, antiinflamatornim, antiproliferativnim i antifungalnim djelovanjem, α -*selinene* sa antioksidativnim, antiviralnim, antibakterijskim djelovanjem, α -*curcumene* sa antiinflamatornim i *anti-aging* djelovanjem, *bisabolene* sa neuroprotektivnim, antiviralnim i antibakterijskim djelovanjem, *italicene* sa antiinflamatornim i antioksidativnim djelovanjem, β -*caryophyllene* sa antioksidativnim, antiinflamatornim, antibakterijskim djelovanjem, α -*copaene* sa antioksidativnim, antiinflamatornim i antibakterijskim efektom (55, 56, 57, 58).

1.3.3 Antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja

Sposobnost etarskih ulja da inhibišu rast bakterija naziva se antimikrobna aktivnost. Zahvaljujući svojoj lipofilnosti, etarska ulja lako prolaze kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane mnogih bakterija i gljivica, čime se omogućava kontakt njihovih aktivnih komponenti sa intracelularnim strukturama. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja zavisi od sastava aktivnih komponenti, koncentracije i interakcije aktivnih hemijskih sastojaka, kao i od vrste mikroorganizma na koje djeluju. Jedinjenja kao što su monoterpeni alkoholi (geraniol, nerol i acetatni esteri) su odgovorni za antimikrobnu aktivnost etarskog ulja smilja. Etarsko ulje smilja ispoljava antimikrobnu aktivnost na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (54). Djihane i sarad. (50), su najprije izolovali etarsko ulje *Helichrysum italicum* iz Alžira sa preovlađujućim seskviterpenima: α -*cedrene* (13.61%), α -*curcumene* (11.41%) i *geranyl acetate* (10.05%), a zatim su testirali njegove antimikrobne i antifungalne aktivnosti. 19

Dokazano je ispoljava veći stepen antimikrobne aktivnosti na Gram pozitivne bakterije nego na Gram negativne, zbog različitosti koja se opaža u strukturi njihovog ćelijskog zida. Sagledavajući Gram pozitivne bakterije, uočava se da one sadrže ćelijski zid koji se sastoji od citoplazmatske membrane i sloja peptidoglikana, čime se objašnjava zašto one ne predstavljaju jaku barijeru za prolaz lipofilnih molekula. Sa druge strane, Gram negativne bakterije sadrže ćelijski zid koji je sagrađen od citoplazmatske membrane, sloja peptidoglikana i spoljašnje fosfolipidne membrane koju sačinjavaju lipopolisaharidi (54, 55).

Najveći broj ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja poznat je zahvaljujući eksperimentima *in vitro*. Najčešće metode koje se koriste u testiranju antimikrobne aktivnosti su: difuziona, diluciona (mikro i makro) i bioautografska metoda. Semikvantitativne metode određuju minimalnu inhibitornu koncentraciju, odnosno minimalnu koncentraciju koja *in vitro* inhibira rast željenog mikroorganizma (MIK). MIK je brojčana vrijednost koja se može tumačiti kao S (osjetljiv), R (otporan) ili I (srednje osjetljiv) (59).

MIK se najviše određuje za bakterije (uključujući i anaerobne i mikobakterije), ali se može primijeniti i za gljivice. Moguće je i određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK). Metoda razrjeđivanja bujonom predstavlja zlatni standard. Antimikrobno sredstvo se razrjeđuje bujonom ili agarom (serijsko, dvostruko razrjeđenje), a potom se inokulira u mikroorganizam. Nakon inkubacije koja traje od 18 do 24 sata, promatraju se promjene u bujonu ili agaru. Prva koncentracija antimikrobnog sredstva pri kojoj nije došlo do porasta mikroorganizma na agaru ili je bujon ostao bistar – predstavlja MIK. MIK se izražava u g/ml (60).

Antimikrobno djelovanje etarskog ulja *Helichrysum italicum-a* procijenjeno je *in vitro* pomoću testa mikrodilucionog bujona u odnosu na nekoliko laboratorijskih mikrobnih sojeva. Antimikrobna rezistencija je priznata od strane SZO-e kao jedan od deset vodećih zdravstvenih problema na globalnom nivou. Dramatični rast multirezistentnih patogena širom svijeta, favorizovao je testiranje antimikrobne aktivnosti biljnih preparata. Postoji veliki broj studija čiji se predmet istraživanja odnosi upravo na aktivnosti koje etarsko ulje smilja ispoljava kad je riječ o patogenim bakterijama (60, 61).

1.3.3.1 Opis mikroorganizama

Staphylococcus aureus

Stafilokoke su sferičnog ili jajolikog oblika, koje se grupišu u nepravilne, grozdaste nakupine. *Staphylococcus aureus* predstavlja značajan Gram-pozitivni patogen koji uzrokuje različite infektivne bolesti, od infekcija kože i mekih tkiva do bakterijemije, nekrotizirajuće pneumonije, endokarditisa i sindroma toksičnog šoka. Sa medicinskog aspekta, ova vrsta ima najveći klinički značaj, jer je riječ o patogenu koji izaziva oboljenja poznata pod zajedničkim nazivom – stafilokokoze. Prisustvo bakterije *S. aureus* na neoštećenoj koži kod većine ljudi nije povezano i ne izaziva oštećenja niti patologije, dok prodor mikroorganizma ispod kože ili u tijelo (npr. pluća) može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme. Od druge polovine XX vijeka, oko 80% svih *S. aureus* sojeva su postali otporni na penicilin (engl. *penicillin*) i ova stafilokoka se naziva meticilin-rezistentni *S. aureus* (engl. *Methicillin Resistant S. aureus* (MRSA)). MRSA je otkriven dvije godine nakon uvođenja metilina u terapijske protokole (63).

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis je uglavnom mikroorganizam koji je povezan sa kožom. Posjeduje karakterističan oblik kokusa, što znači da su njene ćelije okrugle ili ovalne. Kolonizuje aksile, glavu i nos. Upravo na ove načine, navedena bakterija može da uđe u ljudsko tijelo i da izazove infekcije. Trebalo bi imati u vidu da je *Staphylococcus epidermidis* bakterija koja se prirodno nalazi na koži, ali koja može uzrokovati bolest ukoliko je imunološki sistem oslabljen.

S. epidermidis je takođe, zajednički patogen koji se povezuje sa pojavom raznovrsnih infekcija nakon upotrebe perifernih ili centralnih intravenskih katetera ili proliferacijom nakon hirurških procedura (64).

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis je Gram pozitivan mikroorganizam, koji se klasifikuje u koke koje su mahom raspoređene u dugačke lance. Budući da je riječ o fakultativnom anaerobu, koji raste na temperaturi 0 – 44 °C, u stanju je da izazove razne bolničke infekcije. Glavni razlog zašto ovi mikroorganizmi preživljavaju u bolničkom okruženju jeste visok stepen otpornosti. *E. faecalis* je oportunistički patogen i može uzrokovati po život opasne infekcije (nozokomijalne, infekcije urinarnog trakta, endokarditis).

Patogenost ove vrste povezana je sa proteinom *Esp*, koji ima ulogu u adheziji i procesu formiranja biofilma. Izuzetno je otporna vrsta na tretman antibioticima, kao što su: cefalosporini, vankomicin i klindamicin. (65, 66).

Escherichia coli

Escherichia coli je Gram negativni bacil, štapićastog oblika, fakultativni anaerob. Dio je crijevnne flore, ali također, može biti uzrok crijevnih i ekstracrijevnih bolesti kod ljudi. *E. coli* je najčešći patogen koji dovodi do nekomplikovanog i komplikovanog cistitisa, ali izaziva i druge ekstraintestinalne bolesti, uključujući i upalu pluća, bakterijemiju i abdominalne infekcije. (67).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae je Gram negativna oportunistička bakterija. Ima oblik štapa. Prevažodno je riječ o patogenu koji može izazvati: infekcije urinarnog trakta, bakterijemije, upalu pluća i apscese jetre. *Klebsiella* se normalno nalazi kao dio normalne flore (u ljudskom nosu, ustima i gastrointestinalnom traktu). Ona se također, može ponašati i kao oportunistički ljudski patogen. Naime, neke vrste *Klebsiella* bakterije mogu da zaraze razne životinje. Stoga, *Klebsiella* bakterija se može naći u urinu, grlu, spermi, na koži, u oku, u nosu i drugim mjestima kod ljudi. *K. pneumoniae* se razvija u gastrointestinalnom traktu i nazofarinksu. Bakterije mogu ući u krvotok ili druga tkiva iz nazofarinksa i izazvati infekcije. Danas je *K. pneumoniae* glavni uzrok medicinskih infekcija u bolnicama. Multirezistentni sojevi *K. pneumoniae* postali su ozbiljan problem u liječenju infekcija izazvanih ovom bakterijom (68, 69).

Salmonella

Salmonela pripada vrsti Gram negativnih bakterija, rod *Bacillus*, u obliku štapića. Vrste salmonele su široko rasprostranjene u životnoj sredini, i javljaju se kod goveda, svinja, živine itd. Većina slučajeva salmoneloze su uzrokovane konzumiranjem kontaminiranih namirnica. Ozbiljnost infekcija salmonelom zavisi od specifičnog soja odgovornog za infekciju, kao i od zdravstvenog stanja organizma. Djeca mlađa od 5 godina, starije osobe i imunokompromitovane odrasle osobe predstavljaju specifičnu grupu koja je podložnija salmonelozi. Salmoneloza se često karakteriše stomačnim problemima (gastroenteritis). Ova bolest je praćena mučninom,

povraćanjem, grčevima u trbuhu i krvavom dijarejom. Takođe, povezana je sa glavoboljom, grozničavim stanjima i mialgijom (70).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa je Gram negativan, striktni aerob, asporogen bacil. Brzo se kreće pomoću monopolarno raspoređenih flagela. *P. aeruginosa* je izrazito otporna bakterija. Ima brojne faktore virulencije, uključujući toksine i enzime. Oportunistički je patogen i kod čovjeka može da izazove različita oboljenja. Infekcije mogu biti lokalizovane na različitim organima kao što su: koža, potkožno tkivo, kosti, uho, oko, mokraćni putevi, pluća i srčani zalisci. Većina infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa* pojavljuju se u hospitalizovanim pacijentima, koji su često imunokompromitovani. Infekcije od ove bakterije na koži variraju u zavisnosti od mjesta infekcije. Često se mogu javiti: eritematozne (crvene) lezije koje mogu postati hemoragične ili nekrotične, akne, osip, duboki apscesi, potkožni noduli, celulit, nekrotizirajući fasciitis, kao i crna ili ljubičasta promjena boje kože (71).

1.4. Antiinflamatorna aktivnost etarskog ulja smilja na koži

Zaštitna svojstva kože su najbolji dokumentovani terapijski efekti *H. italicum*-a, što je potvrđeno u nekoliko *in vivo* studija sprovedenih uz lokalnu primjenu etarskog ulja *H. italicum*-a

(46). Literaturni podaci ukazuju na upotrebu cvjetova *Helichrysum italicum*-a u obliku dekokta za tretiranje alopecije (72), kao i na inflamatorne procese kože za šta se koriste cvjetovi, lišće i etarsko ulje smilja (46). Upalni proces uključuje dokaze o oslobađanju prostaglandina, leukotriena, histamina, bradikininina, trombocitno-aktivirajućeg faktora (engl. *PAF*) i interleukina

(73). Prostaglandini i leukotrieni predstavljaju ključne supstance uključene u upalne procese. Acetofenoni i flavonoidi izolovani iz *Helichrysum italicum*-a testirani su *in vitro* u pogledu njihove sposobnosti da inhibiraju metabolizam arahidonske kisjeline i smanjenje produkcije leukotriena, čime ostvaruju antiinflamatorni efekat (46). Eksperimenti sprovedeni na zamorcima sa flavonoidnom frakcijom izolovanom iz sirovog etanolnog ekstrakta *H. italicum*-a, ukazali su na prisustvo fotoprotektivne aktivnosti ispoljene protiv eritema izazvanih UVB-zracima (74). Voinchet i Giraud-Robert ističu da može u značajnoj mjeri 23 pomoći regeneraciji kože nakon

kozmetičkih i rekonstruktivnih operacija, zatim djelovati na smanjenje upale, edema, modrica, kao i na veći stepen zarastanja rana (75). Zbog svojih antialergijskih svojstava, može biti od pomoći u liječenju astme, polenske groznice i ekcema (75). Etarsko ulje *Helichrysum italicum* poznato je po tome što sprečava starenje kože i upravo iz ovog razloga ima široko rasprostranjenu primjenu kad je riječ o formulacijama kremova i kozmetičkih preparata protiv starenja. *In vitro* aktivnosti protiv kolagenaze i elastaze etarskih ulja podržavaju upotrebu ove biljke u kozmetičkoj industriji (76). Etarsko ulje *Helichrysum italicum*, bogato *neril acetatom*, γ -*curcumenom* i α -*pinenom*, pokazalo je značajnu antiproliferativnu aktivnost ($p < 0.01$ u poređenju sa kontrolnom grupom) u kulturi ljudskih dermalnih fibroblasta (HDF3CGF). Takođe, navedeno ulje je inhibiralo proizvodnju kolagena I i III, koji su uključeni u remodelaciju tkiva, što ukazuje na postojanje ogromnog potencijala za liječenje rana (77).

Međutim, ove studije se zasnivaju uglavnom na podacima o tradicionalnoj upotrebi *H. italicum* i *in vitro* i *in vivo* studijama na životinjama. Istovremeno, postoji nedostatak studija baziranih na kliničkim ispitivanjima pomenutih efekata.

1.5. Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja

Kad je riječ o korišćenju smilja u liječenju inflamatornih procesa kože, potvrđeni pozitivni rezultati (77, 78, 79). Budući da je okarakterisana kao zaštitni organ, koža predstavlja prvu spoljašnju liniju odbrane od virusa, bakterija i gljivica. U koži, odnosno epidermisu, nalaze se imunološke ćelije, tzv. Langerhansove ćelije, koje učestvuju u imunskim reakcijama, te stoga koža predstavlja veoma važan imunski organ. Keratinociti su veoma aktivni u ovom procesu. Kod upalnih bolesti kože odvijaju se različiti patogeni mehanizmi, koji uključuju imunološke ćelije i strukturne ćelije tkiva (78). Upalni procesi na koži često uzrokuju stvaranje osipa. Obično je to odgovor imunološkog sistema. Neke od uobičajenih upalnih procesa kože uključuju: atopijski dermatitis, psorijazu, kao i infekcije kože uzrokovane različitim infektivnim agensima, endogene i egzogene ekceme. Pregledom rezultata istraživanja dolazimo do zaključka da topikalne formulacije sa uljem smilja mogu da smanje upalne reakcije i procese na koži nakon redovne i duže upotrebe (79). Literaturni podaci ukazuju na činjenicu da je koncentracija od 0,5 etarskog ulja u polučvrstim podlogama efikasna i bezbjedna. Studije sugerišu da je doza od 0,5%

pogodna za lokalnu primjenu, dok se povećanje doze ne preporučuje zbog mogućnosti iritacije kože (79, 80, 81, 82).

Nakon određivanja sadržaja u ulju smilja, od velike važnosti je prije svega izabrati i pogodnu podlogu za formulaciju novog proizvoda.

1.5.1 Karakteristike podloga

Inkorporiranjem ulja smilja u polučvrste podloge, masnu podlogu, krem i gel – pojačava se njegovo antiinflamatorno djelovanje na kožne probleme, i osnažuje protektivno djelovanje na oštećenu kožu (79). Imajući u vidu činjenicu da je podloga važan nosač aktivnih supstanci, trebalo bi napomenuti da ona istovremeno djeluje na oslobađanje, kao i na dermalnu isporuku aktivnih supstanci.

Masne podloge se koriste kod suvih dermatoza sa oštećenim lipidnim slojem. One su masne na dodir i nakon nanošenja ostavljaju zaštitni masni film na površini kože. Formulacije na bazi emulzija se često koriste za lokalnu isporuku aktivnih supstanci, jer mogu uspostaviti dobru interakciju sa lipidima i vodom u *stratum corneum*-u. Lako se primjenjuju i šire na koži ostavljajući lagan osjećaj. Gel formulacije se koriste kod masnih dermatoza praćenih svrabom. Lagano se nanose i brzo suše (83).

Podloga u preparatima za kožu nije samo pasivni nosač ljekovitih supstanci, već može imati značajan uticaj na oboljelu kožu. Osim toga što omogućava da se preparat ravnomjerno rasporedi i apsorbira, podloga može pružiti i dodatne terapijske koristi, kao što su emolijentni efekti ili zaštita kože. Zbog toga je važno definisati i poznavati i njena fizičko-hemijska svojstva. U lokalnoj terapiji akutnih dermatoza, uobičajeno se za ljekovitu supstancu biraju hidrofilne podloge (gelovi, hidrofilni kremovi), dok se kod hroničnih dermatoza preporučuju lipofilne podloge (kremovi, oleogelovi, hidrofobne (bezvodne) masti ili masti koje emulguju vodu (apsorpcione masti)). Na suve dermatoze nanose se okluzivni premazi (bezvodne masti i lipofilni kremovi), koji sprečavaju gubitak vlage, omekšavaju kožu i čine je elastičnijom. Kada je dermatoza praćena svrabom (pruritus), crvenilom i toplinom kože, kao podloge za ljekovitu supstancu predlažu se hidrogelovi ili hidrofilni kremovi (83).

1.5.2 Emolijentne podloge

Kod suvih dermatoza najčešće se javlja i manjak lipida na koži, kao rezultat narušenog lipidnog dijela epiderme. Značajnu ulogu kod ovih dermatoza igraju emolijentne podloge. Emolijentne podloge (emolijensi) se mogu definisati kao preparati koji sprečavaju isušivanje kože i imaju važan uticaj na vlaženje kože. Mogu se formulisati kao emulzije, kremovi, masti i kupke u koje se inkorporiraju hidrofilne i lipofilne supstance i preparati koji vlaže i omekšavaju kožu. Organizacija i čvrsto vezivanje lipidnih slojeva zavise od: količine ceramida, holesterola i slobodnih masnih kiselina, relativnog nivoa (odnosa) svih lipida, kao i vrste prisutnih ceramida

(83). Okluzivni agensi zadržavaju vlagu na koži, povećavajući njenu hidrataciju. Oni koji se nalaze iznad rožnatog sloja formiraju vještačku barijeru. Emolijensi popunjavaju prostor između ćelija suve kože, zaglađujući njenu površinu i povećavajući gipkost. Dodati humektansi u podlozi dodatno doprinose zadržavanju vlage u koži, povećavajući hidrataciju. Emolijensi bi trebalo da se biraju individualno, jer različiti faktori kao što su stepen suvoće kože, doba dana i godišnje doba, mogu značajno uticati na potrebu kože za hidratacijom i zaštitom. Djelovanje navedene podloge vrši se na dva osnovna načina, od kojih prvi način ukazuje na okluzivnost, odnosno stvaranje masnog sloja na površini kože, što postižu masne (okluzivne) supstance životinjskog, biljnog, mineralnog ili sintetskog porijekla. Okluzivne supstance imaju nekoliko mehanizama i učinka djelovanja. One zadržavaju vlagu time što smanjuju transdermalni gubitak vode (engl. *Transepidermal Water Loss*, TEWL), stvarajući na ovaj način zaštitu koja sprečava vlagu da ispari s površine kože. Formiranjem ovog filma na koži koji djeluje kao barijera, sprečava se gubitak vode iz kože, što doprinosi sveukupnom održavanju optimalne hidratacije. To je od pomoći u situacijama kada je koža suva ili oštećena. Podjednako djeluju i na obnovu kožne barijere, čineći kožu mekom, glatkom i hidratizovanom. Okluzivni film koje ove supstance razvijaju može da doprinese i zaglađivanju kože, smanjujući izgled suvoće i ljuskanja, istovremeno čineći kožu vizuelno mekšom. Okluzivne supstance su od naročite koristi za suhu i dehidriranu kožu, jer pomažu da se zatvori vlaga u epidermisu i spriječi dalje isušivanje. Nakon njihove aplikacije, koža postaje meka, elastična i sjajna. Najzastupljenije okluzivne supstance u preparatima su najčešće korišćeni dugolančani parafinski ugljovodonici – tečni parafini različite gustine, bijeli vazelin, čvrsti parafin i skvaleni (83, 84, 85).

Drugi mehanizam djelovanja emolijenasa je preko humektanasa, tj. hidrofilnih supstanci koje, absorbovane u koži, značajno povećavaju kapacitet zadržavanja vode. Hidrofilne supstance (humektanti) imaju sposobnost da privuku i vežu vodu za sebe, čime pomažu u održavanju hidratacije kože. Ove supstance privlače vlagu iz okoline ili iz dubljih slojeva kože i zadržavaju je na površini, čime se poboljšava vlažnost i mekoća kože. Preparati za kožu kao humektanse najčešće sadrže: polihidroksilne alkohole (glicerol, propilenglikol, sorbitol, manitol), makrogole, hijaluronsku kiselinu, ureu, i sl. Njihova uloga u hidrofilnim (vodenim) preparatima se vezuje za njihove karakteristike, hidrataciju i održavanje vlažnosti kože. Ove supstance su higroskopne, što znači da imaju sposobnost da privuku vodu iz okoline i zadrže je, čineći kožu hidratizovanom, Tabela 1. (83, 84, 85).

Tabela 1. Prikaz supstanci i njihovog djelovanja u emolijentnim podlogama (83, 84)

EMOLIJENTNO SVOJSTVO	EFEKAT	PRIMJERI
Okluzivna barijera	Stvara film na površini kože i smanjuje gubitak vode (engl. TEWL).	Vazelin, bijeli meki parafin, voskovi, steroli, mineralna ulja, itd.
Formulatori filma	Doprinosu stvaranju zaštitne barijere.	Dimetikon, polivinilpirolidon (PVP), akrilamid, polimeri, itd.
Humektanti	Privlače molekule vode iz dubljih slojeva kože, vezuju ih i održavaju u površinskom sloju.	Glicerol, natrijum hijaluronat, urea, glicerol, propilenglikol, sorbitol, manitol, tečni makrogoli, itd.
Fiziološki lipidi	Komponenta lipidnog matriksa rožnatog sloja.	Trigliceridi, ceramidi NP, AP, EOP, fitosfingozin, holesterol, skvalen, itd.
Emulgatori	Mogućnost stvaranja emulzija.	Polisorbati, cetil alkohol, cetostearil alkohol, cetomakrogol, cetareth-20 sodium lauroyl lactylate, itd.

1.5.2.1 Masti

Masti se sastoje od jednofazne podloge, u kojoj mogu da budu dispergovane čvrste supstance ili tečnosti. Izrada masti se definiše kao otapanje masnih sastojaka na vodenoj pari, uz povremeno miješanje (83).

Masti se dijele na:

1. Hidrofobne masti

Hidrofobne masti mogu da absorbuju malu količinu vode. Supstance koje se najčešće koriste za njihovu izradu su: čvrsti, tečni i laki tečni parafini, sintetski gliceridi, voskovi, biljna ulja, životinjske masti i tečni polialkilsiloksani (83).

2. Masti koje emulguju vodu

Masti koje emulguju vodu mogu da absorbuju malu količinu vode i nakon homogenizacije nastaju emulzije voda-u-ulju ili ulje-u-vodi, u zavisnosti od prirode emulgatora. Emulgatori koji daju voda-u-ulju emulzije su: lanolinski alkoholi, sorbitanski estri, monogliceridi i masni alkoholi. Emulgatori koji daju ulje-u-vodi emulzije su: sulfati masnih alkohola, polisorbati, makroglicerilstearyl etar ili estri masnih kiselina sa makrogolima (83).

3. Hidrofilne masti

Hidrofilne masti su podloge koje se miješaju sa vodom. Ove podloge se obično sastoje iz smjese tečnih i čvrstih makrogola (polietilenglikola). One mogu da sadrže određenu količinu vode (83).

1.5.2.2 Kremovi

Kremovi predstavljaju višefazne preparate koji se sastoje iz dvije faze: lipofilne (masne) i vodene faze (hidrofilne). Kremovi pripadaju emulzijama, koje u zavisnosti od emulgatora mogu biti emulzije ulje-u-vodi ili voda-u-ulju (83, 84). Navedeni preparati se sastoje iz lipofilne (masne) faze i hidrofilne (vodene) faze. Oni obavezno sadrže i emulgator ili neki sastojak masne ili vodene faze koji ima i ulogu emulgatora. Izrada kremova uobičajeno podrazumjeva metodu zagrijavanja i topljenja. Izvodi se tako što se sastojci masne faze zagrijevaju na temperaturama koje se kreću u rasponu 60 – 80 °C.

Vodena faza se zagrijeva na temperaturi koja je 2 – 5 °C viša od temperature zagrejane masne faze. Nakon toga, vodena faza se dodaje masnoj fazi, kontinuirano, uz neprekidno miješanje. Ovaj proces miješanja dvije faze se naziva proces emulgovanja. Na temperaturi hidrofilnog (U/V) krema od oko 40 °C vrši se nadoknada isparene vode (približno iste temperature). Da bi se utvrdila količina izgubljene vode, u toku izrade V/U kremova, potrebno je izraditi nekoliko serija ovih kremova i eksperimentalno utvrditi količinu vode koja ispari tokom zagrijavanja vodene faze (85).

Brzinu miješanja trebalo bi prilagoditi kako bi se obezbijedila dobra homogenost preparata i minimalno uklapanje vazduha. Naglo hlađenje u toku izrade kreme može da dovede do stvaranja zrnaste strukture, budući da dolazi do naglog očvršćavanja voskova i čvrstih masnih sastojaka koji ulaze u sastav masne faze. Uklopljeni vazduh u toku miješanja može da utiče na stabilnost i izgled krema (85).

Ljekovita supstanca se inkorporira u lifofilnoj ili hidrofilnoj fazi, u zavisnosti od toga u kojoj se fazi rastvara. Kada ljekovita supstanca nije rastvorljiva ni u jednoj fazi krema, trebalo bi da se suspenduje u finalnom izrađenom kremu, na sobnoj temperaturi (85, 86).

Termolabilne i isparljive supstance (etarska ulja, mirisi) dodaju se na temperaturi od oko 40 °C, kada podloga počne da očvršćava i dobro se izmiješaju.

1. Lipofilni kremovi

Lipofilni kremovi imaju lipofilnu fazu kao kontinuiranu (spoljašnju) fazu. Sadrže emulgatore voda-u-ulju. Neki primjeri tih emulgatora su: lanolinski alkoholi, estri sorbitana i monogliceridi (83, 84,).

2. Hidrofilni kremovi

Hidrofilni kremovi imaju vodenu fazu kao kontinuiranu (spoljašnju) fazu. Sadrže emulgatore ulje-u-vodi. Neki od primjera ovih emulgatora su sljedeći: natrijumovi ili trolaminski sapuni, sulfati masnih alkohola, polisorbati, polioksil estri masnih kiselina i masnih alkohola (83, 84, 85, 86).

1.5.2.3 Gelovi

Gelovi su homogeni, polučvrsti preparati koji se obično sastoje od rastvora ili disperzija jednog ili više ljekovitih supstanci u odgovarajućim hidrofilnim ili hidrofobnim bazama.

Gelovi se sastoje od tečnosti geliranih pogodnim gelirajućim sredstvima. Gelirajuće sredstvo obrazuje gelsku rešetku u koju se uklapaju molekuli tečnosti i tamo trajno ostaju. Ove supstance mogu biti mali molekuli sa niskom molekulskom masom ili polimeri (sintetički, polusintetički ili prirodni) (87, 88). Sredstva za geliranje trebalo bi da budu inertna, sigurna i ne-reaktivna sa ostalim sastojcima u formulaciji. Ove supstance, kada se dodaju u vodenu smjesu, povećavaju njenu viskoznost bez značajne modifikacije drugih svojstava. Nakon primjene na koži ostavljaju prijatan osjećaj hlađenja, lako se razmazuju, ostavljajući neprimjetan tanak film. Pogodni su za tretiranje velikih površina i kosmatih dijelova tijela. Postoje dvije kategorije gelova: oleogelovi i hidrogelovi. Oleogelovi (hidrofobni) predstavljaju preparate čije se podloge sastoje iz tečnog parafina ili masnih ulja. Kao sredstvo za geliranje kod oleogelova se najviše koriste: polietilen, koloid silicijum (IV) – oksid, aluminijumovi ili cinkovi sapuni. Hidrogelovi (hidrofilni) predstavljaju preparate čije se podloge sastoje iz vode, propilenglikola ili glicerola. Sredstvo za geliranje može biti: tragakanta, skrob, derivati celuloze, karbomeri i magnezijum-aluminijum-silikati. Pomoćne supstance kao što su antioksidanti, stabilizatori i konzervansi mogu se dodati u formulaciji gelova (89).

Koncentracija sredstava za geliranje je uglavnom manja od 10%, obično u rasponu od 0,5% do 2,0%, sa nekim izuzecima. Sredstvo za geliranje trebalo bi da proizvede optimalnu konzistenciju gela tokom čuvanja i skladištenja, koja dozvoljava lako isticanje gela iz tube ili ambalaže kada je izložena silama smicanja proizvedenih stiskanjem tube (90).

Tabela 2. Primjeri korišćenih polimera kao sredstva za geliranje (89, 90)

Vrste gelirajućih sredstava	Primjeri
Prirodni polimeri	Proteini, polisaharidi, tragakanta, karagenan, pektin, alginat, želatin.
Polusintetski polimeri	Derivati celuloze (metilceluloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropilceluloza, karboksimetilceluloza, hidroksipropil metil celuloza).
Sintetski polimeri	Karbomeri (<i>Carbopol</i> 934, <i>Carbopol</i> 940, <i>Carbopol</i> 941), poliakrilamid, poloksamer, polivinil alkohol, polietileni i njihovi polimeri.
Neorganske supstance	Bentonit, aluminijum hidroksid.
Surfaktanti	Cetostearil alkohol, natrijum laurilsulfat, sorbitan monooleat, dodecil piridinium jodid, lecitin.

Jedan karbomer se ne može zamijeniti drugim, bez prethodne probe upravo zbog razlike u viskozitetima izrađenih gelova. Gel karbomera koji je izrađen iz Carbopol-a 934, Carbopol-a 940, Carbopol-a 980 – može se primijeniti na koži, dok se gel karbomera iz Carbopol-a 974P može koristiti i oralno, kao i za primjenu na usnoj i vaginalnoj sluzokoži (91).

1.5.3 Zahtjevi koje podloge moraju da ispune

Zahtjevi koje bi podloga trebalo da ispunjava su brojni: fiziološka kompatibilnost, hemijska, fizička i mikrobiološka stabilnost, hemijska indiferentnost, mogućnost inkorporiranja vode i tečnih supstanci, kompatibilnost sa velikim brojem ljekovitih supstanci, brzo i lako oslobađanje ljekovite supstance sa ciljem postizanja optimalnog željenog terapijskog efekta, odgovarajuća reološka svojstva koja omogućavaju dobru razmazivost, kao i dobre senzorne karakteristike (85).

Neosporna je važnost farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja, budući da diktiraju kvalitet i stabilnost polučvrstih preparata. Obuhvataju niz testova koji se koriste kako bi se osigurao kvalitet, efikasnost, stabilnost i bezbjednost navedenih preparata. Farmaceutsko-tehnološka ispitivanja su ključna, kako bi se obezbijedio visok stepen sigurnosti i optimizacije samih proizvoda u smislu njihove lokalne primjene na koži (85).

Kod polučvrstih preparata za primjenu na koži, mogu se sprovesti sljedeća ispitivanja: organoleptička ispitivanja (izgled preparata), određivanje sadržaja ljekovite supstance, ispitivanje reoloških osobina, teksturna ispitivanja, mjerenje pH vrijednosti, mjerenje električne provodljivosti, senzorna ispitivanja, određivanje mikrobiološkog kvaliteta/čistoće, određivanje sadržaja konzervansa, određivanje sadržaja antioksidansa, ispitivanje mase punjenja ili volumena punjenja, kao i ispitivanje oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za primjenu na koži (85). Ispitivanje stabilnosti polučvrstih preparata za primjenu na koži bazira se na podacima u vezi sa ponašanjem i svojstvima ljekovite supstance i farmaceutskog oblika, ispoljenim pod uticajem različitih faktora iz okoline, kao što su: temperatura, vlaga i svjetlost. Stres (šok) testovi se označavaju kao testovi forsirane razgradnje. Oni pomažu u izboru najbolje formulacije određenog farmaceutskog oblika. Nakon 24-časovnih ciklusa na visokoj (40 °C ili 45 °C) i niskoj temperaturi (4 °C ili čak -10 °C), preparat bi trebalo da ostane stabilan i bez vidljivih znakova odvajanja faza. Hemijska stabilnost se određuje testovima ubrzanog starenja, izlaganjem dovoljnog broja uzoraka povišenoj i sniženoj temperaturi u klima komorama, nakon čega se vrši ispitivanje definisanih hemijskih parametara (92).

Mikrobiološka stabilnost polučvrstih preparata, ispituje se sa ciljem provjere mikrobiološke čistoće preparata, pošto bi mikroorganizmi prisutni u lijeku mogli da naškode pacijentu.

U cilju procjene mikrobiološke stabilnosti ovih preparata, vrši se ispitivanje Mikrobiološkog kvaliteta (*Ph. Eur.* 11 dio 5.1.4.) i efikasnosti konzervansa (92).

1.5.3.1 Organoleptička ispitivanja

Organoleptička ispitivanja se odnose na procjenu fizičkih karakteristika koja se mogu ispitati ljudskim čulima – vidom, mirisom, dodirrom, ukusom i sluhom. Neophodno je naglasiti njihov značaj, budući da često pomažu u procjeni prihvatljivosti preparata za korisnike.

Važnost farmaceutskih ispitivanja reflektuje se naročito kod polučvrstih preparata kao što su: masti, kremovi, gelovi i druge lokalne terapijske forme. Igraju ključnu ulogu u određivanju njihovih estetskih i funkcionalnih karakteristika, kao što su: izgled preparata, konzistencija, gustina, glatkoća, ljepljivost, razmazivost i boja. Kremovi, masti i gelovi moraju imati uniformnu boju, bez fleka ili promjena koje mogu ukazivati na problem sa stabilnošću (83, 84).

Gelovi i emulzije moraju biti bistri ili blago opalescentni, bez neprihvatljivih замуćenja. U ova ispitivanja spada i miris. Preparati za kožu, kao što su kremovi i gelovi, moraju imati prijatan miris ili biti bez mirisa, u zavisnosti od namjene (85).

1.5.3.2 Električna provodljivost

Električna provodljivost polučvrstih preparata je važan parametar koji ocjenjuje kvalitet i stabilnost preparata. Ovaj parametar može dati informaciju o promjenama u preparatu tokom vremena čuvanja. Korišćenjem odgovarajuće opreme i metodologije, električna provodljivost može biti koristan metod za procjenu kvaliteta i optimizacije farmaceutskih proizvoda. Mjerenje električne provodljivosti je vrsta ispitivanja koja se sprovodi radi određivanja i praćenja eventualnih promjena u toku perioda ispitivanja i čuvanja formulacija (85, 92).

1.5.3.3 Ispitivanje pH vrijednosti

Ključnu ulogu u stabilnosti, efikasnosti i sigurnosti prilikom upotrebe masti, kremova i gelova igra upravo njihova pH vrijednost zbog povezanosti sa pH vrijednostima kože koje se kreću od 4.5 do 5.5. Ako je pH vrijednost preparata značajno veća ili niža od toga, može izazvati iritaciju, suvoću, crvenilo ili druge neželjene efekte na koži. Stabilnost polučvrstih preparata se ocjenjuje i stabilnom vrijednošću pH vrijednosti tokom čuvanja preparata (85).

1.5.3.4 Ispitivanje fizičke stabilnosti testom centrifugiranja

Ispitivanje fizičke stabilnosti testom centrifugiranja polučvrstih preparata, predstavlja ključnu metodu za procjenu ponašanja preparata pod uticajem sila koje mogu nastati kao posljedica spoljašnjih faktora, kao što su: transport, čuvanje ili upotreba. Ovim testom se procjenjuje da li dolazi do separacije faza, degradacije ili drugih fizičkih promjena usljed mehaničkih stresova.

Centrifugiranje se koristi kao model za simulaciju uslova „ubrzanog starenja“, čime se proizvod izlaže potencijalnim stanjima poput stresnih promjena temperature. Ovo je važno jer, tokom transporta ili promjene temperature, proizvodi mogu biti izloženi sličnim uslovima, koji mogu uticati na njihovu homogenost i stabilnost (85, 92)

1.5.3.5 Teksturna analiza

Teksturna profilna analiza (TPA) je vrsta ispitivanja koje se koristi za kvantifikaciju i detaljno proučavanje teksturalnih karakteristika polučvrstih preparata, poput masti, kremova, gelova i emulzija. Ova metoda predstavlja alternativu reološkim ispitivanjima, budući da ilustruju slične karakteristike polučvrstih preparata. Omogućava precizno mjerenje različitih mehaničkih svojstava proizvoda koja utiču na njegovu upotrebljivost, stabilnost i korisničko iskustvo. Profil teksturne analize (TPA) je najrasprostranjeniji metod analize teksture polučvrstih preparata, a njegov cilj korišćenja odnosi se na predstavljanje odnosa mehaničkih karakteristika uzoraka i njihovih senzornih karakteristika (93). Korišćenjem TPA-e, mogu se razviti formulacije sa optimalnim teksturalnim karakteristikama koje odgovaraju potrebama korisnika,

obezbjedujući istovremeno kvalitet, stabilnost i efikasnost. Tokom formulisanja i razvoja preparata, trebalo bi uzeti u obzir njihovu teksturalnu karakterizaciju kao važan aspekt koji je u velikoj mjeri odgovoran za stepen prihvatljivosti preparata od strane samih korisnika. Ova metoda predstavlja objektivno procjenjivanje na osnovu kojeg se mogu izračunati vrijednosti teksturnih parametara, kao što su: čvrstina, kohezivnost, otpornost, elastičnost i adhezivnost (94).

Čvrstoća je parametar koji se koristi u cilju procjenjivanja koliko je proizvod čvrst prije nego što počne da se topi ili mijenja svoj oblik. Za kreme i masti, ovo je važan faktor, jer upravo ovaj parametar određuje koliko se lako ili teško proizvod nanosi na kožu, uzimajući u obzir činjenicu da čvrstoća opisuje silu koja je potrebna da se proizvod rastrlja između prstiju (95).

Adhezivnost je pokazatelj ljepljivosti proizvoda na površini. Jedan je od važnih parametara u teksturnoj analizi masti i kremova, koji se odnosi na sposobnost proizvoda da se

„prilijepi“ ili da ostane na površini, u ovom slučaju na koži, tokom ili nakon nanošenja. Adhezivnost je posebno relevantna za proizvode koji treba da ostanu na koži tokom dužeg vremenskog perioda, kao što su: hidratantne kreme, lijekovite masti ili kozmetički proizvodi. Ona utiče na dugotrajnost efekta proizvoda, njegovu efikasnost i upotrebljivost (95, 96).

Otpornost u teksturnoj analizi je vitalni parametar koji opisuje koliko dobro proizvod (kao što je krem, gel ili mast) može da se vrati u prvobitno stanje nakon deformacije. Ova osobina je ključna za razumijevanje ponašanja proizvoda tokom primjene i tokom vremena (94, 95, 96).

Kohezivnost u kontekstu teksturnih karakteristika definiše sposobnost proizvoda da održi svoju unutrašnju strukturu i koheziju, snagu unutrašnjih veza, što znači da ne može doći do raspadanja tokom aplikacije. Takođe, odgovoran je za sveukupan utisak i eleganciju samih preparata (94, 95).

Elastičnost masti ili krema mjeri u kom stepenu se proizvod vraća u svoj originalni oblik nakon što je nanesen na površinu. Visoka elastičnost često ukazuje na činjenicu da će proizvod ostati na koži i pružiti dugotrajan efekat. Otpornost i elastičnost imaju svojevrstne sličnosti, ali ovdje nije riječ o istim parametrima. Elastičnost se odnosi na fleksibilnost ili stepen povratka u prvobitni oblik. Otpornost se odnosi na čvrstoću ili stabilnost materijala pod spoljnim pritiskom (93, 95, 96).

1.5.3.6 Senzorna ispitivanja

Ova vrsta analize predstavlja kvantitativnu deskriptivnu analizu kozmetičkih proizvoda, mjerenje i ocjenjivanje senzorskih osobina u cilju postizanja određenih standarda kvaliteta. Često se primjenjuje metoda izbora da bi se dobio kompletan senzorni profil, posebno kada se radi o sličnim proizvodima. Navedena metoda predstavlja subjektivno ocjenjivanje preparata, dok se instrumentalna mjerenja svrstavaju pod objektivne. Kombinacija ove dvije vrste analize prilično je dugotrajna i zahtjevana, ali pruža najbolji uvid u kompletnu sliku kozmetičkih preparata i njihovu prihvatljivost od strane korisnika. Ova vrsta ispitivanja predstavlja subjektivno ispitivanje kojim se ocjenjuje prihvatljivost preparata od strane korisnika. Ovim testom se prikupljaju podaci o tome na koji način krajnji korisnici percipiraju preparate, kao i da li su zadovoljni njihovim osnovnim i funkcionalnim karakteristikama. Testira se kako preparat izgleda, kao i osećaj koji ostavlja na koži, prije utrljavanja, tokom utrljavanja i nakon nanošenja (npr. da li je mast previše masna, da li se brzo upija, i sl.). Procjenjuje se kako se proizvod ponaša tokom nanošenja, da li ostavlja masni film ili matira kožu. Mogu se koristiti upitnici koje popunjavaju korisnici koji testiraju kremu ili mast na različitim djelovima tijela. Panelisti ocjenjuju različite senzorne karakteristike preparata prema unaprijed definisanim kriterijumima. Pitanja obuhvataju sve prezentovane aspekte, od teksture do zadovoljstva korisnika samim preparatom (97).

1.5.3.7 Ispitivanja mikrobiološkog kvaliteta formulacija

Cilj ovog testa odnosi se na utvrđivanje toga da li je proizvod kontaminiran mikroorganizmima nakon izrade i čuvanja. Ispituje se prisutnost različitih vrsta mikroorganizama u određenim vremenskim intervalima, kako bi se procijenila mikrobiološka stabilnost proizvoda. Mikrobiološki kvalitet/čistoća polučvrstih preparata za kožu trebalo bi da odgovara propisu *Ph. Eur.* 11.0 (5.14), za kategoriju 2, kao i da zadovolji sljedeće zahtjeve:

- što se tiče ukupnog broja aerobnih živih mikroorganizama, nije dozvoljeno da bude više od 100 živih aerobnih bakterija i gljivica po gramu ili mililitru preparata,
- ne više od 10 enterobakterija i nekih drugih gram negativnih bakterija po gramu ili mililitru
- odsustvo *Pseudomonas aeruginosa*-a i *Staphylococcus aureus*-a (92).

1.6. Ispitivanje *in vivo* antiinflamatornog efekta polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja

1.6.1 SCORAD test

Za procenjivanje uspešnosti liječenja atopijskog dermatitisa najčešće se koriste dva indeksa: SCORAD (engl. *SCORing Atopic Dermatitis*) index (najšire zastupljen i najšire prihvaćen) i TIS index (engl. *Three Item Severity*), koji ispituje tri parametra iz SCORAD indeksa: eritem, edem i ekzorijacije).

U Evropi, Evropska radna grupa za atopijski dermatitis (eng. *European Task Force on Atopic Dermatitis*) je razvila i procijenila kompleksan indeks koji mjeri ozbiljnost simptoma AD-a, zasnovan na širokom konsenzusu dermatologa. Ovaj indeks je prvi put opisan 1993. godine. Razvijen je kako bi se procijenila ozbiljnost bolesti i poboljšalo upravljanje AD-om. SCORAD indeks, koji je potvrđen u kliničkim studijama, pokazao se korisnim u procjeni ozbiljnosti AD-a u određenim vremenskim periodima. Ovaj alat se često koristi prije i poslije liječenja u cilju utvrđivanja stepena efikasnosti obavljenog tretmana. (98).

Rezultat SCORAD indeksa sastoji se od informacija u vezi sa opsegom, intenzitetom i subjektivnim simptomima. SCORAD indeks je korišćen tokom nekoliko imunoloških i kliničkih ispitivanja (99).

Ovo je najviše validirani sistem bodovanja (engl. *scoring*) za atopijski dermatitis. U velikom broju radova je izvršena evaluacija uspešnosti liječenja ovim indeksom. Evropska radna grupa za atopijski dermatitis je zaključila da SCORAD test pokazuje adekvatnu validnost, odzivnost i unutrašnju konzistentnost. Dio intenziteta SCORAD-a se sastoji od 6 stavki: eritem, edem/papulacija, ekzorijacije, lihenifikacija, kruste i suvoća. Svaka stavka se može ocijeniti na skali od 0 do 3. Pored toga, SCORAD indeks sadrži i 2 subjektivna kriterijuma: nesanica (eng. *Sleep disturbances*) i svakodevni svrab (eng. *Itching*). Stepem se može ocijeniti od 0 do 100. Formula SCORAD indeksa je: $A / 5 + 7B / 2 + C$. U ovoj formuli, A je definisano kao stepen kožnih lezija (0 – 100), B je definisano kao intenzitet (0 – 18), dok je C definisano kao subjektivni simptom (0 – 20). Maksimalni rezultat SCORAD indeksa je 103 (100).

Komponenta A mjeri stepen kožnih lezija koristeći pravilo devetki. Komponenta B procjenjuje intenzitet bolesti na osnovu 6 specifičnih simptoma (eritem, edem/papulacija, curenje/kore, ekzorijacija, lihenifikacija, suvoća). Posljednji dio, komponenta C, fokusira se na subjektivno iskustvo pacijenta sa svrabom i gubitkom sna (88).

Objektivni SCORAD se sastoji od stavki obima i intenziteta; njegova formula je: $A / 5 + 7B / 2$. Maksimalni objektivni SCORAD skor je 83 (sa 10 dodatnih poena za teške deformišuće ekceme lica i šaka). Takođe, od važnosti je i subjektivni osjećaj, iz čega proizilazi da bi pacijenti trebalo da i sami izvrše procjenu dermatitisa na svojoj koži, jer je njihovo blagostanje najvažniji aspekt liječenja AD-a. Za procjenu težine atopijskog dermatitisa koriste se dvije verzije standardizovanog SCORAD indeksa: klinički SCORAD i PO-SCORAD (engl. *Patient-Oriented SCORAD*). Klinički SCORAD primjenjuje ljekar (dermatolog), na osnovu objektivne procjene površine kože zahvaćene lezijama, intenziteta kliničkih znakova (eritem, edem, kruste, lihenifikacija i dr.) i subjektivnih simptoma pacijenta, poput svraba i poremećaja sna. Nasuprot tome, PO-SCORAD je samoprocjenski alat koji omogućava pacijentima da sami ocijene težinu i rasprostranjenost promjena, čime se olakšava praćenje bolesti između kliničkih pregleda. PO-SCORAD koji je usmjeren na pacijente dobro korelira sa SCORAD indeksom. (100, 101).

1.6.1.1 Kako izračunati vrijednosti SCORAD-a

U cilju dobijanja vrijednosti SCORAD-a za jednog pacijenta, trebalo bi proći kroz dermatološki pregled i zajedno sa njim procijeniti nivo i intenzitet bolesti. Od najvećeg značaja je da se izvrši detaljna procjena sve tri komponente koje ulaze u sastav formule za izračunavanje individualnih vrijednosti ($A / 5 + 7B / 2 + C$) (102).

A – Zahvaćeno područje – gdje se procenti dodjeljuju djelovima tijela, da bi se opisala ozbiljnost atopijskog dermatitisa, do 100%. Određivanje toga koliki je stepen zahvaćenosti površine tijela ili obim širenja, jeste prvi korak u uspostavljanju ozbiljnosti rezultata. Da bi se to postiglo, kliničari koriste pravilo devetki, gdje se ispituje pet glavnih površina tijela. Ideja je da se tijelo pacijenta podijeli u regije koje približno čine 9% ukupne površine kože, što omogućava jednostavno kvantitativno određivanje oboljelog područja. (102, 103).

Detaljno procjenjivanje je prikazano na Tabeli 3.

Tabela 3. Prikaz obima širenja i stepena zahvaćenosti tijela AD-om (104, 105)

REGIJA TIJELA	DIO TIJELA	PRAVILO 9	ZAHVAĆENOST (%)
Glava i vrat	Ispred	4,5%	0 – 4,5 %
	Iza	4,5%	0 – 4,5 %
Gornji ekstremiteti	Lijeva ruka (ispred)	4,5%	0 – 4,5 %
	Lijeva ruka (iza)	4,5%	0 – 4,5 %
	Desna ruka (ispred)	4,5%	0 – 4,5 %
	Desna ruka (iza)	4,5%	0 – 4,5 %
Trup	Grudi	9 %	0 – 9%
	Abdomen	9 %	0 – 9%
	Leđa (ispred)	9 %	0 – 9%
	Leđa (iza)	9 %	0 – 9%
Donji ekstremiteti	Lijeva noga (ispred)	9 %	0 – 9%
	Lijeva noga (iza)	9 %	0 – 9%
	Desna noga (ispred)	9 %	0 – 9%
	Desna noga (iza)	9 %	0 – 9%
Genitalije		1%	0 – 1%
Komponenta A			0 – 100%

B – Intenzitet – gdje se stepen ozbiljnosti od 6 kliničkih znakova procjenjuje na skalama od 0 (bez aktivnosti bolesti) do 3, ukupno do 18. Detaljno se prikazuje na Tabeli 4. Suvoća kože se procjenjuje na mjestima gdje nije zahvaćena upalom (102, 103).

Tabela 4. Prikaz simptoma i intenziteta AD-a (102, 103)

ZNAKOVI / SIMPTOMI	INTENZITET / SKALA
Eritem	0 – 3
Edem/papulacija	0 – 3
Ekskorijacije	0 – 3
Lihenifikacija	0 – 3
Kruste	0 – 3
Suvoća	0 – 3
Komponenta B	0 – 18

C – Subjektivni simptomi – gdje se ozbiljnost pruritusa i nesanice ocjenjuje od 0 do 10, ukupno do 20. Pacijent procjenjuje simptome na skali od 0 do 10 za svaki simptom (svrab i problemi sa nesanicom) (102, 103), Tabela 5.

Tabela 5. Prikazuje subjektivne nelagodnosti AD-a (102, 103)

ZNAKOVI / SIMPTOMI	INTENZITET / SKALA
Pruritus (svrab)	0 – 10
Nesanica	0 – 10
Komponenta C	0 – 20

Izračunavanje SCORAD-a preko formule: $A / 5 + 7B / 2 + C$; za maksimalne rezultate 103. Ozbiljnost bolesti je generalno podijeljena u 3 grupe.

Referentne vrijednosti SCORAD indeksa su:

Objektivni SCORAD indeks:

blag >15, umjeren 15 – 40, težak > 40.

Kada računamo i subjektivni osjećaj onda su referentne vrijednosti sljedeće:

blag >25, umjeren 25 – 50, težak > 50.

Evropska radna grupa za atopijski dermatitis je zaključila da SCORAD test pokazuje adekvatnu validnost, odzivnost i konzistentnost (104, 105).

1.6.1.2 Kako se SCORAD test koristi

Izračunavanje individualnih vrijednosti SCORAD testa za svakog pacijenta, vrši se tako što se nastoji da se problem detaljno razmotri, a potom da se izračuna zahvaćenost svake regije. Prvi korak je analiza zahvaćenosti površine, drugi korak je ocjenjivanje intenziteta, dok se treći korak odnosi na ocjenjivanje subjektivnog osjećaja.

1. Analiza zahvaćenosti površine:

Tokom kliničkog pregleda od strane dermatologa, potrebno je da se nacрта uključena površina koja se procjenjuje. Zatim se izračuna udio uključene površine – segment po segment (Slika 7). Zatim se sabiraju ukupni rezultati za sve segmente.



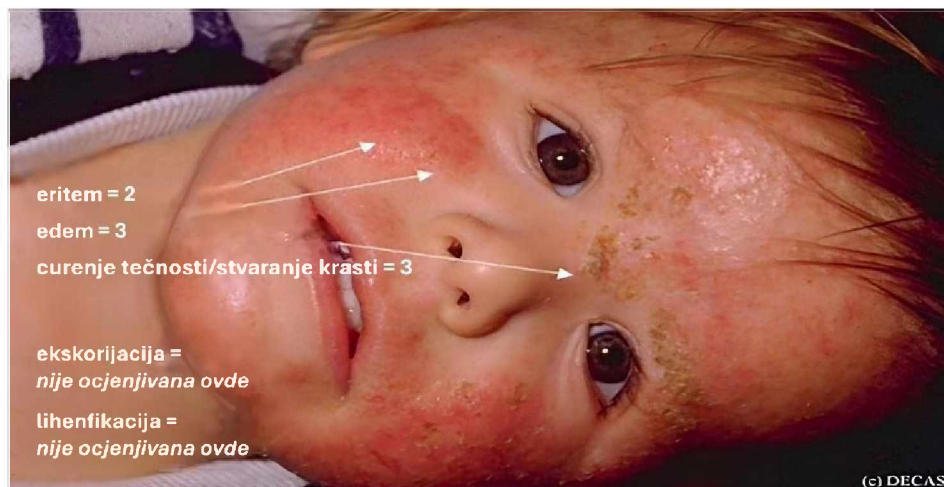
Slika 7. Na ovom primjeru, 3/4 desnog donjeg ekstremiteta odgovara rezultatu od oko 7/9 (preuzeto i prilagođeno iz: https://adserver.sante.univnantes.fr/Scorad_Course/Example.html) (106)

2. Ocjenjivanje intenziteta:

Nakon definisanja zahvaćenog područja, procjenjuje se njegov intenzitet. Kod pacijenata sa lokalizovanim lezijama, analiza će se odnositi na područje koje je bio razlog za posjetu dermatologu. Kod pacijenata sa područjima koja se razlikuju po težini, bira se reprezentativna oblast srednje uključenosti.

Neophodno je prepoznati svaku leziju. Identifikacija svake pojedinačne lezije jeste prvi korak, nakon čega slijedi procjena intenziteta na skali od 0 do 3.

Ukupan broj kriterijuma intenziteta kreće se maksimalno do 18 (Slika 8).



Slika 8. Na ovom primjeru je predstavljena identifikacija i prepoznavanje lezija (preuzeto i prilagođeno iz: https://adserver.sante.univ-nantes.fr/Scorad_Course/Example.html) (106)

3. Subjektivni simptomi:

Dvije najreprezentativnije stavke koje se tiču kvaliteta života pacijenata (tokom 3 prethodna dana od dana pregleda) su: svrab i nesanica.

Pacijent i/ili jedan od njegovih rođaka izražava intenzitet svraba ili nesanice koristeći vizuelnu analognu skalu ocijenjenu između 0 i 10.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja kod upalnih procesa kože (atopijski dermatitis).

Posebni ciljevi ovog istraživanja su:

- Ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja smilja sa ulcinjske obale Jadranskog mora, njegova fizička, hemijska i biološka svojstva.
- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja smilja sa ulcinjske obale.
- Definisanje farmaceutsko-tehnološkog postupka izrade polučvrstih preparata, formulisanje polučvrstih preparata kao što su: mast, krem i gel sa aktivnim sastojkom – etarskim uljem smilja.
- Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja.
- Procjena podnošljivosti preparata sa etarskim uljem smilja i farmakološkog dejstva (antiinflamatornog efekta) na upalne procese kože (atopijski dermatitis).

Uzimajući u obzir prethodne navode iz aktuelne literature, kao i navedene ciljeve istraživanja, postavljene su sljedeće hipoteze:

- Postoje bioaktivne supstance sa antiinflamatornim djelovanjem u etarskom ulju smilja.
- Polučvrsti preparati sa dodatkom etarskog ulja smilja su kvalitetni preparati za primjenu na koži.
- Postoji farmakološki efekat farmaceutskih topikalnih preparata sa dodatkom ulja smilja kod inflamatornih procesa kože.
- Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja se dobro podnose u toku topikalne primjene na koži.
- Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja ispoljavaju antiinflamatorni efekat kod upalnih procesa kože, atopijskog dermatitisa.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Materijali i metode

Tokom ovog istraživanja analizirali smo i koristili ulje smilja sa područja crnogorske obale i definisali njegov sadržaj bioaktivnih supstanci. Koristili smo ulje smilja sa područja Ulcinja, definisali njegovu hemijsku karakterizaciju, izradili polučvrste preparate sa etarskim uljem smilja, ispitivali njihove farmaceutsko-tehnološke karakteristike i procijenili antiinflamatorno djelovanje ovih polučvrstih preparata na inflamatorne procese kože kod ispitanika.

Nakon farmaceutskih ispitivanja polučvrstih formulacija, pratili smo njihove kliničke efekte kod 100 ispitanika sa inflamatornim procesima na koži. Neki od kliničkih aspekata koje smo pratili obuhvataju: smanjenje svraba, suvoću, iritacije, kao i dužinu trajanja simptoma.

3.1 I faza eksperimentalnog rada

3.1.1 Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika ulja smilja

Fizičko-hemijske karakteristike etarskog ulja smilja uzete su u razmatranje u prvoj fazi istraživanja.

U toku našeg istraživanja, koristili smo etarsko ulje dobijeno parnom destilacijom iz populacije *Helichrysum italicum* na lokalitetu kod Ulcinja.

3.1.1.1 Priprema biljnog materijala

Cvijeće smilja je sakupljano ručno iz istog regiona, a njihova žetva je obavljena u faze cvjetanja, u junu mjesecu 2020. godine u četiri različita lokaliteta u obalnom području Ulcinja.

Identifikacija biljnog materijala je izvršena od strane agronoma. Sušenje biljnog materijala je trajalo 15 dana na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, biljni materijal je isječen na komade od 1 do 3 cm, homogenizovan i čuvan van svjetlosti do ekstrakcije.

3.1.1.2 Parna destilacija

Proces parne destilacije cvjetova smilja odvijao se u lokalnoj destileriji u Ulcinju, tokom kojeg su biljke obrađene u kontrolisanim uslovima kako bi se sačuvala maksimalna količina etarskog ulja i očuvala njegova biološka aktivnost. Kontrolni parametri tokom ovog procesa su bili temperatura i pritisak. Temperatura tokom ovog procesa je bila 104 °C, dok je pritisak iznosio 0,4 bara. Osušeni biljni materijal (150 ± 35 g) je bio pažljivo raspoređen u metalnom ulošku sa perforiranim dnom i postavljen u rezervoar od nerđajućeg čelika. Vodena para je tokom prolaska kroz biljni materijal, iz njega izvlačila isparljive komponente, koje su dalje s vodenom parom stvarale smješu. Smješa vodene pare i isparljivih komponenata iz biljne mase je prolazila kroz cijevi koje su hladile i kondenzirale se. Kako su etarska ulja nerastvorljiva u vodi, hlađenjem i kondenzacijom smješa, tada je došlo do međusobnog odvajanja pare, vode i ulja. Najveće količine etarskog ulja nastale su na početku procesa destilacije, koja se sastojala od isparljivih jedinjenja, a daljom destilacijom nastale su manje količine ulja koje su imale karakterističan miris i sadržale ljekovita jedinjenja, zbog čega se ulja i koriste.

Destilacija je trajala 2,5 h. Etarsko ulje je sakupljeno u n-pentanu, koji je takođe, bio osušen bezvodnim natrijum sulfatom i čuvan u mraku na 4 °C do upotrebe. Proces se odvijao u aparatu za parnu destilaciju Certus (*Certuss*, Njemačka).



Slika 9. *Certuss* aparat koji je korišćen za parnu destilaciju etarskog ulja smilja

3.1.1.3 Ispitivanje organoleptičkih karakteristika

Organoleptički izgled etarskog ulja (miris, boja i homogenost uzorka) pratili smo vizuelnim pregledom ulja.

Za ispitivanje smo koristili identične epruvete od bezbojnog, prozirnog ili neutralnog stakla. Osim toga, boje su uređene posmatranjem pri difuznoj dnevnoj svjetlosti, horizontalno prema bijeloj pozadini.

3.1.2 Ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja smilja

Hemijsko ispitivanje etarskog ulja smilja sprovedeno je u Centru za ekologiju i tehnologiju (skr. CETI), Crna Gora. Za analizu hemijskih karakteristika i sastojaka etarskog ulja smilja (*Helichrysum italicum*) iz Crne Gore, korišćena je kombinovana metoda gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS).

Karakterizaciju hemijskog sastava etarskog ulja smilja vršili smo na gasnom hromatografu *Shimadzu* QP2020 (Slika 10) sa SSL injektorom, kuplovanim sa tripl-kvadrupol masenim spektrometrom. Komponente su se razdvajale na koloni ZB-5MSplus (30m x 0,25mm; 0,25µm debljina filma) sa helijumom kao nosećim gasom. Uzorci su se puštali po SCAN metodi pri konstantnom protoku od 2.40 ml/min, snimanjem opsega masa m/z 50-500 (EI 70eV). Program analize etarskog ulja trajao je 58 min.



Slika 10. Shimadzu QP2020 aparat koji je korišćen za hemijsku karakterizaciju etarskog ulja smilja

3.1.3 Ispitivanje antimikrobnih aktivnosti etarskog ulja smilja

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja smilja sprovedeno je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *H. italicum*-a je testirana na sedam laboratorijskih kontrolnih sojeva mikroorganizama (engl. KVIK-STIK, TM Microbiologics, Saint Cloud, MN, USA), tri Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i četiri Gram negativne bakterije: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NCIMB 8267, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* NCTC 6017 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Primarne kulture su inkubirane 24 sata u aerobnim uslovima na 35 ± 1 °C. Suspenzija mikroorganizama koji se koriste kao inokulum je pripremljena od svježih kultura u sterilnom fiziološkom rastvoru (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francuska) do gustine od 0,5 prema *McFarland* standardu (McFarland Densimat densitometer, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francuska), što odgovara $1,5 \times 10^8$ CFU/ml mikroorganizama.

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskog ulja *H. italicum* je korišćena mikrodiluciona metoda u bujonu, izvedena u skladu sa smjernicama Evropskog komiteta za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobna sredstva (engl. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST 2020, 2023). Određena vrijednost MIC-e definisana je kao najniža koncentracija ispitivanog antimikrobnog sredstva, koja inhibira rast testiranog mikroorganizma. Najčešće se izražava u µg/ml ili mg/l.

Osnovni rastvor *H. italicum* etarskog ulja je pripremljen u *Mueller-Hinton* bujonu (MHB, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Velika Britanija) nakon što je rastvoren u dimetil sulfoksidu (DMSO). Razrijeđeni rastvori etarskog ulja *H. italicum*-a u rasponu od 0,004 – 4 mg/ml su pripremljeni u MHB-u, i dodati u duplikatoru na ravnom dnu, u sterilne mikrotitarske pločice sa 96 otvora (100 µl po otvoru) (Nunc™ MicroWell™ 96-Vell Microplates, Thermo Fisher Science, Valtham, MA, SAD) i svaka koncentracija je inokulisana sa 5×10^5 CFU/ml mikroorganizama. Kontrola rasta mikroorganizama je takođe, bila uključena u eksperiment: pozitivna kontrola (odnosno, samo mikroorganizmi u mediumu) i negativna kontrola (odnosno, isključivo medium sa uzorcima). Mikrotitarske ploče su inkubirane 24 sata u aerobnim uslovima na 35 ± 1 °C, dok je MIC-a određena nakon dodavanja resazurina (7hidroksi-3H-fenoksazin-3-on 10-oksidi) (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka). Resazurin je bio redoks indikator za detekciju rasta i metabolizma ćelija. Karakteriše ga plava i ne-fluorescentna boja kada su ćelije nežive. U prisustvu mikroorganizama, stvara se metabolit resazurina: resorufin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on) kojeg karakteriše ružičasta boja. MIC-a uzoraka je određena kao najniža koncentracija etarskog ulja *H. italicum*-a koja inhibira rast mikroorganizma. Svaki test je ponovljen tri puta.

3.2 II faza eksperimentalnog rada

3.2.1 Izrada polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja

Polučvrsti preparati su pripremljeni zajedno sa mentrokom u Laboratoriji za farmaceutsku tehnologiju, na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici. Razvijanje formulacije masne, krem i gel podloge za inkorporiranje ulja smilja izvršeno je s ciljem generisanja novog proizvoda prirodnog porijekla zahvaljujući kome bi se omogućilo

pacijentima, da sa već postojećim proizvodom (etarsko ulje smilja za spoljašnju primjenu), a u zavisnosti od promjene na koži, odaberu masni, kremasti ili gelasti preparat. Zbog većeg stepena stabilnosti i manje količine vode, konzervans nije dodat u formulacije mast i krem koje su korišćene „ex tempore“ od strane ispitanika, dok je gel formulacija sadržala konzervans. Kada je bilo potrebno da se formulacije čuvaju do momenta upotrebe, dodavao se konzervans natrijum benzoat (0,2%). Za izradu preparata koristili smo sljedeću opremu: preciznu digitalnu vagu (Adam Equipment), magnetnu miješalicu (*ISOLAB Laborgeräte GmbH, Germany*), vodeno kupatilo (Water Bath, WB-2R4H-15), rešo (Gorenje, Srbija) i termometar (Kefo, Srbija). Od laboratorijskog posuđa smo koristili: tarionik, patenu, pistil, hemijske čaše, stakleni štapić, kašike, kartice, spatule, kapaljke, špric i iglu.

3.2.1.1 Izrada podloge – masti

Za ovo istraživanje smo izradili mast *Eucerin*, prema propisu MF 2008. Ova mast je u praksi poznata pod sljedećim sinonimima: *Unguentum vaselini hydrophilicum I* (Mast hidrofilnog vazelina), *Excipiens euceroli*, *Eucerolum*. Pripada mastima koje emulguju vodu. Odlučili smo se za ovu podlogu, jer su literaturni podaci ukazali na njenu optimalnost i efikasnost kada se kombinuje sa etarskim uljem smilja.

Mast se pripremala miješanjem 0,5 g etarskog ulja *H. italicum*-a sa *Eucerin* masnom podlogom, do momenta dobijanja homogenizovanog uzorka. Placebo preparat je sadržao samo *Eucerin* podlogu. *Eucerin* baza je sadržala mješavinu: holesterola, lanolina, tečnog parafina i bijelog vazelina.

Sastav	100,0 g
<i>Cholesterolum</i>	5,0 g
<i>Adeps lanae</i>	15,0 g
<i>Paraffinum liquidum</i>	15,0 g
<i>Vaselinum album</i>	65,0 g

Izrada

Holesterol se dobro razribao sa tečnim parafinom u pateni pomoću pistila, a zatim se uz miješanje postepeno dodavao bezvodni lanolin i bijeli vazelin, u cilju dobijanja homogene masti. Nakon homogenizacije, dodavalo se etarsko ulje smilja i miješalo se 30 minuta na magnetnoj miješalici. Placebo je izrađen kao Eucerin podloga, bez dodatka etarskog ulja smilja.

Sastav masne podloge – INCI (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) naziv:

Holesterol – *Cholesterol* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Lanolin – *Lanolin* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Tečni parafin – *Paraffinum liquidum* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
Bijeli vazelin – *Petrolatum* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Tabela 6. Kvalitativni i kvantitativni sadržaj supstanci u polučvrstim preparatima tipa masti: aktivna mast (AM) i placebo mast (PM)

	AM	PM	Uloga supstanci
Masna faza			
Holesterol	5,0	5,0	Emulgator
Lanolin	15,0	15,0	Emulgator
Tečni parafin	15,0	15,0	Masna faza
Bijeli vazelin	65,0	65,0	Masna faza
Aktivna supstanca			
Etarsko ulje smilja	0,5	-	Aktivna supstanca

3.2.1.2 Izrada podloge – krema

Izradili smo krem *Unguentum emolliens aquosum I* (Emolijentni lipofilni krem I), prema propisu MF 2008. Ovaj krem je u praksi poznat i pod sljedećim sinonimima: *Unguentum leniens*, *Unguentum refrigerans*, *Cold cream*, *Hladeći krem*.

Sastav	100,0 g
<i>Cetylis palmitas</i>	12,0 g
<i>Cera alba</i>	12,0 g
<i>Paraffinum perliquidum</i>	56,0 g
<i>Borax</i>	0,7 g
<i>Aqua purificata</i>	18,8 g

Izrada

Ovaj lipofilni krem se pripremao odmjeravanjem i miješanjem sastojaka masne faze cetilpalmitata, bijelog pčelinjeg voska i lakog tečnog parafina. Sastojci masne faze su se otopili uz miješanje u vodenoj pari vodenog kupatila na temperaturi 70 °C, koju smo intenzivno kontrolisali termometrom. Vodeni rastvor boraksa u hemijskoj čaši, se zagrijavao na rešou na temperaturi od 75 °C (temperaturu smo tokom izrade mjerili termometrom) i dodavao se uz miješanje pistilom u zagrijanu fazu. Dok se masa hladila dodavali smo mlaku vodu (3 ml) koja je isparila tokom procesa zagrijavanja. Njenu količinu smo eksperimentalno izračunali nakon izrade 5 serija ovih krema. Masa se zatim miješala magnetnom miješalicom do hlađenja i homogenizacije. Na temperaturi od 40 °C se dodalo 0,5 g etarskog ulja smilja i nastavilo se sa miješanjem na magnetnoj miješalici 30 minuta. Placebo uzorak je pripremljen na isti način kao podloga, bez dodatka aktivne supstance.

U toku izrade kreme nastao je U/V emulgator anjonskog tipa (natrijum-cerotinat i natrijum-ceril-14-hidroksipalmitat) u reakciji saponifikacije između boraksa i slobodnih masnih kisjelina iz pčelinjeg voska. Zbog malog udjela vode (18,8 %), nastao je lipofilni krem (V/U).

Sastav krem podloge – INCI (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) naziv:

Cetilpalmitat – *Cetylis palmitas* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Bijeli pčelinji vosak – *Cera alba* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Laki tečni parafin – *Paraffinum perliquidum* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Boraks – *Borax* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Prečišćena voda – *Aqua purificata* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Tabela 7. Kvalitativni i kvantitativni sadržaj supstanci u polučvrstim preparatima tipa kreme:
aktivna krema (AK) i placebo krema (PK)

	AK	PK	Uloga supstanci
Masna faza			
Cetilpalmitat	12,5	12,5	Emolijent
Bijeli pčelinji vosak	12,0	12,0	Emulgator U/V
Laki tečni parafin	56,0	56,0	Masna komponenta
Vodena faza			
Boraks	0,7	0,7	Emulgator U/V
Prečišćena voda	18,8	18,8	Vodena faza
Aktivna supstanca			
Etarsko ulje smilja	0,5	-	Aktivna supstanca

3.2.1.3 Izrada podloge – gela

Izradili smo karbomerni gel, *Carbomeri mucilago* (Hidrofilni gel karbomera) prema propisu MF 2008. Ovaj gel je u praksi poznat i pod sljedećim sinonimima: *Carbopoli gelum*, *Polyacrilati gelum*, *Polyacrylate mucilage*, *Excipiens Carbomeri*, *Karbomerni gel*, *Karbopolni gel*. Spada u hidrofilne gelove. Sadrži veliku količinu vode. Zbog stabilnosti i mogućnosti kontaminacije, u ovu formulaciju smo dodali konzervans natrijum benzoat 0,2 %.

Sastav	100,0 g
<i>Carbomera</i>	0,5 – 1,00 g
<i>Propylenglycolum</i>	10,00 g
<i>Triaethanolamini solutio</i> , 10%	7,00 – 14,00 g
<i>seu Natrii hydroxydi solutio</i> , 10%	2,00 – 4,00 g
<i>seu Trometamoli solutio</i> , 10%	5,00 – 10,00 g
<i>Aqua purificata</i> q.s. ad	100,00 g

Za izradu je korišćen *Carbopol 940*. *Carbopol* je zaštićeni naziv karbomera, koji se na tržištu nalaze pod sljedećim nazivima: *Carbopol 934*, *Carbopol 940*, *Carbopol 941*, *Carbopol 980*, *Carbopol 974P*, itd.

Izrada

Za pripremu jednostavne gel baze se koristio karbomer, koji se izmiješao sa malom količinom svježe prokuvane ohlađene prečišćene vode. Ostatak svježe prokuvane ohlađene prečišćene vode se dodavao postepeno i miješalo se dok nije nastala disperzija bez grudvica. Ova disperzija se uz miješanje razblažila propilenglikolom i dodao 10% rastvor natrijum hidroksida s ciljem da se izvrši neutralizacija. Na kraju se dodao 0,2% rastvor natrijum benzoat, kao konzervans. Nastala smješa je ostavljena da bubri do postizanja odgovarajuće konzistencije gela, uz povremeno miješanje. Gel esencijalnog ulja smilja od 0,5 % v/v se pripremao miješanjem 0,5 g esencijalnog ulja smilja sa 99,5 g pripremljenog karbomernog gela. Placebo formulacija sadržala je samo karbomerni gel bez dodatka esencijalnog ulja smilja.

Sastav gel podloge – INCI (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) naziv:

Karbomer – *Polyacrylic acid* (Carbomer) (proivodač Meilab, Beograd, Srbija)
Propilenglikol – *Propylene Glycol* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
Trietanolamin – *Triethanolamine* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
Prečišćena voda – *Aqua purificata* (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

Natrijum benzoat – *Natrii benzoas* (proizvođač Crystal Lab, Beograd, Srbija)

Tabela 8. Kvalitativni i kvantitativni sadržaj supstanci u polučvrstim preparatima tipa gel: aktivni gel (AG) i placebo gel (PG)

	AG	PG	Uloga supstanci
Vodena faza			
Karbomer			Gelirajuće
Propilenglikol	1,0	1,0	sredstvo
Natrijum	10,0	10,0	Humektans
hidroksid	4,0	4,0	Sredstvo za neutralizaciju
Natrijum benzoat	0,2	0,2	Konzervans
Prečišćena voda	85,0	85,0	Rastvarač
Aktivna supstanca			
Etarsko ulje smilja	0,5	-	Aktivna supstanca

3.3 III faza eksperimentalnog rada

3.3.1 Farmaceutsko – tehnološka ispitivanja polučvrstih preparata sa etarskim

Farmaceutsko-tehnološka ispitivanja sprovedena su na Farmaceutskom fakultetu u Nišu. Izvršena su sljedeća ispitivanja: praćenje organoleptičkih parametara, razmazivost, električna provodljivost, ispitivanje pH vrijednosti, ispitivanje fizičke stabilnosti centrifugiranjem, teksturna analiza, kao i senzorna analiza. Obrađeni su uzorci lipofilnog krema – *Unguentum Emoliens* + ulje smilja (U) i masna podloga *Eucerin* + ulje smilja (E). Uzorak gela je nestabilan – javilo se otečnjavanje, pa nije bilo moguće sprovesti ispitivanja. Svi uzorci su bili upakovani u plastične ambalaže od propiletilena i čuvani su na kontrolisanoj sobnoj temperaturi 22 ± 3 °C.

3.3.1.1 Praćenje organoleptičkih parametara

Sprovedena su organoleptička ispitivanja uzoraka, inicijalno, 72 h, kao i 7 dana nakon izrade; kontrolno mjerenje uslijedilo je nakon 1 mjeseca, kao i poslije 3 mjeseca čuvanja na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C).

Praćenje izgleda formulacija tokom ovog vremenskog intervala prvenstveno se odnosilo na vizuelno praćenje preparata u pogledu njihove boje, izgleda, mirisa, konzistencije, kao i aplikativnih karakteristika masti, kremova i gelova sa etarskim uljem smilja.

3.3.1.2 Određivanje električne provodljivosti

Provodljivost je testirana pomoću konduktometra CDM 230 (Radiometar, Danska) direktnim uranjanjem konduktometarske sonde u uzorak kreme i masti, na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), kao i direktnim učitavanjem rezultata u digitalnoj formi. Mjerna elektroda je prije početka rada kalibrisana 0,01 M rastvorom KCl.

3.3.1.3 Mjerenje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti je izvedeno potenciometrijski. Nakon ekstrakcije uzoraka masti, pH vrijednosti uzoraka ispitivane su na osnovu vodene faze. Postupak ekstrakcije je bio sljedeći: 5 g uzoraka zagrijavao se sa 20 ml prečišćene vode na 60 °C tokom 10 minuta. Nakon hlađenja izvodio se dekantovanjem vodeni sloj i u njemu se mjerio pH pomoću elektrode pH metra pH 211 Microprocessor pH Meter (*Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA*). Prije početka rada, aparat je kalibrisan na propisan i standardizovan način kalibracijom u dvije tačke (upotrebom standardnih pufera pH 4,0 odnosno 7,0),

3.3.1.4 Ispitivanje fizičke stabilnosti testom centrifugiranja

Ispitivanje stabilnosti tokom izazvanog ubrzanog starenja preparata sprovedeno je pod sljedećim uslovima: nakon 6 mjeseci skladištenja preparata, polučvrsti preparati (mast i krem) su prošli kroz centrifugiranje na 3000 o/min (2 x 15 min.). Korišćena je Laboratorijska centrifuga (*Tehtnica, Slovenija*). Zatim su ovi preparati izloženi stresnim uslovima, imitirajući na ovaj način spoljašnje ekstremne uslove.

Preparati koji su čuvani na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) su takođe, u trajanju od 24 h nakon toga, izloženi stresnim uslovima kao što je: ciklična promjena temperature (3 ciklusa: 48 sati na 45 ± 2 °C , 48 sati na 22 ± 2 °C, 48 sati na 5 ± 2 °C). Korišćena je klimatska komora, Sutjeska, Srbija i Frižider, Gorenje, Slovenija.

Nakon izlaganja formulisanih uzoraka gore navedenim uslovima, procijenili smo stabilnost testiranih uzoraka:

1. praćenjem promjena organoleptičkog izgleda i
2. praćenjem promjena aplikativnih karakteristika.

3.3.1.5 Teksturna analiza

Za izvođenje teksturne analize – *Texture Profile Analysis* (TPA) korišćen je uređaj CT3 *Texture Analyzer* (Brookfield, AMETEK Inc., Middleborough, MA, USA). Sonda instrumenta uranjana je u posudu za uzorke (koja je 75% ispunjena uzorkom, bez inkorporacije vazduha) i izranjana iz nje. Na ovaj način, simulirano je kretanje ljudskog prsta. Tokom TPA-e, sonda se dva puta uranjala u uzorak tokom čega je instrument izračunavao parametre. Svako mjerenje je ponovljeno 5 puta. Uslovi izvođenja analize prikazani su na Tabeli 14. Brzina testa je bila podešena na 1,5 mm/s, čija vrijednost je iznosila 5 mm, dok je opterećenje bilo 0,5 N.

Tabela 9. Uslovi izvođenja teksturne analize

Vrsta testa (engl. <i>Test type</i>)	TPA
Brzina testa (engl. <i>Test speed</i>)	1,5 mm/s
Ciljna vrijednost (engl. <i>Target value</i>)	5 mm
Opterećenje (engl. <i>Trigger load</i>)	0,5 N
Sonda (engl. <i>Probe</i>)	Konična sonda (eng. <i>Cone probe</i>), TA-STF

Rezultati su snimljeni pomoću softvera (*Brookfield Engineering Laboratories*), a zatim predstavljeni kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija za svaki dati parametar. Izvršeno je mjerenje narednih parametara: čvrstoća prvi ciklus, ljepljivost, otpornost, čvrstoća drugi ciklus, kohezivnost i elastičnost.

3.3.1.6 Senzorna analiza

Da bi se procijenile određene senzorne karakteristike polučvrstih preparata masti i krema, 20 ispitanika dobrovoljaca je učestvovalo u senzornoj studiji sa ciljem procjene senzornih karakteristika ispitanih uzoraka. Svi ispitanici su dobili i popunili upitnik (Tabela 10) u vezi sa senzornim karakteristikama formulacija prije, tokom i nakon primjene. Za svaku senzornu karakteristiku data je lista deskriptivnih pojmova. Senzorna procjena je izvedena u pravilno osvijetljenoj prostoriji, gdje je temperatura bila podešena na 21 ± 2 °C i vlažnost na $45 \pm 3\%$. Učesnici su izabrani na bazi ličnih interesovanja i sposobnosti da učestvuju u ovom ispitivanju. Korišćeni upitnici i deskriptivni parametri i skale su predloženi od strane internacionalne organizacije koja postavlja standarde u oblasti senzornih studija (engl. *American Society for Testing and Materials*, ASTM).

Tabela 10. Upitnik za ocjenjivanje aplikativnih osobina preparata, uz opis atributa korišćenih u senzornoj studiji

Faza primjene	Senzorna karakteristika	Opis
Prije utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija – Opisati konzistenciju uzorka prije utrljavanja, odnosno tokom uzimanja.	Tečan, polučvrst.
	Sjaj – Opisati sjaj prije utrljavanja, odnosno tokom uzimanja.	Mat, biserno sjajan, blago sjajan, sjajan, veoma sjajan.
Tokom utrljavanja	Razmazivost – Opisati razmazivost nakon utrljavanja.	Lako se razmazuje, teško se razmazuje, vrlo teško se razmazuje.
	Ljepljivost – Opisati ljepljivost nakon utrljavanja (Stepen ljepljivosti uzorka tokom nanošenja – sila potrebna da se odvoji prst od kože)	Nije ljepljiv, blago ljepljiv, ljepljiv, veoma ljepljiv.
	Gustina – Opisati gustinu tokom utrljavanja.	Rijedak, blago gust, gust, veoma gust.

Osjećaj nakon nanošenja	Masnoća – Opisati masnoću tokom utrljavanja.	Nije mastan, blago mastan, mastan, veoma mastan.
	Sjaj – Opisati stepen u kom uzorak sija tokom utrljavanja.	Nije sjajan, blago sjajan, sjajan, veoma sjajan.
	Brzina apsorpcije – Opisati utisak o brzini apsorpcije uzorka na koži.	Sporo, umjereno, brzo.
	Rezidualni film – Količina rezidualnog filma koju ostavlja uzorak 10 minuta nakon nanošenja.	Nema filma, umjeren film, izražen film.
	Ljepljivost – Stepent ljepljivosti kože 10 minuta nakon aplikacije.	Nije ljepljiv, blago ljepljiv, ljepljiv, veoma ljepljiv.
	Masnoća – Stepent masnoće kože 10 minuta nakon aplikacije.	Nije mastan, blago mastan, mastan, veoma mastan.
	Sjaj – Stepent sjaja na koži 10 minuta nakon aplikacije.	Nije sjajan, blago sjajan, sjajan, veoma sjajan.

3.3.2 Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta formulacija

Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta formulacija sprovedeno je na Institutu za javno zdravlje Crne Gore. Polučvrsti preparati za kožu pripadaju kategoriji nesterilnih farmaceutskih oblika. Ovo ispitivanje se vršilo prema zahtjevima člana 106. Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet („Službeni list Crne Gore“, br. 004/15) (103). Parametri ispitivanja člana 6. (107):

1. Koagulaza pozitivan stafilokok
2. *Proteus* vrste
3. *Escherichia coli*
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. Ukupan broj mikroorganizma
6. Ukupan broj kvasnica i plijesni

Ova metoda ispitivanja mikrobiološke stabilnosti predstavlja specifičan test za mikrobiološku kontrolu predmeta opšte upotrebe, kao što su proizvodi koji dolaze u kontakt sa hranom, kozmetikom ili medicinskim proizvodima.

Postupak: Proizvod se inokulirao određenim sojevima mikroorganizama (npr. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) i inkubirao na odgovarajućim hranljivim agarima ili u bujonima. Zatim se pratio rast mikroorganizama u različitim vremenskim intervalima.

Priprema uzorka: Za ispitivanje predmeta opšte upotrebe (prema članu 106.) bilo je potrebno 20 g uzorka, koji se homogenizovao sa 180 ml puferisane peptonske vode. Ovaj korak je dalje omogućio da se sve mikrobne kontaminacije ravnomjerno rasporede u tečnost i na ovaj način olakša dalja obrada.

Obogaćivanje i inokulacija: Iz puferisane peptonske primarno obogaćene vode prebačeno je 0,1 ml u hranljivi bujon i brilijant-zeleni bujon. Za ukupan broj mikroorganizama, korišćeno je 1 ml *Rose Bengal* agara.

Inkubacija i ispitivanje različitih mikroorganizama:

Hranljivi slani bujon se inkubirao 24 h na 37 °C, kako bi se omogućio rast različitih vrsta mikroorganizama.

Brilijant-zeleni se inkubirao 24 h – 48 h na 42 °C. (U ovom slučaju, riječ je o bujonu koji sadrži Durhamovu cjevčicu, koja služi da se u slučaju pojave gasa u njoj dokazuje prisustvo rasta *Escherichie coli* poslije inkubacije 48 h).

Slani bujon se presijava na B. Parker ploči, koji se inkubirao 24 h na 37 °C (za dokazivanje prisustva *Proteus* vrste), kao i na Cetrimid agaru za dokazivanje prisustva *Pseudomonas aeruginosa*.

Ukupan broj se inkubirao 72 h na 30 °C. *Rose Bengal* se inkubirao 3 – 5 dana na 22 °C.

Identifikacija patogena: Praćenje je sprovedeno u cilju utvrđivanja da li je došlo do porasta značajnih patogena, zbog kojih bi se izvršila dalja identifikacija.

3.4 IV faza eksperimentalnog rada

3.4.1 Ispitivanje antiinflamatornog efekta polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja na kožne inflamatorne procese

U skladu sa saglasnošću Etičkog komiteta, broj rješenja 03/01-10526/1, Podgorica, 27. 04. 2023, sprovedeno je istraživanje izrađenih formulacija na ispitanicima kod kojih su detektovani upalni procesi kože, atopijski dermatitis. Ispitivanje je sprovedeno u Kliničkom centru u Podgorici, praćeno od strane dermatologa. Nijesu bili uključeni ležeći bolesnici. Istraživanje je trajalo od 15. 05. 2023. do 15. 05. 2024. godine.

3.4.2 Dizajn studije

Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 100 ispitanika. Garantovana je anonimnost svim ispitanicima koji su bili uključeni u istraživanje, ne samo u toku trajanja same studije, već i u periodu nakon njenog završetka. Studija je realizovana bez pristrasnosti, kako bi se osigurala objektivna evaluacija kliničkih ishoda. Prije početka ispitivanja, svi ispitanici su popunili i potpisali pisani obrazac za davanje saglasnosti za učešće u studiji. Za ispitanike mlađe od 18 godina, saglasnost i upitnik su popunili njihovi roditelji.

Kontrolna grupa: Kontrolna grupa sastojala se od pacijenata koji su koristili placebo preparate. Naime, ispitanici su bili podijeljeni u dvije grupe, pri čemu je jedna grupa od 50 pacijenata koristila placebo, dok je druga grupa od 50 pacijenata koristila polučvrste preparate sa etarskim uljem smilja.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje: U istraživanje su bili uključeni ispitanici sa upalnim procesima kože (atopijski dermatitis), stariji od 12 godina, koji su imali izražene probleme najmanje 7 dana ili duže.

Kriterijumi isključenja: Iz istraživanja su bili isključeni ispitanici koji su pili ili aplikovali topikalno lijekove iz grupe kortikosteroida, antibiotika, antihistaminika, citostatika (metotreksat), trudnice, dojilje, djeca mlađa od 12 godina, onkološki pacijenti, kao i psihijatrijski pacijenti.

Topikalni preparati su se primjenjivali 21 dan 2 – 3 puta dnevno, uz praćenje svih efekata ispoljenih na koži. Efekti su praćeni i evidentirani u tri termina kontrolnog pregleda od strane

dermatologa. Tokom tog perioda, pacijenti su praćeni i ocjenjivano je njihovo stanje i svakih 7 dana tokom 21 dana. Ocjenjivano je i procijenjeno i njihovo početno stanje bez tretiranja preparatima.

Za procjenjivanje uspješnosti liječenja smo koristili SCORAD indeks. Za procjenu težine atopijskog dermatitisa korišćen je objektivni SCORAD indeks u saradnji sa dermatologom, s ciljem standardizovane i kvantitativne ocjene kliničkih lezija, dok verzija PO-SCORAD nije primjenjivana u ovoj studiji.

Ispitanici su dobili upitnike za procjenu svih vrijednosti: objektivnih A, B, C i subjektivnih (svrab i nesanica), koji su popunjavali svakih 7 dana na kontrolnom pregledu nakon što su koristili preparat sa etarskim uljem smilja ili placebo. Popunjavanje upitnika je praćeno od strane dermatologa (Slika 11).

Referentne vrijednosti SCORAD indeksa su:

Objektivni SCORAD indeks:

blag >15, umjeren 15-40 i težak > 40.

Ukoliko računamo i subjektivni osjećaj, onda su referentne vrijednosti

sljedeće: lag >25, umjeren 25-50 i težak > 50.

Upitnik za računanje SCORAD indeks-a

1. Affected area (A) – Pogodeno područje tijela

Glava i vrat (do 9%)	0%
Gornji ekstremiteti (do 9% svaki)	0%
Prednji dio trupa (do 18 %)	0%
Leđa (do 18 %)	0%
Doljnji ekstremiteti (do 18 % svaki)	0%
Genitalije (do 1 %)	0%

2. Intenzitet

Izabrano je reprezentativno područje ekcema. U ovoj oblasti, intenzitet svakog od sledećih znakova se ocenjuje kao : 0 –nema; 1- blago; 2- umjereno; 3- teško;

Crvenilo	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Oticanje	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Hraste (suve i vlažne)	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Ogrebotine	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Zadebljanje kože	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Suvoća	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐

3. Subjektivni simptomi.

Korišćenje vizuelne analogne skale gde je 0 bez svraba (ili bez nesanice), a 10 je najgori mogući svrab (ili nesanica).

Svrab	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Nesanica	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10

Ime i prezime (ako želi):

Godina rođenja:

Slika 11. Upitnik za računanje SCORAD indeksa, koji su popunili ispitanici uz pomoć dermatologa

3.4.3 Statistička analiza

Statistička značajnost procjenjivala se na minimalnom nivou od $p > 0.05$. Statistička analiza podataka izvršena je pomoću komercijalnog statističkog softvera *SPSS Statistics 25* (*Statistical Package for the Social Sciences, version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA*). Za poređenje između placebo grupe i grupe tretirane smiljem smo koristili Mann-Whitney-ev test. Za poređenje između početnog stanja pacijenata i I, II i III kontrole, koristili smo Friedman-ov test.

Podaci su prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz korišćenje MS Excel-a.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

4.1.1 Organoleptički izgled etarskog ulja smilja

Zahvaljujući metodi parne destilacije, omogućeno je da se od 1000 kg smilja dobije 0,95 kg etarskog ulja smilja. Što se tiče osobenosti navedenog ulja smilja, etarsko ulje je bilo žute boje, uljano na dodir, bez čestica, praćeno jakim mirisom smilja.

Nakon utrljavanja na koži, ostavljalo je neljepljiv mastan film, sjaj i karakterističan miris koji se dugo zadržavao. Nije bilo iritantno i nije peckalo na koži kada se utrljavalo. Sa aspekta organoleptičkih karakteristika, etarsko ulje smilja pokazuje zadovoljavajuće senzorne osobine i odgovarajući vizuelni izgled.

4.1.2 Hemijska karakterizacija etarskog ulja smilja

Rezultati analize hemijskog sastava ulja *Helichrysum italicum*-a, dobijenih primjenom gasne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrofotometrijom ulja *Helichrysum italicum*-a iz familije *Asteraceae*, doveli su do identifikacije ukupno 43 jedinjenja koja čine 84,54% ulja. Identifikovana jedinjenja pripadaju različitim hemijskim klasama, među kojima dominiraju monoterpenski i seskviterpenski ugljovodonici, kao i njihovi oksidovani derivati. Ovakav hemijski profil je u skladu sa podacima iz literature za vrste iz roda *Helichrysum*, što potvrđuje karakterističan hemotip analiziranog uzorka.

Hemijski sastav esencijalnog ulja je prikazan u Tabeli 11.

Tabela 11. Prikaz hemijskog sastava etarskog ulja smilja

NAZIV KOMPONENTE	KONCENTRACIJA %
<i>α-Pinene</i>	16,62
<i>α-Fenchene</i>	0,34
<i>Camphene</i>	0,16
<i>β-Pinene</i>	0,45
<i>Myrcene</i>	0,08
<i>α-Terpinene</i>	0,19
<i>p-Cymene</i>	0,25
<i>Limonene</i>	2,69
<i>Eucalyptol</i>	0,53
<i>Isobutyl angelate</i>	0,43
<i>γ-Terpinene</i>	0,42
<i>Terpinolene</i>	0,18
<i>Linalool</i>	0,64
<i>2-Methylbutyl 2-methylbutyrate</i>	0,18
<i>2-Methylbutyl angelate</i>	1,25
<i>Borneol</i>	0,06
<i>4-Terpineol</i>	0,72
<i>α-Terpineol</i>	0,54
<i>Decanal</i>	0,04
<i>Nerol</i>	0,22
<i>Neryl acetate</i>	6,04
<i>α-Ylangene</i>	0,59
<i>α-Copaene</i>	2,99
<i>Italicene</i>	4,16
<i>cis-α-Bergamotene</i>	0,93
<i>β-Caryophyllene</i>	5,02
<i>Bisabolane</i>	4,28
<i>Geranyl n-propionate</i>	1,23

<i>β-Farnesene</i>	0,18
<i>α-Humulene</i>	0,43
<i>α-Acoradiene</i>	0,45
<i>β-Acoradiene</i>	0,46
<i>γ-Curcumene</i>	14,06
<i>ar-Curcumene</i>	2,97
<i>β-Selinene</i>	7,39
<i>α-Selinene</i>	4,92
<i>γ-Cadinene</i>	1,22
<i>δ-Cadinene</i>	0,13
<i>Nerolidol (Z)</i>	0,15
<i>Guaiol</i>	0,12
<i>β-Eudesmol</i>	0,4
<i>α-Eudesmol</i>	0,23
<i>Geranyl hexanoate</i>	0,2
Ukupno	84,54

Jedinjenja koja su identifikovana u etarskom ulju smilja prikazana su u Tabeli 11. Glavne komponente su bile: *α-pinene* (16,62%) i *γ-curcumene* (14,06%). Količina nekoliko jedinjenja u etarskom ulju je takođe bila značajna: *β-selinene* (7,39%), *neryl acetate* (6,04%), *β-caryophyllene* (5,02%), *α-selinene* (4,92%).

Uzimajući u obzir postojeće literaturne podatke, ali i upoređujući hemijski sastav etarskog ulja smilja sa ulcinjske obale i drugih regionalnih djelova svijeta, možemo uočiti razlike u dominantnim jedinjenjima uočavaju se razlike u zastupljenosti dominantnih jedinjenja, što može biti posljedica ekoloških i klimatskih faktora, kao i genetske varijabilnosti vrste. Ovakve razlike doprinose formiranju različitih hemotipova *Helichrysum italicum*-a, što može imati uticaja na biološku aktivnost etarskog ulja. Djihane i sar. (50), u svom istraživanju predstavili su sastav etarskog ulja *H. italicum*-a iz sjevernog Alžira koji je sadržao: *α-cedrene*, *α-curcumene* i *geranyl acetate* i razlikovao se od sastava etarskog ulja sa mediteranske obale na području Ulcinja, koje je, bilo predmet naše analize.

Otkrivene su razlike u hemijskom sastavu etarskog ulja *H. italicum*-a prikupljenog u Hercegovini, koji je najviše sadržao sljedeća jedinjenja: α -pinene (15,7%) i γ -curcumene (12,8%)

(108). *Izo-italicen epoksid* je preovladavao u etarskom ulju smilja uzgajenog u južnoj Italiji (109). Hemijski sastav je varirao u odnosu na geografsko porijeklo, promjenljive klimatske uslove, vegetacije i ciklus biljke, kao i u zavisnosti od toga da li je korišćen svjež ili sušeni biljni materijal.

Veće prisustvo α -pinen-a koje ima izražen antiinflamatorni efekat (110, 111), antioksidativni efekat (112) i antimikrobni efekat (113) – potvrđuje benefite samog etarskog ulja smilja. γ -curcumene ima antimikrobno djelovanje (114). *Selinene* ima antioksidativno i antiinflamatorno djelovanje (115). *Neryl acetate* kao četvrta najzastupljenija komponenta, osim antimikrobnog i antiinflamatornog djelovanja predstavlja najznačajniju komponentu sa značajnim uticajem na integritet kožne barijere. Ova komponenta doprinosi procesu diferencijacije keratinocita, istovremeno stimulišući sintezu epidermalnih lipida i ceramida, čime pospješuje formiranje i jačanje zaštitne barijerne funkcije kože. Zahvaljujući ovim svojstvima, *neryl-acetate* se smatra jednim od najvažnijih bioaktivnih molekula u etarskom ulju smilja, posebno u kontekstu dermatološke primjene. (116).

Hemijska podjela jedinjenja koja ulaze u sastav etarskog ulja smilja je predstavljena u Tabeli 12.

Tabela 12. Prikaz hemijske podjele jedinjenja koja ulaze u sastav etarskog ulja smilja

Monoterpeni	<i>α-Pinene</i>
	<i>α-Fenchene</i>
	<i>Camphene</i>
	<i>β-Pinene</i>
	<i>Myrcene</i>
	<i>α-Terpinene</i>
	<i>p-Cymene</i>
	<i>Limonen</i>
	<i>Eucalyptol</i>

	γ -Terpinene Terpinolene Nerol Neryl acetate ar-Curcumene
Seskviterpeni	α -Ylangene α -Copaene Italicene cis- α -Bergamotene β -Caryophyllene Bisabolane β -Farnesene α -Humulene α -Acoradiene β -Acoradiene γ -Curcumene β -Selinene α -Selinene γ -Cadinene δ -Cadinene
Terpenski alkoholi	Linalol Borneol 4-Terpineol α -Terpineol
Seskviterpenski alkoholi	Nerolidol (Z) Guaiol β -Eudesmol α -Eudesmol
Estri	2-Methylbutyl 2-methylbutyrate 2-Methylbutyl angelate Geranyl n-propionate Geranyl hexanoate

4.1.3 Antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja smilja je prikazana u Tabeli 13.

Tabela 13. Prikaz antimikrobne aktivnosti etarskog ulja smilja *Helichrysum italicum*-a

MIKROORGANIZAM	MIC MG/ML
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,053 ± 0,014
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,021 ± 0,007
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,012 ± 0,004
<i>Escherichia coli</i>	> 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 4
<i>Salmonella abony</i>	> 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 4

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskog ulja *Helichrysum italicum*, prikazani u Tabeli 13, ukazuju na izraženu djelotvornost prema Gram-pozitivnim bakterijama, dok je aktivnost prema Gram-negativnim sojevima bila zanemarljiva. Najniža vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) zabilježena je za *Enterococcus faecalis* (0,012 ± 0,004 mg/ml), što ukazuje na visoku osjetljivost ovog mikroorganizma na komponente etarskog ulja. Značajna aktivnost je uočena i prema vrstama *Staphylococcus epidermidis* (0,021 ± 0,007 mg/ml) i *Staphylococcus aureus* (0,053 ± 0,014 mg/ml). S druge strane, kod Gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella abony* i *Pseudomonas aeruginosa*, vrijednosti MIK-a bile su veće od 4 mg/ml, što ukazuje na odsustvo ili vrlo slabu antimikrobnu aktivnost. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da etarska ulja, zbog složenog hemijskog sastava i lipofilne prirode, pokazuju selektivniju aktivnost prema Gram-pozitivnim mikroorganizmima, usljed razlika u strukturi ćelijskog zida (116).

Vrijednosti MIK-a su se kretale od 0,012 do 0,053 mg/ml. Etarsko ulje smilja je pokazalo najbolju antimikrobnu aktivnost protiv *E. faecalis*-a (MIK je 0,012 mg/ml), zatim protiv *S. epidermidis*-a (MIK je 0,021 mg/ml) i *S. aureus*-a (MIK je 0,053 mg/ml).

Prema našim rezultatima, može se zaključiti da je istaknutiji antimikrobni efekat etarskog ulja smilja *H. italicum*-a kod ispitanih Gram pozitivnih bakterija u odnosu na ispitane Gram negativne bakterije. To se može povezati sa činjenicom da je ćelijski zid Gram negativnih bakterija tanji, ali složeniji od zida Gram pozitivnih bakterija. Naime, Gram negativne bakterije imaju dvije membrane: citoplazmatsku ćelijsku membranu i vanjsku membranu. Osim toga, Gram negativne bakterije imaju tendenciju da budu otpornije na antimikrobna sredstva u odnosu na Gram pozitivne bakterije (116).

Upoređivanje antimikrobnih efekata sa rezultatima dobijenih na osnovu drugih literaturnih podataka, ukazuje na činjenicu da je etarsko ulje *Helichrysum italicum*-a, ekstrahovano iz endemskih biljaka sa područja Korzike, bilo korisnije protiv Gram pozitivnih bakterija (*S. aureus*) nego protiv Gram negativnih sojeva (117), što je u skladu sa rezultatima ostvarenim u našem radu. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Helichrysum italicum*-a iz Hrvatske bila je najviše obilježena protiv bakterija: *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*

(118). Etarsko ulje smilja *Helichrysum italicum*-a, koje je uzgajano u umjerenoj klimi Centralne Evrope (Varšava, Poljska) ima jaču bakteriostatsku aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija u poređenju sa Gram negativnim, pri čemu je *S. aureus* ATCC 25923 najosjetljiviji među testiranim (119). Na osnovu podataka dobijenih iz literature, potvrđen je veći stepen efikasnosti etarskog ulja smilja *H. italicum*-a iz Francuske protiv Gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* u odnosu na etarsko ulje smilja *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (biljka porijeklom iz Bosne), ali etarska ulja nijesu imala isti sastav, što može uticati na antimikrobnu aktivnost (120). Svi ispitani uzorci etarskog ulja smilja iz raznih područja ispoljavaju veću antimikrobnu aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija u odnosu na Gram negativne bakterije. Poznato je da kvalitet etarskog ulja uglavnom određuje njegov sastav. Ovaj parameter može značajno da varira u zavisnosti od genotipova, klimatskih uslova i snabdijevanja hranljivim materijama tokom kultivacije biljke. Na primjer, kod etarskog ulja *Helichrysum italicum*, koje je uzgajeno u Hrvatskoj, preovlađuju sljedeći sastojci: α -pinene (10,2%), α -

cedrene (9,6%), *aromadendrene* (4,4%), *β -caryophyllene* (4,2%) i *limonene* (3,8%), dok su dominantna jedinjenja koja sadrže kiseonik: *neryl acetate* (11,5%), *2-methylcyclohexyl pentanoate* (8,3%), *2-methylcyclohexyl octanoate* (4,8%) i *geranyl acetate* (4,7%) (121). Što se tiče dominantnih jedinjenja esencijalnog ulja iz *Helichrysum italicum*-a subsp. *microphyllum* (biljnog porijekla iz Bosne), riječ je o sljedećim jedinjenjima: monoterpeni *α -pinene* (20,84%) i seskviterpeni *γ -curcumene* (16,53%), zatim *β -selinene* (5,59%), *curcumene* (4,39%), *trans-caryophyllene* (4,35%), *β -diketon italidione I* (4,32%), *α -selinen* (4,28%) i *neryl acetate* (3,81%). Pored toga, *H. italicum* etarsko ulje iz Francuske sastojalo se od sljedećih primarnih jedinjenja: *neryl acetate* (33,87%), *γ -curcumen* (8,84%), *rosifoliol* (5,46%), *geranyl propionate* (4,98%), *α -curcumene* (4,31%), *italidion* (3,56%), *α -eudesmol* (3,19%) i *limonene* (3,02%) (120). Sve navedeno ukazuje na činjenicu da antimikrobni efekat etarskog ulja potiče iz monoterpenskih ili seskviterpenskih jedinjenja, kao i sinergistički efekat svih bioaktivnih komponenti (*neryl acetate* i *α -pinene*) prisutnih u etarskom ulju *H. italicum*-a (121).

4.2 Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

4.2.1 Organoleptičke karakteristike polučvrstih preparata

Organoleptičkim ispitivanjima, ali i na osnovu odgovarajućeg praćenja je zapaženo da su masti i kremovi neposredno nakon izrade bili bijele boje i obojeni sa blagom žučkastom (braon) bojom, sa karakterističnim mirisom etarskog ulja smilja, zatim bili su sjajni, polučvrste konzistencije i homogenog razmaza na staklenoj pločici. Uzorci izrađeni sa *Eucerin* podlogom bili su nešto čvršće konzistencije u poređenju sa uzorkom izrađenim sa podlogom *Unguentum Emolliens*. Masti i kremovi su se lako razmazivali, ostavljajući na koži mastan film, koji nije bio ljepljiv. Izazivali su subjektivan osećaj hidratacije kože.

Homogenost je bila zadovoljavajuća kod masti i krem uzoraka ne samo trenutno nakon pripreme, već i nakon 3 mjeseca čuvanja, bez znakova odvajanja faza, dok je kod gelova obilježeno blago odvajanje faza. U toku čuvanja kremova, uočeno je određeno očvršćavanje kremova u odnosu na masti, što može biti pokazatelj većih strukturnih promjena u uzorcima sa manjim udjelom masne faze, tokom čuvanja na optimalnim uslovima sobne temperature.

Nakon 3 mjeseca, nije bilo vidljivih promjena u izgledu, boji i razmazivosti svih izrađenih kremova i masti, što upućuje na dobru dugoročnu stabilnost.

Gelovi su bili providne konzistencije sa blagom braonkastom bojom sa primijećenim fazama odvajanja, što može biti rezultat velike količine vode u gelovima, kao i posljedica slabije mogućnosti inkorporiranja uljane komponente u ovu formulaciju.

Tokom perioda ispitivanja (90 dana), nijesu uočene promjene navedenih organoleptičkih karakteristika kod masti i kremova, dok se kod gelova primjećivalo blago odvajanje vode. Boja i miris preparata su ostali nepromijenjeni tokom perioda čuvanja.

Bongounri i sar., uočavaju da neka etarska ulja, uključujući i etarsko ulje smilja dodatno poboljšavaju stabilnost i rok trajanja kozmetičkih formulacija – sprečavanjem oksidacije lipida i razgradnje aktivnih sastojaka. Zaključuje se da je etarsko ulje djeluje kao antioksidans i konzervans, uzimajući u obzir njegov hemijski sastav (122).

Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja koje su opisali Bongounri i sar, kao i Tadić i sar., (122, 123) ukazuju na braonkastu boju polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja, prepoznatljivom po specifičnom mirisu koji podsjeća na miris meda sa jačim intenzitetom. Opisani su kao preparati jače teksture, koji se lako nanose i razmazuju na koži. Tadić i sar., (123) potvrđuju da se formulacije na bazi emulzije često koriste za lokalnu isporuku aktivnih supstanci, jer mogu uspostaviti dobru interakciju sa lipidima i vodom u rožnatom sloju kože, dok se kod gelova zapaža da zbog postojanja mreže gela u kojoj je moguće inkorporirati velike količine vode, posljedično dolazi do boljeg rastvaranja aktivne supstance, kada je aktivna supstanca hidrofilna. Međutim, kada je u pitanju isporuka hidrofobnih supstanci i interakcija sa hidro-lipidnim slojevima kože, potvrđuje se dominacija emulzija (losiona i kremova) u poređenju sa gelovima (122,123).

Stoga su kreme kao formulacije na bazi emulzije vrlo popularne, lako se nanose i šire, brže oslobađaju lipidne supstance, istovremeno ostavljajući lagani osjećaj na koži.

4.2.2 Provodljivost

Provodljivost oba uzorka nakon izrade iznosila je 0,01 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Vrijednosti provodljivosti nakon 30 i 90 dana prikazane su u Tabeli 14.

Tabela 14. Vrijednosti provodljivosti ispitanih uzoraka tokom čuvanja 30 i 90 dana

Uzorak	Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) – nakon 72 H	Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) – nakon 30 Dana	Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) – nakon 90 dana
Mast sa etarskim uljem smilja	0,01	0,01	0,01
Krem sa etarskim uljem smilja	0,01	0,02	0,021

Rezultati pokazuju da je provodljivost obje formulacije bila stabilna tokom perioda čuvanja, pri čemu su minimalne promjene u kremi sa etarskim uljem smilja (0,01 $\rightarrow$ 0,021 $\mu\text{S}/\text{cm}$) i dalje unutar prihvatljivih granica za farmaceutske preparate. Ovi nalazi sugerišu da formulacije održavaju stabilan jonski sastav tokom vremena, što je indikator hemijske stabilnosti i konzistencije proizvoda (124,125). Mjerenje provodljivosti masti i kremova nakon različitih vremenskih intervala (72 h, 30 dana i 90 dana), predstavljao je značajan parametar za ocjenjivanje stabilnosti i kvaliteta proizvoda. Navedene vrijednosti su ukazale na malene promjene u strukturi proizvoda i njegovoj hemijskoj i fizičkoj stabilnosti tokom vremena.

Dobijeni rezultat je bio tipičan za polučvrste preparate koji su bazirani na masnim komponentama, sa manjim sadržajem vode. Rezultati električne provodljivosti koji su postignuti na formulacijama zavise prvenstveno od njihovog sastava. Uljana faza može inhibirati provodljivost (124). Tokom čuvanja ispitanih preparata u vidu masti nije došlo do promjene provodljivosti. Razlog manjih promjena u provodljivosti može se opravdati činjenicom da nijesu sadržale veći procenat vode (124). Formulacije u obliku krema su imale blago povećanje vrijednosti od 0,01 – 0,021 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), što nije uticalo na stabilnost formulacija. Stojiljković i sar., (125) predstavili su slične rezultate u kojima su pH vrijednost

i provodljivost kod emulzija ostale na približno istom nivou nakon četiri sedmice skladištenja na sobnoj temperaturi. Ovaj rad predstavlja upoređivanje pH vrijednosti i električne provodljivosti kod tri emulziona sistema. Najniža vrijednost električne provodljivosti je kod emulzionog sistema koji sadrži lipofilni emolijens, odnosno tečni paraffin, slično kao u našim preparatima.

Svi rezultati su prihvatljivi za primjenu na koži. Rezultati električne provodljivosti pokazali su da su sve formulacije – mast ili voda u ulju – sistemi (124).

4.2.3 pH vrijednost polučvrstih preparata

U Tabeli 15 prikazane su pH vrijednosti izrađenih kremova i masti.

Inicijalne pH vrijednosti ispitivanih kremova i masti sa etarskim uljem smilja, izmjerene 72 h nakon izrade, kretale su se u intervalu od 3,78 do 7,18. Ove pH vrijednosti su prihvatljive za kozmetičke preparate, a nalaze se u okviru intervala 3,5 – 8,0, koji je prema literaturnim podacima predviđen za kozmetičke preparate koji duže vrijeme ostaju na koži (92, 124). U toku čuvanja kremova, pH vrijednosti svih uzoraka se smanjuju, ali i dalje ostaju u prihvaćenom intervalu. Izraženo u procentima, smanjenje pH vrijednosti polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja (mast i krem), čuvanih na sobnoj temperaturi 3 mjeseca, u odnosu na inicijalne vrijednosti iznosilo je od 2,5% (mast) do 5,3% (krem). Ove male promjene pH vrijednosti kremova i masti, nakon 3 mjeseca čuvanja, idu u prilog dobre hemijske stabilnosti izrađenih uzoraka i njihovu pogodnost za dermatološku primjenu. Stojiljković i sar., (125) su dobili slične rezultate koji su ukazali na opadanje pH vrijednosti tokom 4 nedelje čuvanja kod 3 vrste emulziona sistema (7 – 8,8%).

Kao što je navedeno u istraživanju Tunkay i sar., etarska ulja koja su dodata u formulacijama mogu da dovedu do promjene pH vrijednosti, u zavisnosti od njihove pH vrijednosti (124). Uticaj etarskih ulja na pH vrijednost dermalnih preparata se opisuje i u istraživanju Andonova i sar., (126) u kome pH vrijednost varira od 5,64 do 6,23, u zavisnosti od vrste etarskog ulja koja je dodata u istu podlogu.

Tabela 15. pH vrijednosti kremova i masti sa etarskim uljem smilja

UZORAK	72 H NAKON IZRADE	1 MJESEC NAKON IZRADE	3 MJESECA NAKON IZRADE
Mast sa etarskim uljem smilja	7,18	7,1	7
Krem sa etarskim uljem smilja	3,78	3,69	3,6

4.2.4 Test centrifugiranja

Nakon sprovedenih testova centrifugiranja (2 puta po 15 minuta na 3000 obrt/min) nije dolazilo do razdvajanja faza emulzionog sistema, nakon 6 mjeseci skladištenja od izrade uzoraka. Nakon cikličnih promjena temperature u tri ciklusa (stresni uslovi) u trajanju od 48 h na 45 ± 2 °C, 48 sati na 22 ± 2 °C, 48 sati na 5 ± 2 °C nije došlo do razdvajanja faza niti do promjene u organoleptičkim ili aplikativnim karakteristikama ovih formulacija. Tip formulacija (mast, krem) nije izvršio uticaj na fizičku stabilnost ispitivanih preparata.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđena je zadovoljavajuća fizička stabilnost masti i krema. Literaturni podaci su ustanovili da ova vrsta ispitivanja na efikasan način procjenjuje stabilnost preparata kroz definisane stresne uslove, kako bi se osiguralo da je preparat u preporučenim uslovima skladištenja i roka trajanja bezbjedan i efikasan (127). Stojiljković i sar.,

(125) su testom centrifugiranja na ispitivane emulzije došli do istog zaključka. Ispitani preparati su zadržali svoju strukturu nakon centrifugiranja i nije bilo promjena u njihovim organoleptičkim svojstvima i pH vrijednostima. Adejokun i sar., (128) u svom istraživanju su predstavili ispitivanje stabilnosti polučvrstih preparata sa dodatkom prirodnih ulja. Tokom četiri nedjelje čuvanja svi preparati su pokazali stabilnost nakon dugotrajnog skladištenja. Tokom studije dugoročne stabilnosti (starenje u realnom vremenu) realizovane od Stolić-Jovanović i sar., (96), jedina primjetna promjena dogodila se u dva emulziona sistema koji sadrže lipofilni oblik L-askorbinske kisjeline, koje su promijenile boju iz bijele u svijetložutu nakon četiri mjeseca skladištenja na sobnoj temperaturi.

Naši preparati, iako su sadržali etarsko ulje smilja koje im daje specifičnu žuto-braonkastu boju, nijesu mijenjali karakteristike i boju nakon skladištenja od 6 mjeseci.

4.2.5 Teksturna analiza

Sprovedena teksturna analiza imala je za cilj procjenu promjene tokom čuvanja formulacija (129).

Rezultati dobijeni teksturometrom (na sobnoj temperaturi) prikazani su u Tabeli 16 za mast sa etarskim uljem smilja i u Tabeli 17 za kremu sa etarskim uljem smilja.

Tabela 16. Teksturni parametri ispitivanih masti sa etarskim uljem smilja (podloga *Eucerin*) (sr. vrijednost $\pm$ st. devijacija)

	Jedinice	1	2	3	4	5	Sr. vr.	SD
Čvrstina ciklus 1	N	3,29	3,12	3,41	3,6	3,3	3,34	0,18
Adhezivnost	mJ	8,7	8,3	8,2	8,2	8,1	8,30	0,23
Otpornost	-	0	0,01	0	0	0	0,00	0,00
Čvrstina ciklus 2	N	3,2	3,1	3,41	3,75	3,22	3,34	0,26
Kohezivnost	-	1,1	1,12	1,19	1,22	1,19	1,16	0,05
Elastičnost	mm	4,28	4,31	4,68	4,72	4,66	4,53	0,22

Tabela 17. Teksturni parametri ispitivanih krema sa etarskim uljem (podloga *Ung. Emolliens*) (sr. vrednost $\pm$ st. devijacija)

	Jedinice	1	2	3	4	5	Sr. vr.	SD
Čvrstina ciklus 1	N	2,5	2,51	2,35	2,41	2,62	2,48	0,10
Adhezivnost	mJ	7,9	8,5	7,4	8,2	8,3	8,06	0,43
Otpornost	-	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Čvrstina ciklus 2	N	2,46	2,48	2,47	2,41	2,63	2,49	0,08
Kohezivnost	-	1,09	1,12	1,13	1,1	1,05	1,10	0,03
Elastičnost	mm	4,26	4,17	4,3	4,01	4,04	4,16	0,13

U cilju vršenja analize razlika između dvije grupe korišćen je t-test za nezavisne uzorke. Ovaj test ispituje da li postoji značajna razlika između prosječnih vrijednosti dviju nezavisnih grupa, uzimajući u obzir standardne devijacije i broj uzoraka.

Na osnovu dobijenih p-vrijednosti, donose se sljedeći zaključci:

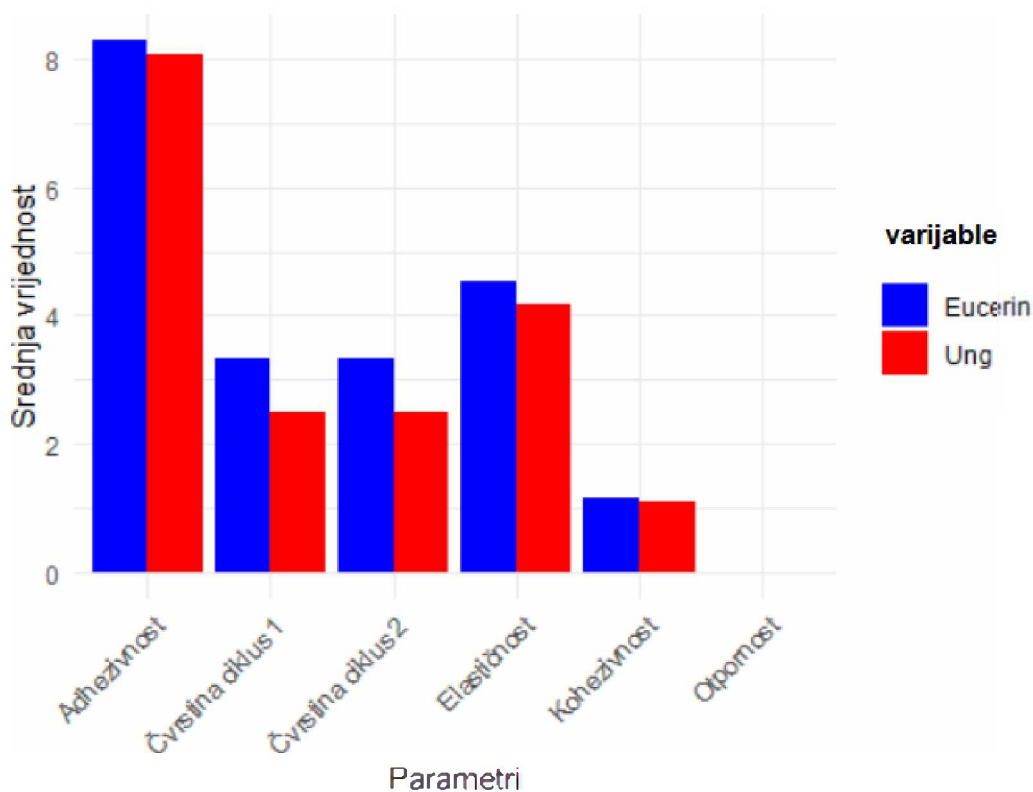
1. Čvrstina ciklus 1 – p-vrijednost (6.68×10^{-5}) je manja od 0.05, što znači da postoji statistički značajna razlika u pogledu ove karakteristike kod dvije podloge.
2. Adhezivnost – p-vrijednost (0.312) je veća od 0.05, što znači da nema statistički značajne razlike između dvije podloge u pogledu adhezivnosti.
3. Čvrstina ciklus 2 – p-vrijednost (0.0011) je manja od 0.05, što ukazuje na značajnu razliku između dviju podloga.
4. Kohezivnost – p-vrijednost (0.057) je malo veća od 0.05, što znači da razlika nije značajna na standardnom nivou od 5%, ali bi mogla biti značajna na nivou od 10%.
5. Elastičnost – p-vrijednost (0.0159) je manja od 0.05, što ukazuje na značajnu razliku između podloga.

Na osnovu izvršene analize može se zaključiti da postoje statistički značajne razlike između dvije podloge za čvrstinu ciklusa 1 i 2, kao i za elastičnost, dok za adhezivnost i kohezivnost razlike nijesu značajne. Otpornost nije mogla biti adekvatno analizirana zbog specifične prirode podataka.

Upoređivanje parametara je prikazano u histogramu (Slika 13).

Čvrstoća tokom ciklusa 1 predstavljala je maksimalnu silu prvog ciklusa kompresije, dok je čvrstoća tokom ciklusa 2 odgovarala drugom piku sile. Analiza čvrstine pokazala je da mast sa etarskim uljem smilja ima višu početnu vrijednost čvrstine (sr. vrijednost $\approx 3,34$ N) u odnosu na kremu sa etarskim uljem smilja (sr. vrijednost $\approx 2,48$ N), što ukazuje na gušću i kompaktiniju strukturu masti. Tokom čuvanja, čvrstina obje formulacije su ostale relativno stabilne, uz minimalne fluktuacije između ciklusa mjerenja, što sugerise dobru fizičku stabilnost. Veća čvrstina masti može biti prednost u smislu očuvanja oblika i sporijeg oslobađanja aktivnih supstanci, dok niža čvrstina kreme omogućava lakšu razmazivost i bolju primjenu na koži. Stoga, izbor optimalne formulacije zavisi od željenog efekta: mast pruža stabilniju i čvršću strukturu, dok krema nudi bolju razmazivost i korisničku prihvatljivost. Rezultati su pokazali da se mast sa etarskim uljem smilja teže širi od krema sa etarskim uljem smilja.

U istraživanjima Stolić-Jovanović i sar., (94, 96) Andonova i sar., (126) primijećeno je da nema značajnih razlika u čvrstoći između prvog i drugog ciklusa testa. Ovo ukazuje na stabilnost formulacija, što je pozitivan indikator da su strukture masti i krema dobro očuvane kroz cikluse testiranja, što je važno za dugoročnu primjenu. Smilje, kao etarsko ulje, može imati slične efekte na stabilnost i moglo bi se očekivati da dodatak etarskog ulja ne narušava strukturu proizvoda, s obzirom na stabilnost koje masti i kremovi pokazuju u tim studijama.



Slika 13. Upoređivanje teksturnih parametara kod masti i kremova sa etarskim uljem smilja

Analiza adhezivnosti pokazala je da mast sa etarskim uljem smilja ima nešto veću vrijednost ($\approx 8,30$ mJ) u odnosu na kremu ($\approx 8,06$ mJ), što ukazuje na bolju sposobnost masti da ostane na koži nakon nanošenja. Rezultati su ukazivali na veće srednje vrijednosti adhezivnosti kod masti nego krema $8,3 \text{ mJ} > 8,06 \text{ mJ}$. Masti, s obzirom na veći sadržaj lipida, imaju veću adhezivnost i duže ostaju na koži. Ovo je povezano sa njihovom gušćom konzistencijom, što je korisno kod tretmana suve kože. Slične zaključke doneli su i Stolić-Jovanović i sar., (94) koji su otkrili da preparat sa većim sadržajem lipida, ima veću adhezivnost. U kontekstu smilja, etarsko ulje smilja, kao biljni dodatak, može doprinijeti povećanoj adhezivnosti u formulacijama, ali bi vjerovatno uticalo na brzinu apsorpcije s obzirom na svoje lipofilne osobine.

Elastičnost masti ($\approx 4,53$ mm) je takođe nešto viša nego kod kreme ($\approx 4,16$ mm), sugerišući bolju sposobnost formulacije da povрати svoj oblik nakon deformacije, što je indikativno za stabilniju teksturu. Kohezivnost obje formulacije pokazuje minimalne varijacije (mast $\approx 1,16$; krema $\approx 1,10$), što potvrđuje dobru unutrašnju stabilnost i homogenost proizvoda.

Ukupno, mast sa etarskim uljem smilja pokazuje nešto veće vrijednosti fizičkih parametara, što ukazuje na čvršću i stabilniju strukturu, dok krema, sa nešto nižim vrijednostima, omogućava lakšu razmazivost i praktičniju primjenu na koži.

Rezultati koji se odnose na parametar otpornosti, pokazali su da masti i kreme sa etarskim uljima smilja imaju nisku otpornost (0 i 0,01), što ukazuje na formulacije koje se brzo apsorbiraju i ostavljaju mekši osjećaj na koži. Ova osobina može biti poželjna za proizvode koji su dizajnirani tako da se brzo upijaju i koji ne ostavljaju težak osjećaj na koži, kao što je slučaj sa preparatima koji se koriste za njegu kože koja ne zahtijeva dugotrajnu zaštitu od spoljašnjeg uticaja. Takođe, Andonova i sar., (126) navode sličnosti sa preparatima sa biljnim uljem, koji takođe, imaju nisku otpornost. Smilje može imati slične efekte, s obzirom na to da etarska ulja često omogućavaju brže upijanje i manju otpornost na koži.

Poređenjem rezultata ispitivanja dejstva smilja sa ostalim uljima koja su testirana u različitim studijama, poput biljnog ulja u studiji Andonova i sar., (126) – otkriveno je da etarska ulja, uključujući i smilje, mogu doprinjeti bržem upijanju preparata prvenstveno zbog svoje lipofilnosti, što povećava adhezivnost, ali istovremeno smanjuje otpornost na koži. Kreme sa dodatkom etarskih ulja često su dizajnirane tako da omogućavaju brzu apsorpciju i lako nanošenje, dok masti koje sadrže veći udio lipida pružaju dugotrajniji efekat adhezije, što je od koristi kada je riječ o tretmanima za suhu kožu.

Smilje, kao etarsko ulje, može imati sličan uticaj na formulacije, što znači da njegova primjena može poboljšati adhezivnost i skratiti vrijeme apsorpcije, ali uz nižu otpornost na koži, što je kompatibilno sa ciljevima formulisanja preparata koji se brzo upijaju i ne ostavljaju teže tragove na koži.

Zapažen je veći stepen kohezivnosti masti sa etarskim uljem smilja (1, 16) u odnosu na kreme sa etarskim uljem smilja (1, 10), što ukazuje na jače unutrašnje veze u mastima. Ovo može biti povezano sa većim udjelom masne faze u mastima, što doprinosi stabilnosti proizvoda i smanjuje mogućnost odvajanja komponenti tokom vremena. Uzorak sa podlogom *Eucerin* bio je stabilniji i manje sklon odvajanjima, dok je uzorak sa podlogom *Ung. Emolliens* imao nešto nižu kohezivnost.

Andonova i sar., (126) takođe, potvrđuju da se dodavanjem biljnih ulja u kreme povećava kohezivnost, što je u skladu i sa našim rezultatima. Uvođenjem biljnog ulja u formulacije, kao što je slučaj sa kremama koje smo testirali, povećava se kohezivnost zbog bolje povezanosti

sastojaka unutar samog proizvoda. Ova činjenica govori u prilog tome da upravo sastav igra ključnu ulogu u uspostavljanju stabilnosti proizvoda kao i njegovim unutrašnjim vezama, naročito kad je riječ o lipidima. Slično tome, Lukić i sar., (130) su pružili iscrpno objašnjenje o tome kako proizvodi sa bogatijom masnom fazom, kao što su oni sa maslinovim uljem, imaju bolje teksturne karakteristike (uključujući i kohezivnost).

Uočeno je da je elastičnost masti sa etarskim uljem smilja (4,53 mm) bila veća u odnosu na elastičnost krema sa etarskim uljem smilja (4,16 mm), što upućuje na činjenicu da mast ima bolji oporavak nakon deformacije, kao i nešto veću varijabilnost u vrijednostima. Rezultati Lukića i sar., (130) potvrđuju da preparati sa bogatijom masnom fazom, kao što su oni sa maslinovim uljem, pokazuju bolje teksturne karakteristike u pogledu čvrstoće i elastičnosti. Sličan trend je zabilježen u našem istraživanju, u kome je mast (bogatija masnim komponentama) pokazivala veću elastičnost nego krema. Elastičnost je važan parametar, jer ukazuje na sposobnost proizvoda da se oporavi nakon nanošenja i deformacije, što je od posebnog značaja u formulacijama koje bi trebalo ostaviti na koži duže vrijeme, kao što su masti sa etarskim uljem smilja.

Masti sa etarskim uljem smilja, s obzirom na veću čvrstoću, pokazivale su i veće vrijednosti adhezivnosti. Ovo je očekivano, jer jača struktura masti (koja ima više lipida) ostvaruje bolju povezanost sa kožom, omogućavajući da proizvod ostane duže na površini kože, što je korisno za tretmane suve kože.

McMullen i sar., (131) su takođe, naglasili činjenicu da preparati sa višim sadržajem masne faze imaju izraženiju čvrstinu i adhezivnost, što je u skladu i sa našim rezultatima. Ovakva interpretacija navodi na zaključak da masti, koje imaju veću masnu fazu, generalno imaju i jaču strukturu i bolju adhezivnost u poređenju sa kremama ili losionima koji sadrže više vode i manji udio lipida.

Otpornost proizvoda može biti povezana sa njihovom čvrstoćom i kohezivnošću. Masti, sa većim udjelom lipida i gušćom strukturom, obično izražavaju veću otpornost na spoljne uticaje, dok kremovi, koje imaju veći udio vode, mogu biti podložniji brzom otapanju ili promjenama u strukturi u momentima izlaganja spoljnim faktorima.

Naši rezultati su u velikoj mjeri usklađeni sa prethodnim studijama. Masti sa etarskim uljem smilja, zbog svog bogatijeg sastava u masnoj fazi, pokazuju veću kohezivnost, elastičnost, čvrstoću i adhezivnost u poređenju sa kremovima sa etarskim uljem smilja.

Ovo je u skladu sa opštim trendovima u literaturi koji ističu da preparati sa bogatijim sastavom masnih faza (poput masti) imaju izraženije teksturne karakteristike. Takođe, važno je napomenuti da sastav osnovne podloge, kao što su *Eucerin* ili *Ung. Emolliens*, igra ključnu ulogu u stabilnosti i ponašanju ovih proizvoda na koži, što dodatno potvrđuje stabilnost i efektivnost formulacija koje smo testirali.

Na osnovu naših rezultata i poređenja sa literaturnim podacima, možemo zaključiti da su oba preparata (mast i krem sa etarskim uljem smilja) u skladu sa opštim trendovima u formulaciji kozmetičkih proizvoda. Mast, zbog većeg udjela lipida, pokazuje povećane vrijednosti čvrstine, adhezivnosti, kohezivnosti i elastičnosti, što je pogodnije za sporije oslobađanje aktivnih supstanci i očuvanje oblika tokom primjene. S druge strane, krema, koja sadrži veći udio vode, omogućava lakšu razmazivost, praktičniju primjenu na koži i ugodniji, mekši osjećaj, uz bržu apsorpciju, ali pokazuje niže vrijednosti navedenih teksturnih parametara. Razlike između masti sa *Eucerin* podlogom i krema sa *Ung. Emolliens* ukazuju na to da osnovna podloga ima ključnu ulogu u stabilnosti, kohezivnosti i ponašanju preparata na koži (130,131).

4.2.6 Senzorna procjena ispitivanih uzoraka

Rezultati senzorne procjene ispitivanih uzoraka su prikazani u Tabeli 18. Pošto su ispitivani uzorci bili mast i lipofilni krem, između kojih nijesu zabilježene značajne razlike u pogledu samog sastava, bilo je očekivano da određene senzorne karakteristike (kao što su sjaj, masnoća i rezidualni film) budu slične. Rezultati dobijeni na osnovu podataka o senzornim atributima ocijenjeni su opisnim terminima (koji su unaprijed definisani za svaki pojedinačni atribut). Ispitanici su obučeni da opišu konzistenciju uzorka prije utrljavanja i kao rezultat – svi uzorci su ocijenjeni kao polučvrsti. Pored navedenog atributa, još jedan senzorni atribut koji je procjenjivan od strane panelista tokom faze uzimanja proizvoda, a koji se dovodi u direktnu vezu sa konzistencijom, jeste tekstura. Najveći broj panelista (14) je izabralo formulu 2 (krem sa etarskim uljem smilja) kao poželjniju varijantu koja izaziva priyatniji osjećaj na koži. Svaki prikazani atribut je opisan predstavljenim terminom od strane više od 50% ispitanika (mast sa etarskim uljem smilja – AM, krem sa etarskim uljem smilja – AK).

Tabela 18. Kvantitativni rezultati senzorne procjene ispitivanih uzoraka – senzorne karakteristike za koje su korišćeni opisni termini

FAZA PRIMJENE	SENZORNA KARAKTERISTIKA	AM	AK
Prije utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija	Polučvrst (100%)	Polučvrst (100%)
	Sjaj	Veoma sjajan (63%)	Sjajan (82%)
Tokom utrljavanja	Razmazivost	Lako se razmazuje (60%)	Lako se razmazuje (81%)
	Ljepljivost	Blago ljepljiv (71%)	Nije ljepljiv (85%)
	Gustina	Gust (85%)	Gust (74%)
	Masnoća	Mastan (86%)	Blago mastan (76%)
	Sjaj	Sjajan (88%)	Blago sjajan (70%)
Osjećaj nakon nanošenja	Rezidualni film	Izražen film (85%)	Umjeren film (70%)
	Ljepljivost	Blago ljepljiva (65%)	Nije ljepljiva (82%)
	Masnoća	Blago mastan (61%)	Blago mastan (71%)
	Sjaj	Sjajan (81%)	Blago sjajan (72%)

Subjektivno ocjenjivanje preparata prema njihovim senzornim karakteristikama može se povezati i korelirati sa teksturnom analizom uzoraka. Oba preparata su se razmazivala sa lakoćom. Zbog svoje dominantne masne faze, mast sa etarskim uljem smilja je bila masnija, blago ljepljiva i nakon nanošenja na koži ostavljala je izražen film. Krem sa etarskim uljem smilja, zbog sadržaja masne i vodene faze u svom sastavu, prema procjeni ispitanika je bio prijatniji za kožu, nije bio ljepljiv i ostavljao je umjeren film nakon nanošenja na koži.

Svi uzorci su ocijenjeni kao polučvrsti, što ukazuje na stabilnost i strukturu proizvoda prije nego što su utrljani na kožu. Krem sa etarskim uljem smilja, panelisti su ocijenili kao prijatniji na koži, dok je mast ostavila izraženiji film, bila masnija i blago ljepljiva. Ove karakteristike upućuju na zaključak da je formulacija masti gušća, s naglašenim lipofilnim karakteristikama, dok krem, sa udjelom masne i vodene faze, pruža lakši osjećaj na koži.

Poređenjem sa literaturnim podacima, prikupljenim na osnovu studije koju su sproveli Tadić i sar., (123), a koja istražuje emulgelove i kremove sa etarskim uljem smilja, izvedeni su rezultati senzorne analize koji ukazuju na blagi sjaj kože i umjereni film, ali bez osjećaja masnoće, što se može uporediti sa rezultatima naše studije koji se odnose na krem. Sličan efekat je zabilježen i u studiji koju su sproveli Lukić i sar., (130) u kojoj je krem sa maslinovim uljem ispoljio senzorne karakteristike koje su u velikoj mjeri slične kremovima sa etarskim uljem smilja (blagi sjaj ili biserni sjaj). Ova upotreba masnih i vodenih faza u formulacijama kreme obezbjeđuje prijatan osjećaj na koži, dok je mast sa etarskim uljem smilja opisana kao gušća i masnija, što je u skladu sa većim udjelom lipida u njenoj formulaciji.

Mast sa etarskim uljem smilja ostavlja izražen film, dok krem ostavlja umjereni film. Ovo je svojevrsna potvrda toga da mast, sa većim sadržajem lipida, formira deblji sloj na koži koji ima tendenciju da duže traje. Sa druge strane, krem karakteriše lakša razmazivost i manja adhezivnost, što je vjerovatno rezultat postojećeg balansa između masne i vodene faze.

Poređenjem sa literaturnim podacima prikupljenim tokom istraživanja koje su obavili Tadić i sar., (123) evidentirano je da emulgelovi (koji obično imaju manji udio lipida) ne ostavljaju osjećaj masnoće, dok je kod kreme primjetan blagi film, što je slično rezultatima naših testiranja za krem sa etarskim uljem smilja. Takođe, Lukić i sar., (130) su ustanovili da preparati sa maslinovim uljem, koji imaju bogatiju masnu fazu, ostavljaju izrazitiji film, što je uporedivo sa našim rezultatima za masti sa etarskim uljem smilja.

Oba preparata su se lako razmazivala, ali mast je bila masnija i ljepljivija, dok je krem prijatniji za kožu, nije bio ljepljiv, i ostavljao je umjereni film. Mast sa etarskim uljem smilja pruža bogatiji, masniji osećaj na koži, dok krem ima lakšu teksturu, što je tipično za proizvode koji sadrže veći udio vode.

Veći broj panelista je preferirao krem sa etarskim uljem smilja, vjerovatno zbog toga što ostavlja prijatniji osjećaj na koži, dok je mast bila manje popularna zbog izraženijeg filma i ljepljivosti. Na ovaj način je utvrđeno da formulacije sa većim udjelom lipida (kao što je mast) mogu biti manje poželjne za korisnike koji preferiraju laganije proizvode.

Senzorne karakteristike izrađene kreme sa etarskim uljem smilja su slične onima koje su prezentovane u studijama koje su ispitivale kreme sa biljnim uljima (jojoba, maslinovo ulje) i sintetskim uljima (parafinsko ulje, izocetil palmitat). Kreme sa biljnim uljima, kao i kreme sa

etarskim uljem smilja, pružaju umjereni film, nijesu ljepljive i imaju blagi sjaj. Ovakav rezultat sličan je rezultatima studija koje su obavili Lukić i sar., (130) i Andonov i sar., (126).

Rezultati studije sprovedene od strane Ali i sar., (132), u kojoj su panelisti su naveli da kreme sa biljnim uljima (poput ulja jojobe i repice) daju prijatan osjećaj na koži, ne ostavljaju osjećaj ljepljivosti i imaju blagi film, slični su našim rezultatima u vezi sa senzornim karakteristikama izrađenih krema. U poređenju sa sintetičkim uljima (kao što je tečni parafin), kreme sa biljnim uljima pružaju lakši osjećaj na koži, s manjim filmom i boljim prijemom, što je povezano sa našim rezultatima o tome da je krema sa etarskim uljem smilja bila prijatnija za kožu i lakša za upotrebu.

Rezultati senzorne procjene za mast i kremu sa etarskim uljem smilja potvrđuju da formulacija preparata direktno utiče na njihove senzorne karakteristike i na preferencije korisnika. S obzirom na upoređivanje sa sličnim studijama, naši rezultati pokazuju da mast, sa većim udjelom lipida, ima izraženiji film, pruža masniji i ljepljiviji osjećaj, dok krema, sa balansiranim sadržajem masne i vodene faze, ostavlja lakši, prijatniji osjećaj sa umjerenim filmom. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da prisustvo biljnih ulja u formulaciji može povećati gustoću i masnoću proizvoda, što utiče na njegovu teksturu i senzorne karakteristike.

Da bi imali kompletan senzorni profil, posebno kada imamo slične preparate, ova vrsta analize svakako je metoda izbora. Rezultati teksturne i senzorne analize pokazuju da postoji direktna korelacija između analize teksture i senzornih karakteristika. Senzorni profil kozmetičkih proizvoda može se predvidjeti na osnovu instrumentalnih mjerenja. Interpretacijom dobijenih rezultata, izveden je zaključak da bi se podaci generisani na osnovu teksturne analize – mogli koristiti u formulaciji kozmetičkog proizvoda i mogli bi unaprijed definisati senzorne karakteristike preparata.

4.3 Mikrobiološki kvalitet ispitanih formulacija

Rezultati mikrobiološke analize su prikazani u Tabeli 19 i 20.

Tabela 19. Mikrobiološka analiza masti sa etarskim uljem smilja

R. broj	Parametri ispitivanja	Jedinica mjere	Rezultat ispitivanja
1.	<i>Escherichia coli</i>	0,1	nije nađena
2.	Kvasnice i plijesni	1	< 10
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1	nije nađena
4.	<i>Proteus spp.</i>	0,1	nije nađena
5.	Broj živih bakterija kontaminenata	1	< 100
6.	Koagulaza pozitivan stafilokok	0,1	nije nađena

Tabela 20. Mikrobiološka analiza kreme sa etarskim uljem smilja

R. broj	Parametri ispitivanja	Jedinica mjere	Rezultat ispitivanja
1.	<i>Escherichia coli</i>	0,1	nije nađena
2.	Kvasnice i plijesni	1	< 10
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1	nije nađena
4.	<i>Proteus spp.</i>	0,1	nije nađena
5.	Broj živih bakterija kontaminenata	1	< 100
6.	Koagulaza pozitivan stafilokok	0,1	nije nađena

Na osnovu navedenih mikrobioloških ispitivanja, ispitivani uzorak odgovara uslovima člana 106. Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet („Službeni list Crne Gore“, br. 004/15) (107).

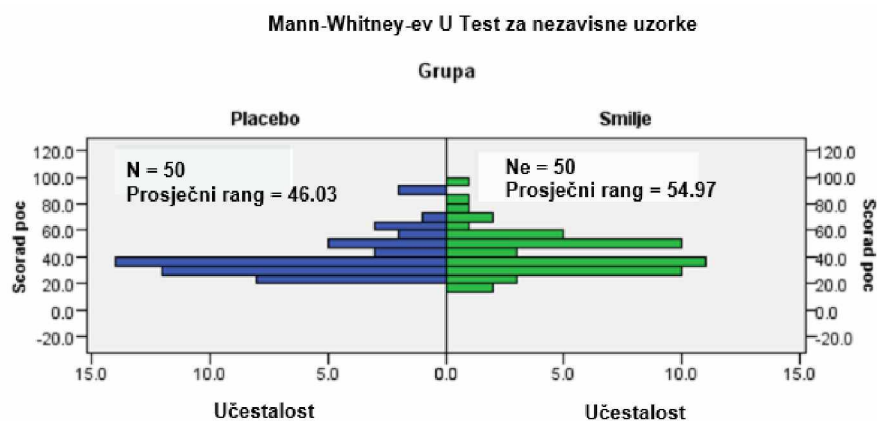
4.4 Rezultati i diskusija IV faze eksperimentalnog rada

4.4.1 Statistička obrada podataka *in vivo* ispitivanja

Za upoređivanje efikasnosti između dvije grupe smo koristili *Mann-Whitney*-ev test. Ovaj test se izvodio tako što su se prikupljali podaci za dvije grupe koje smo uporedili: za I grupu koja je koristila placebo (samo podlogu) i II grupu koja je koristila preparat sa smiljem. Podatke smo rangirali, a zatim smo uporedili zbirne rangove za svaku grupu.

Na osnovu ovih rangova smo izračunali U statistiku, koja se koristila da bi se dobila p-vrijednost. U cilju dalje interpretacije i obrade datih rezultata, bilo je neophodno postaviti odgovarajuće hipoteze:

- Nulta hipoteza (H_0): Nema razlike između dvije grupe.
- Alternativna hipoteza (H_1): Postoji statistički značajna razlika između dvije grupe.



Ukupan broj	100
Mann-Whitney U Test	1,026.500
Wilcoxon-ov test	2,301.500
Test statistika	1,026.500
Standardna greška	145.025
Standardizovani test statistika	-1.541
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	.123

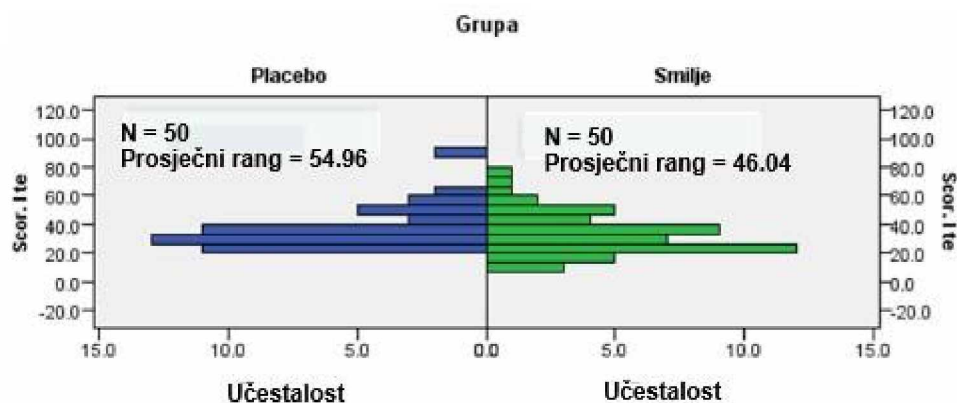
Slika 14. Mann-Whitney-ev test za SCORAD (početno stanje).

4.4.1.1 Hipoteza 1: Ulje smilja sadrži bioaktivne supstance sa antiinflamatornim djelovanjem

- Mann Whitney-ev test, koji smo koristili za poređenje između placebo grupe i grupe tretirane smiljem, pružio je uvid u razlike između tih grupa (Slika 14).

Početno stanje između placebo i smilja nije pokazalo statistički značajnu razliku ($p = 0.123 > 0.05$), što ukazuje na to da u početku, nakon 7 dana primjene, nije bilo razlike između dvije grupe.

Mann-Whitney-ev U Test za nezavisne uzorke



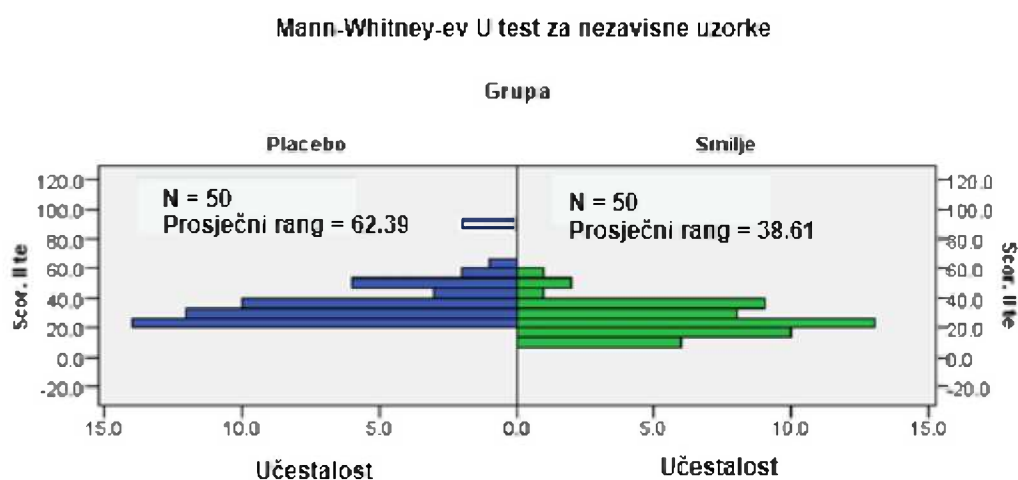
Ukupan broj	100
Mann-Whitney-ev test	1,473.000
Wilcoxon-ov test	2,748.000
Test statistika	1,473.000
Standardna greška	145.018
Standardizovani test statistika	1.538
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	.124

Slika 15. Mann-Whitney-ev test za SCORAD (I kontrola)

Na osnovu prikazanog rezultata za Mann-Whitney-ev test za I kontrolu (nakon 7 dana) (Slika 15):

- P-vrijednost (*Asymptotic Sig. (2-sided test)*) iznosi 0,124, što je veće od 0,05. Dakle, zahvaljujući ovom testu utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike između placebo grupe i grupe tretirane smiljem nakon sedmodnevnog intervala.
- Srednje vrijednosti rangova pokazivale su da je placebo grupa imala viši prosječan rang (54,96) u poređenju sa grupom koja je koristila smilje (46,04), ali ta razlika nije bila dovoljno velika da bi bila statistički značajna.

Iako su postojale razlike u prosječnim rangovima između placebo grupe i grupe tretirane smiljem, p-vrijednost pokazala je da te razlike nijesu dovoljno izražene da bi se smatrale statistički značajnim nakon 7 dana tretmana. Ovo je moglo značiti da smilje možda nije dovoljno efikasno u toj vremenskoj tački.



Ukupan broj	100
Mann-Whitney-ev test	1,844.500
Wilcoxon-ov test	3,119.500
T test statistika	1,844.500
Standardna greška	145.029
Standardizovani test statistika	4.099
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	.000

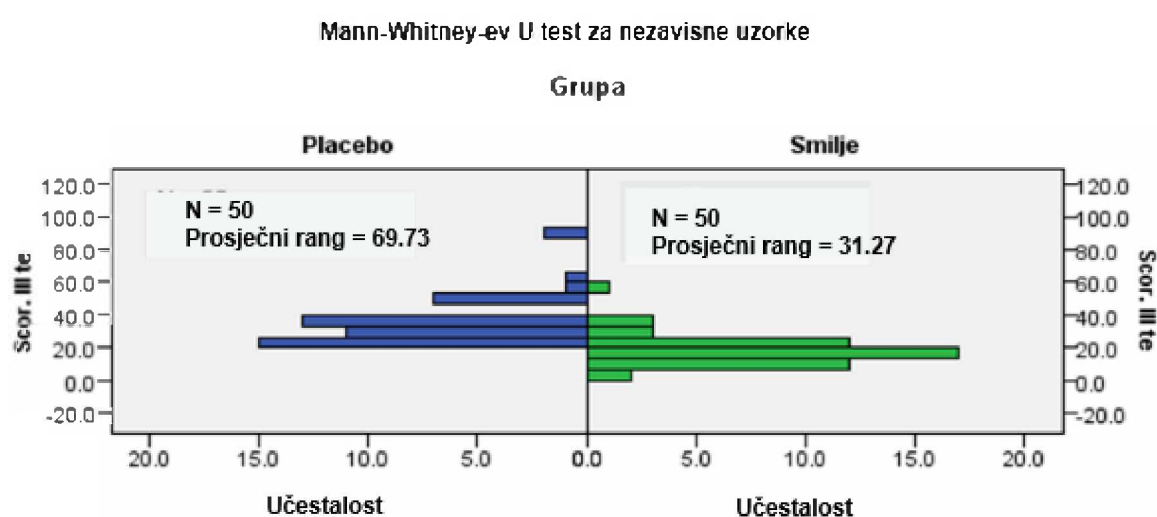
Slika 16. Mann-Whitney-ev test za SCORAD (II kontrola)

Na osnovu prikazanih rezultata Mann Whitney-evog testa za II kontrolu (nakon 14 dana) (Slika 16):

–P-vrijednost (*Asymptotic Sig. (2-sided test)*) je manja od 0.001. Ovo govori u prilog postojanju statistički značajne razlike između placebo grupe i grupe tretirane smiljem nakon 14 dana.

– Srednji rangovi pokazivali su da je placebo grupa imala viši prosječni rang (62,39) u poređenju s grupom tretiranom smiljem (38,61). Ovo navodi na zaključak da je smilje prema SCORAD indeksu proizvelo efekat smanjenja upale ili simptoma kod tretiranih pacijenata u odnosu na placebo.

Za razliku od I kontrole, u II kontroli (nakon 14 dana), smilje je ispoljavalo statistički značajan efekat. Na ovaj način podržana je hipoteza o tome da smilje sadrži bioaktivne supstance sa antiinflamatornim djelovanjem, kao i da preparati koji sadrže smilje pokazuju visok stepen efikasnosti u tretiranju upalnih procesa na koži, barem nakon 14 dana tretmana.



Ukupan broj	100
Mann-Whitney-ev test	2,211.500
Wilcoxon-ov test	3,486.500
T test statistika	2,211.600
Standardna greška	145.029
Standardizovani test statistika	6.630
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	.000

Slika 17. Mann-Whitney-ev test za SCORAD (III kontrola)

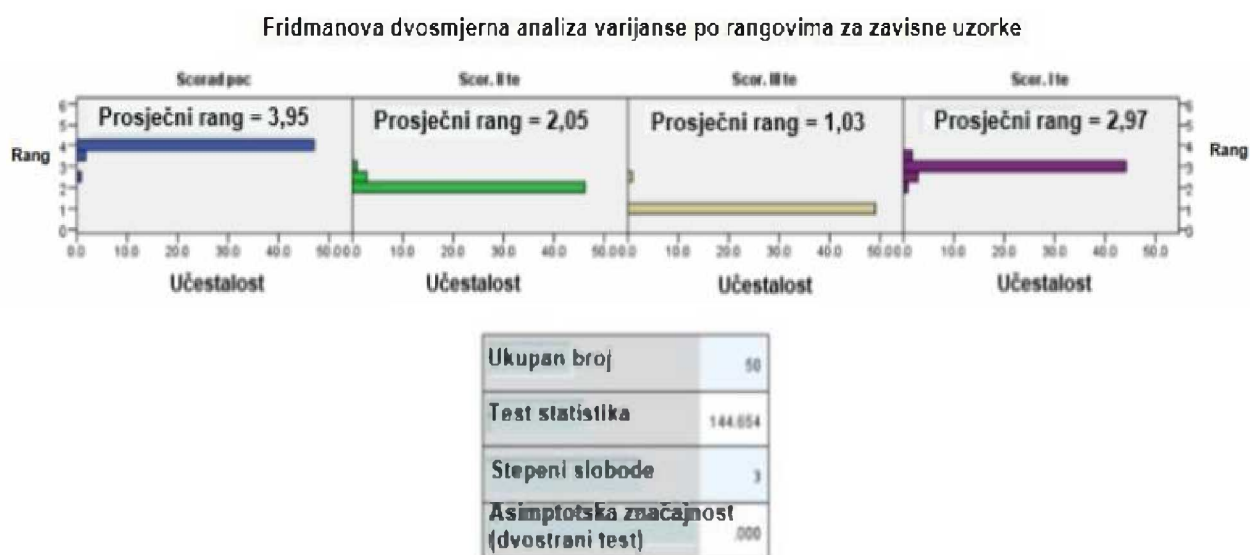
Na osnovu rezultata Mann-Whitney-evog testa za III kontrolu (nakon 21 dana) (Slika 17) zaključeno je sljedeće:

– P -vrijednost (*Asymptotic Sig. (2-sided test)*) je značajno ispod praga od 0,05. Ovo govori u prilog tome da je uočena statistički značajna razlika između placebo grupe i grupe tretirane smiljem nakon 21 dana.

- Srednji rangovi pokazivali su da je placebo grupa imala znatno viši prosječni rang (69,73) u poređenju s grupom tretiranom smiljem (31,27). Ovim rezultatima predloženo je da je smilje značajno smanjilo simptome ili upalne procese u odnosu na placebo nakon 21 dana.

Rezultati za III kontrolu su potvrdili da je smilje imalo snažan antiinflamatorni efekat, kao i da preparati sa smiljem značajno djeluju na smanjenje upalnih procesa na koži tokom dužeg vremenskog perioda. Ovaj statistički značajan efekat nakon 21 dana tretmana dodatno podržava hipoteze o efikasnosti smilja u topikalnim farmaceutskim preparatima.

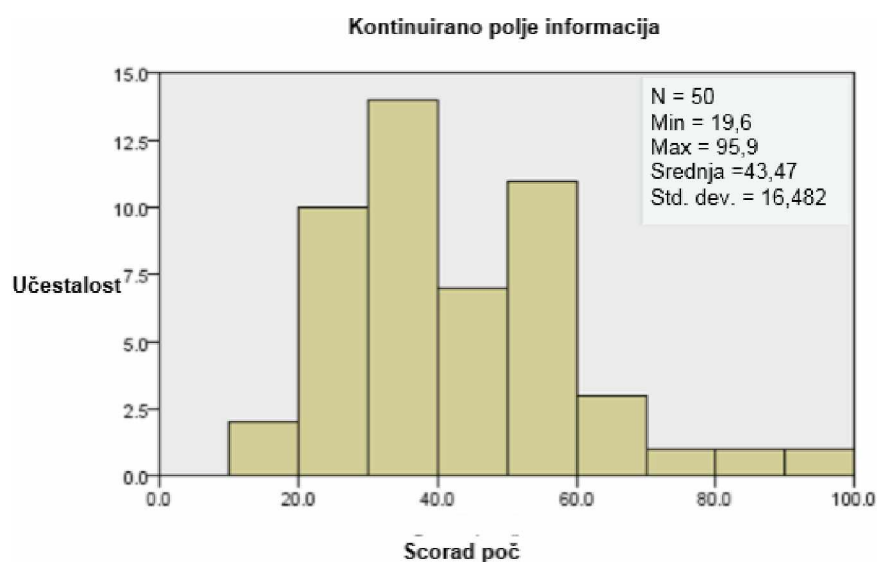
4.4.1.2 Hipoteza 2: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja ispoljavaju antiinflamatorni efekat kod zapaljenskih procesa kože.



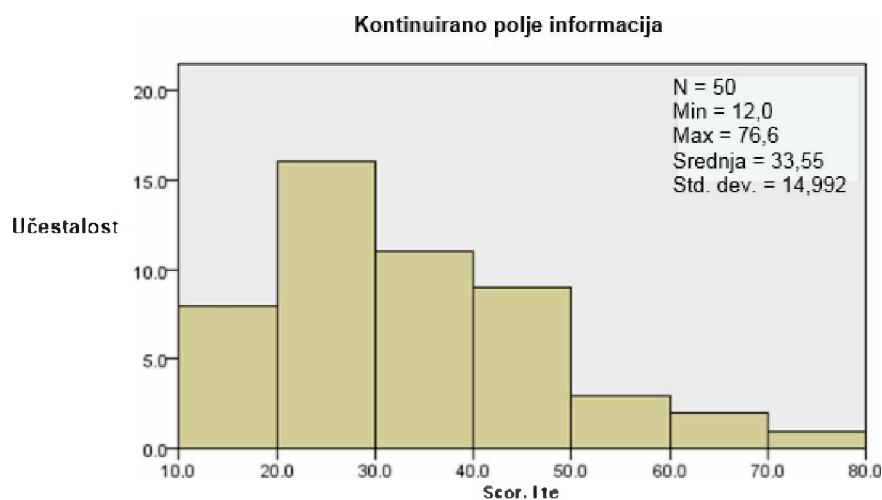
Slika 18. Fridmanov test za upoređivanje početnog stanja i I, II i III kontrole (smilje)

Za upoređivanje početnog stanja, I, II i III kontrole, koristili smo Fridmanov test (Slika 18), ali i za upoređivanje početnog stanja pacijenata i promjena na svakoj kontroli (I, II i III kontrola).

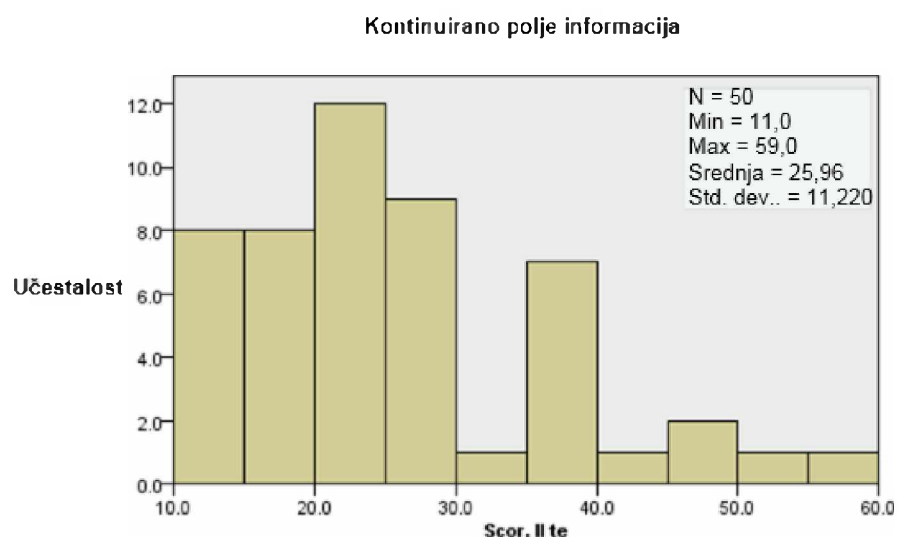
4.4.1.3 Fridmanov test za ispitanike koji su koristili preparate sa smiljem



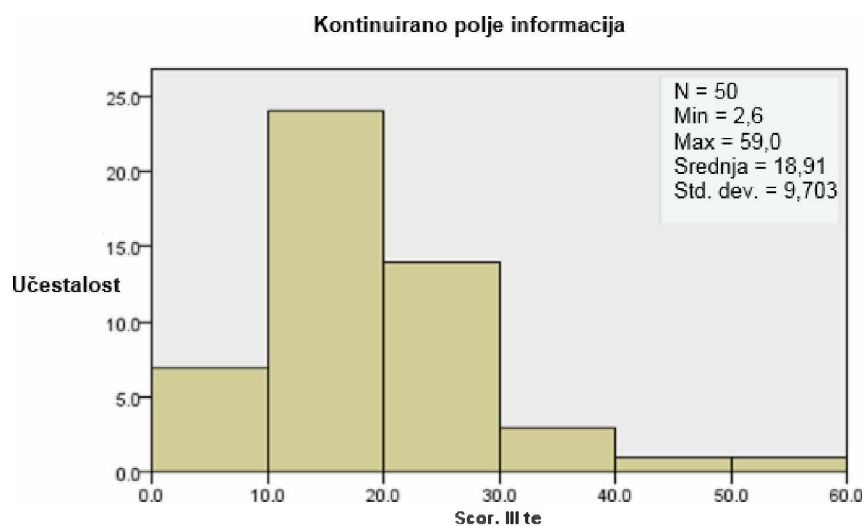
Slika 19. Fridmanov test za smilje – SCORAD (početno stanje)



Slika 20. Fridmanov test za smilje – SCORAD (I kontrola)

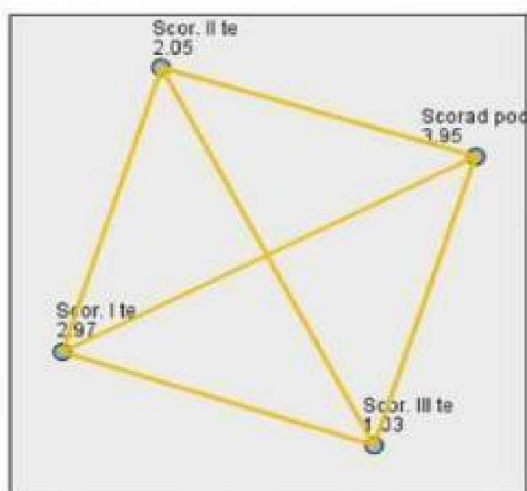


Slika 21. Fridmanov test za smilje – SCORAD II kontrola.



Slika 22. Fridmanov test za smilje – SCORAD (III kontrola).

Poređenje u parovima



Svaki čvor prikazuje prosječni rang uzorka.

Uzorak 1 - Uzorak 2	Test statistika	Std. greška	Std. test statistika	Znač.	Pod. znač.
Scor. III te-Scor. II te	1.020	.258	3.950	.000	.000
Scor. III te-Scor. I te	-1.940	.258	-7.514	.000	.000
Scor. III te-Scorad poc	2.920	.258	11.309	.000	.000
Scor. II te-Scor. I te	-.920	.258	-3.563	.000	.002
Scor. II te-Scorad poc	1.900	.258	7.359	.000	.000
Scor. I te-Scorad poc	.980	.258	3.796	.000	.001

U svakoj koloni testirana je nulta hipoteza o istoj distribuciji u okviru Uzorka 1 i Uzorka 2.

Prikazane su asimptotske značajnosti (dvostраниh testova). Nivo značajnosti je: 0.05.

p-vrednosti su podešene na osnovu metoda Bonferroni korekcije za višestruke testove.

Slika 23. Fridmanov test za upoređivanje preparata sa smiljem (početno stanje, I, II i III kontrola)

Na osnovu predstavljenih rezultata Fridmanovog testa za smilje, koji je upoređivao početno stanje, I, II i III kontrolu, izvršena je naredna interpretacija prikupljenih podataka:

1. Fridmanov test je pokazivao značajne razlike u rangovima između početnog stanja i kontrola (Slika 22), sa $p < 0.001$, što je ukazalo na činjenicu da postoji statistički značajna razlika između rezultata u različitim vremenskim tačkama (početno stanje, I, II, i III kontrola).

2. Prosječni rangovi:

- Početno stanje (Scorad poč.): Prosječni rang je 3,95.
- I kontrola (Scorad I t.e.): Prosječni rang je 2,97.
- II kontrola (Scorad II t.e.): Prosječni rang je 2,05.
- III kontrola (Scorad III t.e.): Prosječni rang je 1,03.

Ovim rezultatima dato je objašnjenje u vezi sa primjenom tretmana smilja posredstvom kojeg su se upalni procesi značajno smanjivali sa svakom narednom kontrolom, što se moglo zapaziti na osnovu smanjenja prosječnih rangova tokom vremena.

Sva poređenja između različitih kontrola (kao što su Scorad poč. vs. Scor I t.e., Scor I t.e. vs. Scor II t.e., itd.) bila su statistički značajna, sa p-vrijednostima 0,000 ili 0,001, što je ukazivalo na dosljedan pad simptoma tokom svake kontrole.

Rezultati Fridmanovog testa su potvrdili da smilje ima značajan farmakološki efekat u pogledu smanjenja upalnih procesa na koži. Tretman smiljem je dovodio do postepenog poboljšanja kroz vrijeme, što podržava hipotezu 2 o tome da topikalni preparati sa smiljem imaju pozitivan uticaj na inflamatorne procese na koži.

Na osnovu histogram prikaza za različite kontrole i početno stanje, moglo se vidjeti sljedeće:

1. Scorad poč. (početno stanje) (Slika 18):

- Vrijednosti su distribuirane između 19,6 i 95,9, s prosjekom od 43,47 i standardnom devijacijom od 16,482.
- Histogram pokazuje da je većina pacijenata imala početne vrijednosti između 30 i 50, što sugerše umjeren do visok nivo upale registrovane na početku istraživanja.

2. Scor I t.e. (nakon 7 dana) (Slika 19):

- Vrijednosti su između 12,0 i 76,6, s prosjekom od 33,55 i standardnom devijacijom od 14,992.
- Ovaj histogram pokazivao je pomak distribucije ka nižim vrijednostima, što sugerše smanjenje simptoma nakon prve kontrole.

3. Scor II t.e. (nakon 14 dana) (Slika 20):

- Vrijednosti su bile između 11,0 i 59,0, s prosjekom od 25,96 i standardnom devijacijom od 11,220.

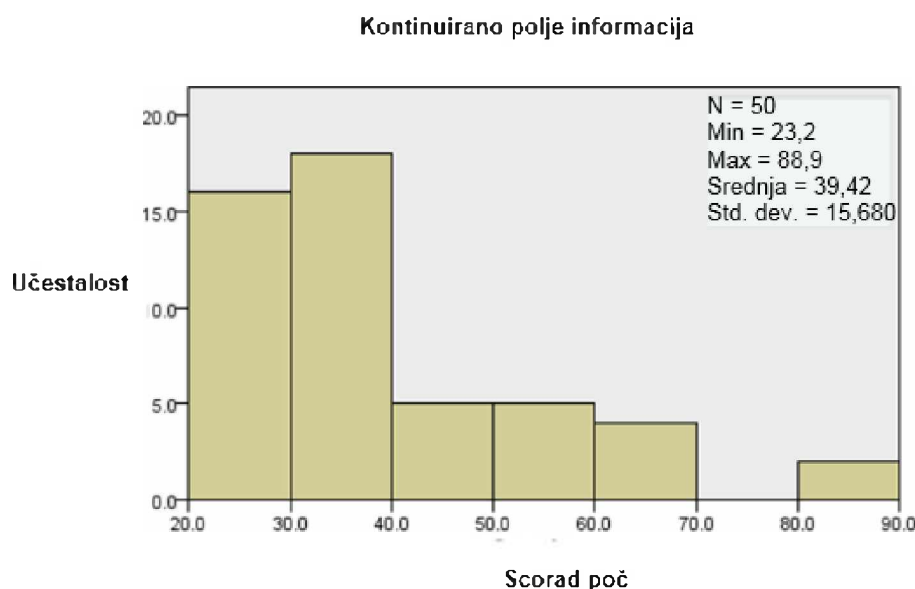
– Još jedan pad u vrijednostima u odnosu na početno stanje i I kontrolu, gdje se većina pacijenata nalazila u rasponu od 20 do 30. Ovo je ukazalo na značajan napredak u smanjenju upale.

4. Scor III t.e. (nakon 21 dana) (Slika 21):

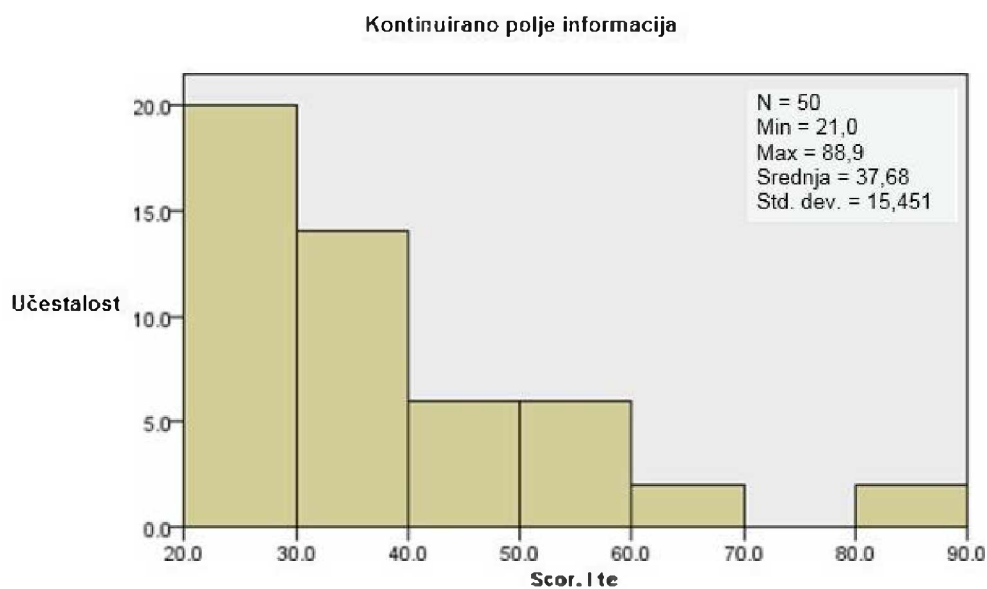
– Vrijednosti su između 2,6 i 59,0, s prosjekom od 18,91 i standardnom devijacijom od 9,703. Histogram pokazuje dalje smanjenje simptoma, sa najvećim brojem vrijednosti između 10 i 20. Ovo sugeriše da je tretman smiljem doveo do značajnog smanjenja simptoma kod većine pacijenata.

Histogrami su jasno pokazali progresivno smanjenje simptoma upale kože kod pacijenata tokom trajanja tretmana smiljem. Na početku su simptomi bili umjereni do visoki, ali su se značajno smanjili tokom svake kontrole, posebno nakon 14 i 21 dana tretmana. Ovi histogrami, zajedno sa statističkim testovima (Man Vitnjev i Fridmanov), potvrdili su učinkovitost tretmana smiljem u smanjenju inflamatornih procesa na koži.

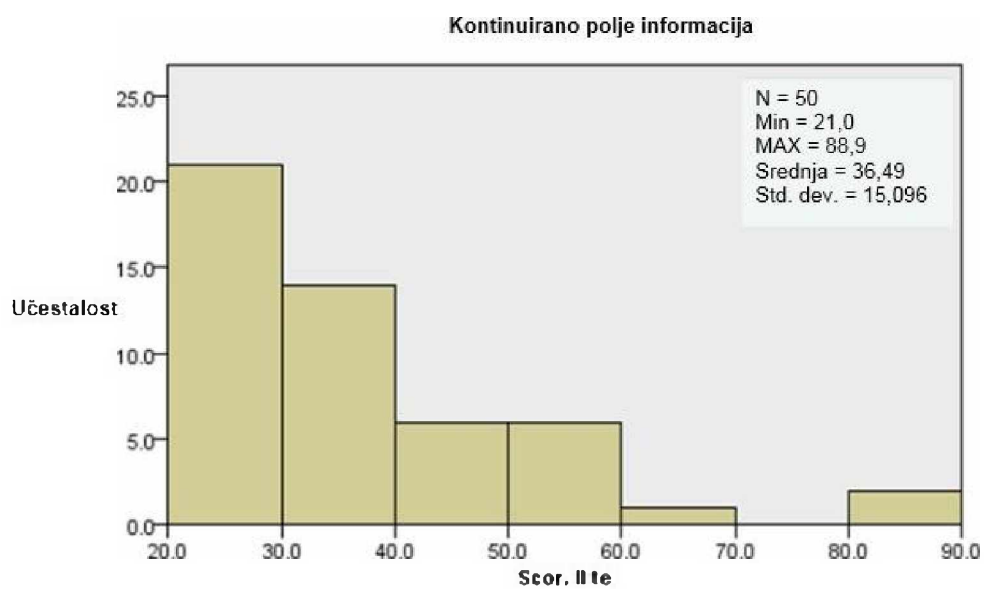
4.4.1.4 Fridmanov test za ispitanike koji su koristili placebo preparate



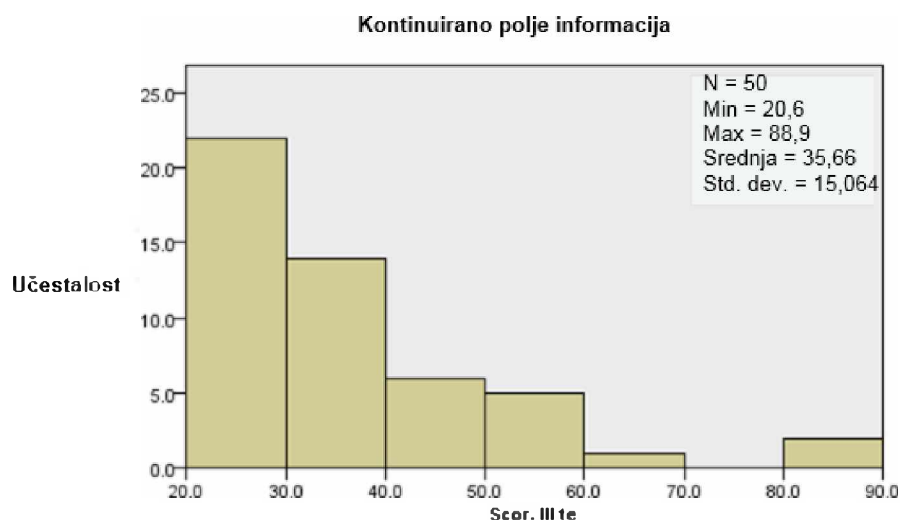
Slika 24. Fridmanov test za placebo – SCORAD (početno stanje)



Slika 25. Fridmanov test za placebo – SCORAD (I kontrola)



Slika 26. Fridmanov test za placebo – SCORAD (II kontrola)



Slika 27. Fridmanov test za placebo – SCORAD (III kontrola)

Na osnovu prikazanih histograma za placebo grupu, moglo se uočiti sljedeće:

1. Početno stanje (Scorad poč.) (Slika 23):

– Vrijednosti su u rasponu od 23,2 do 88,9, s prosjekom od 39,42 i standardnom devijacijom od 15,680.

– Najveći broj pacijenata imao je početne vrijednosti u rasponu od 30 do 40, što je ukazivalo na umjereni nivo upale na početku studije.

2. I kontrola (Scor I t.e.) (Slika 24):

– Vrijednosti su između 21,0 i 88,9, s prosjekom od 37,68 i standardnom devijacijom od 15,451.

– Histogram je pokazivao blagi pomak distribucije ka nižim vrijednostima u poređenju s početnim stanjem, ali promjene su bile vrlo male. To sugerise da nakon prve kontrole placebo nije doveo do značajnog smanjenja simptoma.

3. II kontrola (Scor II t.e.) (Slika 25):

– Vrijednosti su između 21,0 i 88,9, s prosjekom od 36,49 i standardnom devijacijom od 15,096.

– Ponovo se vidio vrlo mali pomak ka nižim vrijednostima, ali histogram je pokazivao da distribucija ostaje slična onoj iz I kontrole, što je ukazivalo na vrlo ograničen ili gotovo nepostojeći efekat placeba u smanjenju simptoma.

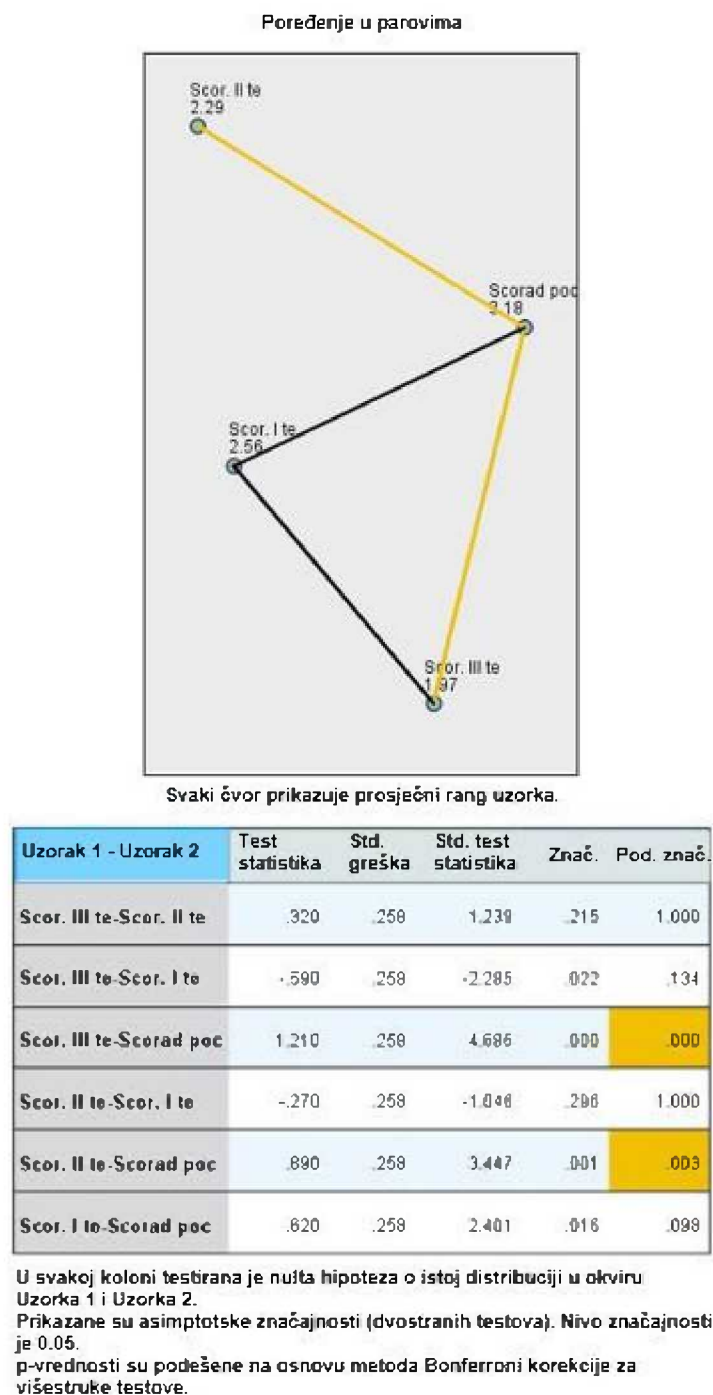
4. III kontrola (Scor III t.e.) (Slika 26):

– Vrijednosti su između 20,6 i 88,9, s prosjekom od 35,66 i standardnom devijacijom od 15,064.

– Iako je postojalo blago smanjenje prosječnih vrijednosti, ono nije bilo značajno. Distribucija je bila vrlo slična prethodnim kontrolama, što sugerira da placebo grupa nije pokazala značajan napredak kroz vrijeme.



Slika 28. Fridmanov test za upoređivanje početnog stanja i I, II i III kontrole (placebo).



Slika 29. Fridmanov test za upoređenje placebo preparata (početno stanje, I, II i III kontrola)

Na osnovu prikazanih rezultata Fridmanovog testa za placebo, koji je poredio početno stanje, I, II i III kontrolu, data je sljedeća interpretacija (Slika 28):

1. Fridmanov test:

– Test je pokazao da je p-vrijednost značajno ispod 0.05, što je ukazivalo na postojanje statistički značajne razlike između različitih vremenskih tačaka (početno stanje, I, II, i III kontrola) unutar placebo grupe.

2. Prosječni rangovi:

- Početno stanje (Scorad poč.): Prosječni rang je 3,18.
- I kontrola (Scor I t.e.): Prosječni rang je 2,56.
- II kontrola (Scor II t.e.): Prosječni rang je 2,29.
- III kontrola (Scor III t.e.): Prosječni rang je 1,97.

Iako su rangovi nešto niži tokom kontrola, razlike nijesu tako izražene kao kod grupe tretirane smiljem.

3. Uporedna poređenja:

– Najznačajnije razlike uočene su između Scorad poč. i III kontrole, sa p-vrijednošću manjom od 0.001, što je prikazalo statistički značajnu razliku. Takođe, razlika između Scorad poč. i II kontrole ($p = 0,003$) je bila značajna.

– Međutim, poređenja između I i II, i III, te II i III kontrole nijesu statistički značajna ($p > 0,05$), što sugerise da placebo nije imao konzistentan efekat kroz različite kontrole.

Iako je postojao određeni pad simptoma u placebo grupi (što se može pripisati prirodnom oporavku, efektu same podloge ili placebo efektu), razlike između različitih kontrola nijesu dovoljno velike da bi bile statistički značajne u većini slučajeva. Ovo potvrđuje da placebo nije imao značajan uticaj na smanjenje upalnih procesa na koži u poređenju sa grupom tretiranom smiljem, gdje su rezultati bili daleko izraženiji.

4.4.1.5 Interpretacija statističkih analiza

Analiza histograma za placebo grupu pokazala je da tokom praćenog perioda nije došlo do statistički značajnog smanjenja simptoma upale. Iako je zabilježen blag pad vrijednosti nakon svake kontrole, distribucija podataka ostala je slična početnom stanju, što ukazuje na minimalan ili neprimjetan efekat placebo tretmana na upalne procese kože. U poređenju s tim, tretirana grupa sa etarskim uljem smilja pokazala je jasno izražen pad upalnih simptoma, što je statistički značajno i potvrđuje superioran učinak smilja u smanjenju upalnih procesa u odnosu na placebo. Ovi nalazi ukazuju na farmakološki efekat etarskog ulja smilja i potvrđuju njegov potencijal kod

upalnih reakcija na koži. Analiza promjena simptoma upale tokom tretmana pokazala je da je nakon 14 dana primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja zabilježeno vidljivo poboljšanje kliničkih parametara u tretiranoj grupi u poređenju sa početnim stanjem i placebo grupom. Međutim, najveća statistička značajnost u smanjenju upalnih simptoma uočena je nakon 21 dana tretmana, što ukazuje na kumulativni i pojačani efekat smilja pri produženoj primjeni. Ovi rezultati sugerišu da su polučvrsti preparati sa etarskim uljem smilja efikasni u tretiranju upalnih procesa, pri čemu se maksimalni terapijski efekat postiže nakon trojnedjeljnog kontinuiranog tretmana.

4.4.2 Faktori koji su uticali na efikasnost preparata

Pozitivni rezultati kod ispitanika su bili evidentni i nakon prve kontrole (7) dana, ali njihova značajna efikasnost i vidljive promjene na koži su u najvećem slučaju bile nakon 21 dana intenzivnog tretiranja sa preparatom sa etarskim uljem smilja.

Na Slici 28 se može vidjeti primjer kontinuiranog poboljšanja hroničnog atopijskog dermatitisa tokom upotrebe *Unguentum Emolliens*-a sa etarskim uljem smilja.

Na Slici 28 prikazano je postupno poboljšanje kliničkog stanja hroničnog atopijskog dermatitisa kod ispitanika tokom tretmana *Unguentum Emolliens*-om sa etarskim uljem smilja. Već nakon prve sedmice upotrebe uočava se smanjenje crvenila i iritacije kože, što ukazuje na inicijalni antiinflamatorni efekat preparata. Tokom druge sedmice dolazi do daljeg smanjenja eritema i izraženije hidratacije zahvaćenih područja, dok nakon 21 dana kontinuiranog tretmana koža pokazuje vidljivo poboljšanje teksture, smanjenje ljuskavosti i stabilizaciju kože. Ovaj progresivni efekat sugerise kumulativno djelovanje ovih preparata, koje kroz antiinflamatorni i regenerativni mehanizam postepeno moduliše upalne procese i poboljšava barijernu funkciju kože.



Slika 30. Primjer efikasno tretiranog slučaja sa atopijskim dermatitisom u periodu od početnog stanja do III kontrole

Pregledom relevantne literature i sličnih istraživanja, kao i rezultata predstavljenih tokom naših ispitivanja, potvrđeni su rezultati prethodnih studija u vezi sa upotrebom etarskog ulja smilja (*Helichrysum italicum*) u kozmetičkim i farmaceutskim preparatima. Rezultati istraživanja Anđića i sar., (79) pružaju značajnu potvrdu o tome da gel i mast koji su pripremljeni od etarskog ulja smilja, mogu djelovati kao efikasni topikalni biljni preparati za brzo zarastanje rana, posebno kod dijabetičnih lezija na štakorima. Ovi rezultati sugeriraju da etarsko ulje smilja može pozitivno uticati na proces zarastanja rana, što je posebno važno za osobe sa dijabetesom koje su sklone razvoju hroničnih i teško liječećih rana.

Takođe, Viegas i sar., (46) naglašavaju potencijal *Helichrysum italicum*-a kao ljekovite biljke, čija farmakološka svojstva, iako obećavajuća, još uvijek nijesu naučno potvrđena u

dovoljnoj mjeri. Iako je tradicionalno korišćenje smilja dokumentovano, potrebno je sprovesti i dodatna klinička ispitivanja kako bi se verificovali ovi podaci i promovisali *Helichrysum italicum* kao relevantan terapeutik u liječenju različitih oboljenja.

Nedavna istraživanja, poput studije Furlana i sar., (133), ukazuju na širok spektar farmakoloških aktivnosti etarskog ulja smilja, uključujući antioksidativna, antiinflamatorna, antikancerogena, antivirusna, antimikrobna, insekticidna i antiparazitska svojstva. Ovi efekti čine smilje vrlo perspektivnim za razvoj novih terapija u različitim oblastima medicine. Takođe, Voinchet i sar., (75) izvještavaju da je upotreba etarskog ulja smilja u kombinaciji sa biljnim uljem (*Rosa rubiginosa*) u postoperativnom periodu značajno smanjila upalu, edeme, modrice i hematome na ožiljcima, što potvrđuje efikasnost smilja u tretmanu postoperativnih rana i ubrzavanju procesa oporavka.

Bongonnuri i saradnici (122) su razvili nanoformulacije etarskog ulja smilja u gelovima, čiji je cilj poboljšanje hidratacije i zaštite kožne barijere. Njihova *in vitro* istraživanja pokazala su da etarsko ulje smilja može biti efikasnije i od vitamina E u pogledu zaštite kožnih lipida od peroksidacije. Kombinacija smilja i vitamina E je takođe, poboljšala kvalitet kože, što ukazuje na potencijalnu primjenu smilja sa ciljem zaštite kože od oksidativnog stresa izazvanog UV zračenjem i zagađenjem. Ova saznanja pokazuju da smilje može predstavljati ključni sastojak u formulacijama koje imaju zaštitu od spoljašnjih štetnih faktora.

Serra i sar., (134) takođe, potvrđuju regenerativne efekte smilja, ukazujući na njegovu sposobnost da poboljša sintezu kolagena i podstiče procese regeneracije kože, čime se smilje profilira kao izuzetno korisna biljka tokom tretiranja rana. Ovi rezultati podržavaju njegove primjene u kozmetici, kao i u liječenju ožiljaka i oštećenja kože.

Maksimović i sar., (135) su, posredstvom *in vivo* istraživanja, ispitali efekte koje ekstrakti smilja imaju na iritiranu kožu. Rezultati navedenog istraživanja, koji sadrže brojne analize kojima su obuhvaćeni: transepidermalni gubitak vode, indeks melanina, eritema i pH kože – ukazuju na pozitivne efekte *Helichrysum italicum*-a u pogledu zaštite kože, očuvanja njene barijere i smanjenja iritacija. Ovaj rad potvrđuje da etarsko ulje smilja ima potencijal da poboljša opšte stanje kože, održavajući je netaknutom i zaštićenom od spoljašnjih faktora.

Pekmezci u svojoj *in vitro* studiji (136) istraživao je molekularni osnov dejstva *Helichrysum italicum*, na zacjeljivanje rana i zaštitu kože. Tretman kože ekstraktom smilja značajno je povećao ekspresiju gena FGF-2 i HAS-2, dok promjene u MMP-9 nijesu bile značajne.

Ovi rezultati ukazuju na potencijal ekstrakta smilja da podrži regeneraciju kože i očuvanje ekstracelularnog matriksa, putem stimulacije reepitelizacije, angiogeneze i zaštite fibroblasta od UV-B stresa, pružajući molekularnu osnovu za njegove regenerativne efekte, što potvrđuje njegovu perspektivnu primjenu u dermatologiji.

Naši rezultati potvrđuju da preparati sa etarskim uljem smilja djeluju na različite ćelijske mehanizme i biološke procese, sa posebnim naglaskom na smanjenje inflamatornih procesa, ne samo akutnih, već i hroničnih. Ovi efekti ukazuju na širok spektar potencijalnih terapijskih primjena etarskog ulja smilja, naročito u kontekstu dermatoloških i kozmetičkih tretmana, kao i u liječenju upalnih bolesti kože.

Iako se većina istraživanja u literaturi slaže u pogledu potencijala *Helichrysum italicum*-a u različitim terapijskim oblastima, potrebno je sprovesti dalja klinička ispitivanja kako bi se potvrdile sve prednosti ove biljke, kao i njena primjena u širem spektru terapija. Naši rezultati podržavaju već dokumentovane efekte smilja, naročito u kontekstu njegove upotrebe za poboljšanje stanja kože, ubrzavanje procesa zarastanja rana i smanjenje inflamacije, zbog čega smilje predstavlja izuzetnu koncepciju koja otvara brojne perspektive u razvoju novih kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda.

4.5 Ograničenja

4.5.1 Mali uzorak

Jedno od značajnih ograničenja ove studije jeste mali broj učesnika uključenih u klinička ispitivanja sa polučvrstim preparatima sa smiljem. Zbog ograničenog uzorka, statistička snaga analiza je smanjena. Mali uzorak povećava može dovesti do pretjeranog ili nedovoljno preciznog tumačenja efekata tretmana. Pored toga, ograničena veličina uzorka otežava izvođenje podgrupnih analiza, poput poređenja odgovora na tretman po starosnoj grupi, polu ili težini simptoma, što smanjuje sposobnost identifikovanja različitih obrazaca odgovora među populacijama. Takođe, veći uzorak bi omogućio identifikaciju potencijalnih rijetkih neželjenih efekata koji možda nijesu evidentirani u malim studijama.

4.5.2 Otečnjavanje gel podloge

Otečnjavanje i odvajanje faza tokom čuvanja kod gelaste formulacije predstavlja ograničenje ove studije, jer se odnosi se na neuspjeh u formiranju stabilne podloge sa gelom. Ovo ograničenje naglašava potrebu za dodatnim istraživanjima u cilju optimizacije fizičko-hemijskih svojstava gela, uključujući izbor adekvatnih sredstva za geliranje, stabilizatora ili modifikacija formulacije, kako bi se obezbijedila pouzdana, reproduktivna i primjenljiva formulacija za buduće eksperimente i potencijalne aplikacije.

4.5.3 Kratko vrijeme

Ograničenja predstavlja vrijeme trajanja istraživanja, koje je obuhvatilo period jedne godine praćenja pacijenata. Ograničeno vrijeme analize polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja otežava procjenu dugoročnih efekata tretmana, trajnost terapijskog dejstva i eventualne rijetke ili kasno nastale neželjene reakcije. Kratko trajanje studije takođe ograničava mogućnost praćenja postepenih promjena u stanju kože i adaptacije pacijenata na preparat, što može uticati na interpretaciju rezultata i generalizaciju zaključaka. Ovo ograničenje naglašava potrebu za dužim kliničkim ispitivanjima kako bi se pouzdano utvrdila efikasnost, sigurnost i dugoročna primjenljivost polučvrstih formulacija sa etarskim uljem smilja u populaciji pacijenata.

4.5.4 Procjena antiinflamatornog efekta preko SCORAD indeksa

Jedno od ograničenja ove studije je što je procjena antiinflamatornog efekta sprovedena isključivo putem SCORAD indeksa. Ovaj pristup, iako koristan za kliničku evaluaciju simptoma atopijskog dermatitisa, ne omogućava detaljnu molekularnu ili biohemijsku analizu upalnih procesa na koži. Kao rezultat, studija ne pruža direktne dokaze o efektima tretmana na ekspresiju citokina, enzima ili drugih biomarkera upale, što ograničava razumijevanje mehanizma djelovanja testiranih preparata.

Ovo naglašava potrebu za dopunskim istraživanjima koja uključuju laboratorijske i molekularne metode, kako bi se preciznije kvantifikovao antiinflamatorni efekat.

4.5.5 Odsustvo uporedne analize sa standardnom kortikosteroidnom terapijom

Ograničenja ove studije je i činjenica da testirani preparati nijesu upoređeni sa standardnom terapijom kortikosteroidima, koja se smatra zlatnim standardom u tretiranju atopijskog dermatitisa. Odsustvo takve uporedne grupe ograničava mogućnost procjene relativne efikasnosti ispitivanih formulacija, jer nije jasno da li su efekti preparata sa etarskim uljem smilja jednako, slabije ili potencijalno jače izraženi u poređenju sa klinički prihvaćenim tretmanom. Kao posljedica toga, studija ne može pružiti direktne dokaze o komparativnoj superiornosti ili inferiornosti alternativnih preparata u kontroli simptoma i inflamatornih promjena u koži. Ovo naglašava potrebu za budućim kliničkim ispitivanjima koja uključuju kontrolne grupe sa standardnim kortikosteroidima, kako bi se dobila precizna i validna procjena terapijske vrijednosti alternativnih formulacija.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije sprovedena su istraživanja koja su za cilj imala ispitivanje mogućnosti primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja, optimalnih farmaceutsko – tehnoloških karakteristika, na upalne procese kože. Rezultati istraživanja doveli su do sljedećih zaključaka:

- ✓ Metodom parne destilacije je moguće dobiti stabilno etarsko ulje smilja koje je GS/MS analizom pokazalo da sadrži 43 aktivne komponente sa antiinflamatornim i antimikrobnim efektima. Najvećim udjelom su identifikovani monoterpeni (*α -pinene*, *limonene*, *neryl-acetate*) i seskviterpeni (*β -selinene*, *α -selinene*, *bisabolene*, *γ -curcumene*, *italicene*, *γ -selinene*, *α -copaene*).
- ✓ Metodom mikrodilucionog bujona je moguće definisati tačnu antimikrobnu aktivnost etarskog ulja smilja, koje je izraženije kod Gram pozitivnih bakterija u odnosu na Gram negativne bakterije.
- ✓ Utvrđeno je da ulja pokazuju antibakterijsko djelovanje na testirane bakterije, odnosno Gram pozitivne bakterije: *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228).
- ✓ Mast i krem sa etarskim uljem smilja pokazuju optimalne farmaceutsko-tehnološke karakteristike za korišćenje, dok gel sa etarskim uljem smilja pokazuje otečnjavanje i nije primjeren za upotrebu. Zbog razlike u sastojcima koji ulaze u sastav masne i krem podloge, mogu se zapaziti razlike u teksturnim i senzornim karakteristikama između masti i kremova sa etarskim uljem smilja, koje su unutar optimalnih literaturnih referenci. Trebalo bi izabrati proizvod u zavisnosti od težine promjena i njihove lokalizacije.
- ✓ Statističkom obradom podataka može se zaključiti da polučvrsti preparati (mast i krem) sa etarskim uljem smilja uspješno djeluju na tretiranje upalnih procesa kože, atopijskog dermatitisa.
- ✓ Nakon izvršene analize kojom je obuhvaćeno 100 ispitanika, dolazimo do zaključka da preparati sa smiljem djeluju efikasno u tretiranju atopijskog dermatitisa, pri čemu se prvi rezultati vide nakon redovnog korišćenja duže od 7 dana, dok se najveći109 efekat postiže nakon redovnog tretiranja u periodu od 21 dana i duže.

Korisnici placebo preparata su osjetili izvjesno poboljšanje, najviše nakon početka korišćenja, što može biti emolijentni efekat same podloge. Međutim, njihov progres poboljšanja je opao u II i III kontroli. Najvažniji parametar za uspješno liječenje je vrijeme tretiranja koje bi trebalo da bude duže od 7 dana, dok su znatno bolji rezultati zabilježeni kod ispitanika koji su preparate sa smiljem koristili 21 dan i duže.

6. LITERATURA

1. Atanas G.A., Birgit W., Eva-Maria P-W., Thomas L., Christoph W., Pavel U., Veronika T., Limei W., Stefan Schw., Elke H., Judith M.R., Daniela S., Johannes M.B., Valery B., Marko D.M., Brigitte K., Rudolf B., Verena M.D., Herman S. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotech. Advan.* 2015;1-72. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
2. Tabassum N., Hamdani M. Plants used to treat skin diseases. *Pharmacog. Rev.* 2014;8(15): 52–6. doi: 10.4103/0973-7847.125531.
3. Carmona F., Soares Pereira A.M. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2013;23:379–385. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000018>.
4. Chang R.K., Raw A., Lionberger R., Yu L. Generic Development of Topical Dermatologic Products, Part II: Quality by Design for Topical Semisolid Products. *AAPS J.* 2013;15:674-683. doi: 10.1208/s12248-013-9472-8.
5. Marks J.G., Miller J. 4th ed. Elsevier Inc. 2006. Lookingbill and Marks' Princ. of Dermat. ISBN no. 1416031855.
6. American Academy of Dermatologist: Eczema types: Atopic dermatitis overview. <https://www.aad.org/> (pristupljeno 20. 11. 2024)
7. Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.M. The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17(12):1063–72. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
8. Skin Anatomy and Physiology. <https://sl.bing.net/i5YrDkJ1bqu> (pristupljeno 10. 11. 2024)
9. Atopic Dermatitis. <https://encyclopedia.pub/entry/31460> (pristupljeno 11. 04. 2025)
10. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86:985–990.
11. Ríos J.L., Recio M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100:80–84.
12. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46:446–475.

13. Heinrich M., Frei Haller B., Leonti M.A. Perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: The eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *J. Nat. Prod.* 2014;77:678–689.
14. Borris R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* 1996;51:29–38.
15. De Smet P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs.* 1997;54:801–840.
16. Shaaban H.A.E., El-Ghorab A.H., Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil Res.* 2012;24:203–212.
17. Bajpai V.K., Rahman A., Kang S.C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2008;125:117–122.
18. Kalodera Z., Blažević N., Salopek N., Jurišić R. Eterična ulja (aetherolea), *Farm. Glas.* 1998;5 4:195–210.
19. Valimaa A.L., Honkalampi-Hämäläinen U., Pietarinen S., Willför S., Holmbom B., von Wright A. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;115:235–243.
20. Eslahi H., Fahimi N., Sardarian A. Chemical Composition of Essential Oils: Chemistry, Safety and Applications. *Ess. Oils in Food Proc.* 2017;119–171. doi:10.1002/9781119149392.ch4.
21. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94:223–253.
22. Bauer K., Garbe D., Surburg H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim. 2001;293, n.d.
23. Lawless, J. The Encyclopedia of Essential oils. Thorsons. 2001.
24. Guenther, E. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York. 1948, n.d.
25. Jeevan Ram A., Bhakshu L.M., Venkata Raju R.R. In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *J. Ethnopharmacol.* 2004;90:353–357.
26. Alviano D.S., Alviano C.S. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009;10:106–121.

27. Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.* 2010;76:1479–1491.
28. Riella K.R., Marinho R.R., Santos J.S., Pereira-Filho R.N., Cardoso J.C., Albuquerque Junior R.L.C. Thomazzi S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 2012;143: 656–663.
29. Babili F.El., Bouajila J., Souchard J.P., Bertrand C., Bellvert F., Fouraste I., Moulis C., Valentin A. Oregano: Chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Food Sci.* 2011;76:512–518.
30. Ennajar M., Afloulous S., Romdhane M., Ibrahim H., Cazaux S., Abderraba M., Raies A., Bouajila J. Influence of the Process, Season, and Origin on Volatile Composition and Antioxidant Activity of *Juniperus phoenicea* L. Leaves Essential Oils. *J. Food Sci.* 2011;76.
31. Rašković A., Milanović I., Pavlović N., Čebović T., Vukmirović S., Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014;14:225.
32. Benencia F., Courrèges M.C. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and -2. *Phytomedicine.* 1999; 6:119–123.
33. Dunkić V., Bezić N., Vuko E. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. *Nat. Prod. Commun.* 2011; 6:1385–1388.
34. Huang S.H., Xian J.D., Kong S.Z., Li Y.C., Xie J.H., Lin J., Chen J.N., Wang H.F., Su Z.R. Insecticidal activity of pogostone against *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 2014;70:510–516.
35. Liu X.C., Li Y.P., Li H.Q., Deng Z.W., Zhou L., Liu Z.L., Du S.S. Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Molecules.* 2013;18:10733–10746.
36. Manosroi J., Dhumtanom P., Manosroi, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 2006;235:114–120.
37. Zu Y., Yu H., Liang L., Fu Y., Efferth T., Liu X., Wu N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules.* 2010;15: 3200–3210.
38. Zijnga V., Van Leeuwen M.B.M., Degener J.E., Abbas F., Thurnheer T., Gmür R., Harmsen¹¹³ H.J.M. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* 5. 2011; 9.

39. Kerekes E.B., Deák É., Takó M., Tserennadmid R., Petkovits T., Vágvölgyi C., Krisch J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2013;115:933–942.
40. Pekmezci E., Türkoğlu M. The Effects of *Helichrysum italicum* Extract on the Extracellular Matrix of the Skin. *Acta Med Acad.* 2023;52(3):182-187, doi: 10.5644/ama2006-124.425.
41. Leonardi M., Ambryszewska K.E., Melai B., Flamini G., Cioni P.L., Parri F., Pistelli L. Essential oil composition of *H. italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodivers.* 2013;10(3):343-355, doi: 10.1002/cbdv.201200222.
42. Galbany-Casals M., Blanco-Moreno J.M., Garcia-Jacas N., Breitwieser I., Smissen R.D. Genetic variation in mediterranean *Helichrysum italicum* (asteraceae; gnaphalieae): Do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin? *Plant Biol.* 2011;13(4): 678-87. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00411.x.
43. Kladar N.V., Anačkov G.T., Rat M.M., Srdenović B.U., Grujić N.N., Šefer E.I., Božin B.N. Biochemical characterization of *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chem. Biodivers.* 2015;12(3):419-31. doi: 10.1002/cbdv.201400174.
44. Les F., Venditti A., Cásedas G., Frezza C., Guiso M., Sciubba F., Serafini M., Bianco A., Valero M.S., López V. Everlasting Flower (*Helichrysum stoechas* moench) as a potential source of bioactive molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Ind. Crop. Prod.* 2017;108:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.043>
45. Pljevljakušić D., Bigović D., Janković T., Jelačić S., Šavikin K. Sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, chemical and biological properties. *Front. Plant. Sci.* 2018; 9:1123. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01123>
46. Antunes Viegas D., Palmeira-de-Oliveira A., Salgueiro L., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *J. Ethnopharmacol.* 2014;151(1): 54-65. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.005.
47. Ninčević T., Grdiša M., Šatović Z., Jug-Dujaković M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Ind. Crop. Prod.* 2019 Oct;138: 111487. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111487>

48. Benítez G., González-Tejero M.R., Molero-Mesa J. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. J. Ethnopharmacol. 2010;129(1):87-105. doi: 10.1016/j.jep.2010.02.016.
49. Oliva A., Garzoli S., Sabatino M., Tadić V., Costantini S., Ragno R., Božović M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *H. italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. Nat. Prod. Res. 2020;34(3):445–448. doi: 10.1080/14786419.2018.1538218.
50. Djihane B., Wafa N., Elkhamsa S., Pedro H.J., Maria A.E., Mohamed Mihoub Z. Chemical constituents of *H. italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. Saudi Pharm. J. 2017;25(5):780–787. doi: 10.1016/j.jsps.2016.11.001.
51. Sparkman DO., Penton Z., Kitson FG. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. Acad. Press. 2011; ISBN 978-0-08-092015-3.
52. Adams R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured publishing Co. Carol Stream, Illinois, 2005;16:65-120.
53. Blažević N., Petričić J., Stanić G., Maleš, Ž. Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along adriatic coast. Acta Pharm. 1995;45(4):517–522.
54. Lemaire G., Olivero M., Rouquet V., Moga A., Pagnon A., Cenizo V. et al. Neryl acetate, the major component of Corsican *Helichrysum italicum* essential oil, mediates its biological activities on skin barrier. PLoS One. 2023;18(3):e0268384. doi: 10.1371/journal.pone.0268384.
55. D'Abrosca B., Buommino E., D'Angelo G., Coretti L., Scognamiglio M., Severino V., Pacifico S., Donnarumma G., Fiorentino A. Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *pseudomonas aeruginosa*. Bioorg. Med. Chem. 2013;21:7038–7046. doi: 10.1016/j.bmc.2013.09.019.
56. Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M.P., Appendino G., Dessì M.A. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. Chem. Biol. Interact. 2007;165(2):117-26. doi: 10.1016/j.cbi.2006.11.006.

57. Sala A., Recio M.C., Schinella G.R., Máñez S., Giner R.M., Cerdá-Nicolás M., Ríos J.L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;461(1):53-61. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02953-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02953-9)
58. Hadžibeti Đ., Vojinović T., Nikolić M., Božić D.D., Antić Stanković J. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* from Mediterranean coast. *Farmacia.* 2024;72(4):1098-1104. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.5.12>
59. Ispitivanje osjetljivosti. <http://www.msdpriprucnici.placebo.hr/msd-priprucnik/infektologija/laboratorijska-dijagnostika-zaraznih-bolesti/ispitivanje-osjetljivosti-antibiogram> (pristupljeno 12. 12. 2024)
60. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, www.eucast.org (pristupljeno 1. 12. 2023)
61. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method, 2020; www.eucast.org (pristupljeno 1. 12. 2023)
62. Li X., Huang T., Xu K., Li C., Li Y. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):873.
63. Deurenberg R.H., Stobberingh E.E., The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008;8(6):747–763.
64. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(8):555–567.
65. Sood S., Malhotra M., Das B.K., Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med. Res.* 2008;128(2):111–121.
66. Van Tyne D., Martin M.J., Gilmore M.S. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins.* 2013;5(5):895–911.
67. Ramos S., Silva V., Dapkevicius M.L.E., Caniça M., Tejedor-Junco M.T., Igrejas G., Poeta P. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria Among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Production. *Animals.* 2020;10(12):2239.
68. Rusu A., Petca A., Mareş C., Petca R.C., Popescu R.I., Negoită S., Dănaş R.A., Chibelea C.B., Jînga V. Urinary tract infections in a Romanian population: Antimicrobial resistance of uropathogens – A multiregional study. *Farmacia.* 2023;71(1):165–173.

69. Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res. Publ. Health*. 2020; 17(17):6278.
70. Palmer A.D., Slauch J.M. Mechanisms of Salmonella pathogenesis in animal models. *Hum.Ecol. Risk Assess*. 2017; 23(8):1877–1892.
71. Qin S., Xiao W., Zhou C., Pu Q., Deng X., Lan L., Liang H., Song X., Wu M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sign. Trans. Target Ther*. 2022; 7(1):199.
72. Ballero M., Poli M., Sacchetti G., Loi M.C. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia), *Fitoterapia*. 2021;72(7):788–801.
73. Halliwell B., Hoult J.R., Blake D.R. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J*. 1988;2(13):2867–2873.
74. Maffei Facino R., Carini M., Franzoi L., Pirola O., Bosisio E. Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmac. Resear*. 1990 Nov–Dec;22(6):709–21. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(05\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(05)80097-0)
75. Voinchet, V., Giraud-Robert A.M. Utilisation de l’huile essentielle d’hélichryse italienne et de l’huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*. 2007;5:67–72, doi: 10.1007/s10298-007-0213-y.
76. Fraternale D., Flamini G., Ascrizzi R. *In Vitro* anticollagenase and antielastase activities of essential oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *J. Med. Food*. 2019; 22(10):1041–1046. doi: 10.1089/jmf.2019.0054.
77. Han X., Rodriguez D., Parker T.L. Biological activities of frankincense essential oil in human dermal fibroblasts. *Biochim. Open*. 2017;4:31–35. doi:10.1016/j.biopen.2017.01.003.
78. Schwingen J., Kaplan M., Kurschus F. Review – Current Concepts in Inflammatory Skin Diseases Evolved by Transcriptome Analysis: In-Depth Analysis of Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(3): 699. doi: 10.3390/ijms21030699.
79. Andjić M., Božin B., Draginić N., Kocović A., Jeremić J.N., Tomović M., Milojević Šamanović A., Kladar N., Čapo I., Jakovljević V., Bradić V.J. Formulation and Evaluation of *Helichrysum italicum* Essential Oil – Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):813,¹¹⁷ <https://doi.org/10.3390/ph14080813>

80. Valizadeh A., Shirzad M., Pourmand M.R., Farahmandfar M., Sereshti H., Amani A. Preparation and comparison of effects of different herbal oil ointments as wound-healing agents. *Cells Tiss. Organs*. 2019;207:177–186.
81. Zhang F., Ye C., Li G., Ding W., Zhou W., Zhu H., Chen G., Luo T., Guang M., Liu Y., et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glyccometabolism characters. *Exp. Anim*. 2003;52(5):401–407.
82. Petersen D. Immortelle essential oil and extract: Are two preparations better than one? *J. Am. Herb. Guild*. 2015;13:21–27.
83. Vuleta G., Milić J., Primorac M., Savić S. *Farmaceutska tehnologija I*, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012.
84. The Skin Barrier Research Facility. <https://sheffielddermatologyresearch.com/> (pristupljeno 20.12.2024)
85. Vasiljević D., Đekić Lj., Krajišnik D., Pantelić I. *Priručnik za praktičnu nastavu iz Farmaceutske tehnologije I*, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2019.
86. Magistralne formule 2008. <https://www.alims.gov.rs/regulativa/magistralne-formule/> (pristupljeno 20.12.2024)
87. Nabi S.A., Sheraz M.A., Ahmed S., Mustaan N., Ahmad I. Pharmaceutical Gels: A Review. *RADS J Pharm. and Pharmac. Scie*. 2016;4(1):40–48.
88. Solanki D., Vinchhi P., Patel M.M. Design Considerations, Formulation Approaches, and Strategic Advances of Hydrogel Dressings for Chronic Wound Management. *ACS Omega*. 2023;8(9):8172–8189. doi:10.1021/acsomega.2c06806.
89. Hemendrasinh J.R., Dhruti P.M. A Review on Pharmaceutical Gel. *Intern. J. of Pharm. Sci*. 2015;1(1):33–47.
90. Goyal S. et al. Novel Anti-Inflammatory Topical Herbal Gels Containing *Withania somnifera* and *Boswellia serrata*. *Inter. J.of Pharm. and Biol. Arch*. 2011;2(4):1087–1094.
91. Attwood D. Disperse systems. In: Aulton ME, editor. *Pharmaceutics – The Science of Dosage Form Design*. London: Churchill Livingstone. 2002;83-85,85-91,528-529.
92. European Pharmacopoeia (PH. Eur) 11th Edition. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (pristupljeno 21.12.2024)

93. Szczesniak A.S., Brandt M.A., Friedman H.H. Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *J. Food Sci.* 1963;28:397–403.
94. Stolić Jovanović A., Martinović M., Žugić A., Nešić I., Tosti T., Blagojević S., Tadić V.M. Derivatives of L-Ascorbic Acid in Emulgel: Development and Comprehensive Evaluation of the Topical Delivery System. *Pharmaceutics*. 2023;15:813. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030813>
95. Savary G., Gilbert L., Grisel M., Picard C. Instrumental and sensory methodologies to characterize the residual film of topical products applied to skin. *Ski. Res. Technol.* 2019; 25:415–423.
96. Stolić-Jovanović A., Martinović M., Nešić I. The Influence of Selected Thickeners on the Textural Properties of Oil-In-Water Emulsions. *Acta Fac. Med. Naissensis* 2022;39(1):57-65. <https://doi.org/10.5937/afmnai39-31064>.
97. ASTM Committee E 1490-03. Standard practice for descriptive skinfeel of creams and lotions. American Society for Testing and Materials. 2003. West Conshohocken, PA.
98. Kunz B., Oranje A.P., Labreze L.; Stalder J.F., Ring J., Taieb A. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1997;195:10–19.
99. Chopra R., Vakharia P.P., Sacotte, R., Patel N., Immaneni S., White T., Kantor R., Hsu D.Y., Silverberg J.I. Severity strata for Eczema Area and Severity Index (EASI), modified EASI, Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), objective SCORAD, Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2017 Nov; 177(5):1316–1321. doi: 10.1111/bjd.15641, Epub 2017 Oct 1, PMID: 28485036.
100. Shiohara. T(ed): Pathogenesis and Management of Atopic Dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* Basel, Karger. 2011, 41, 149–155, doi:10.1159/000323308.
101. SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) Calculator (0.9.0). <http://scorad.corti.li/> (pristupljeno 10. 01. 2025)
102. European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186(1);23–31.

103. Schram M.E., Spuls P.I., Leeﬂang M.M.G., Lindeboom R., Bos J.D., Schmitt J. EASI, (objective) SCORAD and POEM for atopic eczema: responsiveness and minimal clinically important difference. *Allergy*. 2012;67(1):99–106. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02719.x.
104. Vakharia P.P., Chopra R., Sacotte R., et al. Validation of patient-reported global severity of atopic dermatitis in adults. *Allergy*. 2018;73(2):451–458. doi:10.1111/all.13309.
105. Schmitt J., Spuls P.I., Thomas K.S., et al. The Harmonising Outcome Measures for Eczema (HOME) statement to assess clinical signs of atopic eczema in trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;134(4):800–807. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.043.
106. The SCORAD index: How to use it? https://adserver.sante.univ-nantes.fr/Scorad_Course/Example.html (pristupljeno 10. 01. 2025)
107. Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet („Službeni list Crne Gore“, br. 004/15).
108. Talić S., Odak I., Martinović Bevanda A., Crnjac N., Paštar M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina: Volatile Composition, Variations during Seasons, Total Polyphenols, Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity. *Croatica Chem. Acta*. 2019;92(1):69–77.
109. Mancini E., De Martino L., Marandino A., Scognamiglio M.R., De Feo V. Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Molecules*. 2011;16(9):7725–7735.
110. Lorente I., Ocete M., Zarzuelo A., Cabo M., Jimenez J. Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *J. Nat. Prod.* 1989;52:267-272.
111. Rufino A.T., Ribeiro M., Judas F., Salgueiro L., Lopes M.C., Cavaleiro C., Mendes A.F. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α pinene: Structural and enantiomeric selectivity. *J. Nat. Prod.* 2014;77(2):264–269.
112. Burits, M., Asres K., Bucar F. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytother. Res.* 2001;15:103–108.
113. Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(11):3530–3535.

114. Šovljanski O., Aćimović M., Tomić A., Lončar B., Miljković A., Čabarkapa I., Pezo L. Antibacterial and Antifungal Potential of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Essential Oil. *Antibiotics* (Basel). 2024 Aug 1;13(8):722. doi: 10.3390/antibiotics13080722.
115. Mahesh Ch., Om P., Ravendra K., Rakesh Kumar B., Brij B., Mahesh K., Anil Kumar P. β -Selinene-Rich Essential Oils from the Parts of *Callicarpa macrophylla* and their Antioxidant and Pharmacological Activities. *Medicines*. 2017; 4(3):52. doi:10.3390/medicines4030052.
116. Epand R.M., Walker C., Epand R.F., Magarvey N.A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim. Biophys. Act.* 2016;1858(5):980–987.
117. Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., De Rocca Serra D., Gonny, M.; Bolla J.M. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *J. Essent Oil Res.* 2007;19(2):176–182.
118. Mastelic J., Politeo O., Jerkovic I., Radosevic N. Composition and Antimicrobial Activity of *Helichrysum italicum* Essential Oil and Its Terpene and Terpenoid Fractions. *Chem. Nat. Compd.* 2005;41(1):35–40.
119. Węglarz Z., Kosakowska O., Pióro Jabrucka E., Przybył, J.L., Gniewosz M., Kraśniewska K., Szyndel M.S., Costa R., Bączek K.B. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals*. 2022;15(6):735.
120. Mollova S., Fidan H., Antonova D., Bozhilov D., Stanev S., Kostova I., Stoyanova A. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turk J. Agric. For.* 2020; 44:371–378.
121. Bezek K., Kramberger K., Barlič-Maganja D. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Hydrosol. *Antibiotics*. 2022;11(8):1017.
122. Bongunuri H.V.R., Sha Mohammad S.H., Mohammad S.H., Rajpurohit N.K., Jeena G. Essential oils in cosmetics: Antioxidant properties and advancements through nanoformulations. *Pharmacol. Resear. – Natur. Produc.* 2025 March;6:100192. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2025.100192>.
123. Tadić V.M., Žugić A., Martinović M., Stanković M., Maksimović S., Frank A., Nešić I. Enhanced Skin Performance of Emulgel vs. Cream as Systems for Topical Delivery of Herbal Actives (Immortelle Extract and Hemp Oil). *Pharmaceutics*. 2021¹²¹ Nov

- 12;13(11):1919. doi: 10.3390/pharmaceutics13111919, PMID: 34834334, PMCID: PMC8623303.
124. Tunkay T.S., Yapar A.E. Preparation and characterization of herbal emulsion formulations. *Mar. Pharmac. J.* 2017;21(4):756–761. doi: 10.12991/mpj.2017.2.
 125. Stojiljković D., Arsić I., Tasić-Kostov M. The influence of polar and non-polar emollients on the structure and skin moisturizing potential of the emulsions stabilized by mixed emulsifier. *Act. Med. Media.* 2016;55(2):25–30. doi: 10.5633/amm.2016.0204.
 126. Andonova A., Gugleva V., Sotirova Y., Nikolova K., Marcheova M., Petkova Zh., Andonova V. Influence of natural oils on the textural and rheological properties of cosmetic creams. *Pharmacia.* 2024;71:1–10. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.71.e138613>.
 127. Zothanpuii F., Ravindran R., Selvakumar K. A review on stability testing guidelines of pharmaceutical products. *Asi. J. of Pharmac. and Clin. Res.* 2020;13(10):3–9. doi: 10.22159/ajpcr.2020.v13i10.38848.
 128. Adejokun D., Dodou K. A. Novel Method for the Evaluation of the Long-Term Stability of Cream Formulations Containing Natural Oils. *Cosmetics.* 2020;7(4):86. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040086>.
 129. Martinović M., Stojanović N., Nešić I. Textural and Sensory Characterization of Carbomeric Gels with Panthenol. *Act. Fac. Med. Naissensis.* 2022;39(2):232–243. <https://doi.org/10.5937/afmnai39-31063>.
 130. Lukić Ž.M. Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procjene. Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet. Beograd. 2014.
 131. McMullen R., Gorcea M., Chen S. Emulsions and their characterization by texture profile analysis. *Apply Topically: A Practical Guide to Formulating Topical Application.* 2014;131–154.
 132. Ali A., Skedung L., Burleigh S., Lavant E., Ringstadt L., Anderson C.D., Wahlgren M., Engblom J. Relationship between sensorial and physical characteristics of topical creams: A comparative study on effects of excipients. *Intern. J. of Pharm.* 2022;(5):613:121370. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121370>.

133. Furlan V., Bren U. *Helichrysum italicum*: From Extraction, Distillation, and Encapsulation Techniques to Beneficial Health Effects. *Foods*. 2023;12(4):802. doi: 10.3390/foods12040802.
134. Serra D., Cruciani S., Garroni G., Sarais G., Kavak F.F., Satta R., Montesu M.A., Floris M., Ventura C., Maioli M. Effect of *Helichrysum italicum* in Promoting Collagen Deposition and Skin Regeneration in a New Dynamic Model of Skin Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(9):4736. doi: 10.3390/ijms25094736.
135. Maksimović S., Stanković M., Roganović S., Nešić I., Zvezdanović J., Tadić V., Zizović, I. Towards a modern approach to traditional use of *Helichrysum italicum* in dermatological conditions: *In vivo* testing supercritical extract on artificially irritated skin. *J. of Ethnopharm.* 2023;301:115779. doi: 10.1016/j.jep.2022.115779.
136. Pekmezci E., Turgoklu M. The Effects off *Helichrysum italicum* Extract on the Extracellular Matrix of the Skin. *Acta Med. Acad.* 2023;52(3):182-187. doi: 10.5644/ama2006-124.425

BIOGRAFIJA

Đulija Hadžibeti je rođena 1987. god. u Baru. Osnovnu i srednju školu je završila u Ulcinju (nosilac diplome Luča). Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Tirani, upisala je 2006. god., a završila 2011. god. sa srednjom ocjenom 9,2. Kao student bila je dobitnik više nagrada i stipendija, među kojima se izdvajaju Studentska nagrada grada Ulcinja, za najbolje studente 2008, 2009, 2010. godine, zatim stipendija Farmaceutskog fakulteta u Tirani za studenta generacije 2010. godine.

Specijalistički rad iz farmaceutske tehnologije je odbranila 2018. god. na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu u trajanju od tri godine i stekla zvanje specijaliste farmaceutske tehnologije.

Radni odnos zasniva 2012. god. u PZU „Tea Medica Panacea“, u Ulcinju, gdje je i dalje zaposlena kao upravnik apoteke.

Od 2013. god. aktivni je učesnik FIP-a (engl. *International Pharmaceutical Federation*), gdje je učestvovala sa poster i oralnim prezentacijama. U okviru FIP-a, 2017. god. je bila član tima za organizaciju sesije mladih farmaceuta (engl. *Young Pharmacists Group (YPG)*). U istoj organizaciji 2019. god. je bila dio tima mladih farmaceuta za predlaganje sesija (engl. *Session Proposal Working Committee*).

Bila je aktivni učesnik 2018. god. na konferenciji pod nazivom *PBP World Meeting* (engl. *World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*) sa poster prezentacijom.

Od 2019. je angažovana na Medicinskom fakultetu u Podgorici, studijski program Farmacija, kao saradnik na praktičnoj nastavi iz oblasti Farmaceutske tehnologije I, II i III.

Na Medicinskom fakultetu u Podgorici 2020. god. upisala je doktorske studije, a polazna istraživanja na temu „Ispitivanje fizičko-hemijskih i farmaceutsko-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja i njihovog antiinflamatornog djelovanja na koži“ odbranila je 2022. god.

Član je komisije za kontinuiranu edukaciju u Farmaceutskoj komori Crne Gore. Član je radne grupe za izradu literature magistralnih preparata u Crnoj Gori.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Đulija Hadžibeti

Broj indeksa/upisa: 8/20

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

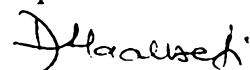
„Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja i njihovog antiinflamatornog djelovanja na koži“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja, da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedila autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

U Podgorici,

30. 04. 2025. godine

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Đulija Hadžibeti

Broj indeksa/upisa: 8/20

Studijski program: Doktorski studijski program Farmacija (Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore)

Naslov rada: „Ispitivanje farmaceutske-tehnoloških karakteristika polučvrstih preparata sa etarskim uljem smilja i njihovog antiinflamatornog djelovanja na koži“

Mentor: Doc. dr Tanja Vojinović

Potpisana: Đulija Hadžibeti

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U Podgorici,

30. 04. 2025. godine

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Ispitivanje farmaceutske-tehnološke karakteristike polučvrstih
preparata sa etarskim uljem smilja i njihovog antiinflamatornog
djelovanja na koži**

koja je moje autorsko djelo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore 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 – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima U Podgorici,

30. 04. 2025. godine

Potpis doktoranda

