

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ - ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата дипломираног фармацеута Ане Гледовић

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 16. 5. 2024. године, Одлуком број 1138/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата дипл. фарм. Ане Гледовић, под насловом:

„БИОКОМПАТИБИЛНЕ НИСКОЕНЕРГЕТСКЕ НАНОЕМУЛЗИЈЕ СА УЉЕМ СЕМЕНА МАЛИНЕ (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ЗА КОЗМЕТИЧКУ ПРИМЕНУ: ФОРМУЛАЦИОНА ИСТРАЖИВАЊА И *IN VITRO/IN VIVO* БИОПЕРФОРМАНСЕ“

Комисија у саставу:

1. **Др сци. Ивана Пантелић, ванредни професор** – председник комисије, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. **Др сци. Јелена Антић Станковић, редовни професор**, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. **Др сци. Тања Илић, научни сарадник**, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
4. **Др сци. Марија Тасић Костов, ванредни професор**, Универзитет у Нишу – Медицински факултет

прегледала је приложену докторску дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација дипл. фарм. Ане Гледовић, под називом: „Биокомпатибилне нискоенергетске наноемулзије са уљем семена малине (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) за козметичку примену: формуациона истраживања и *in vitro/in vivo* биоперформансе“ написана је на 124 стране стандардног формата (проред 1; фонт Times New Roman – 12) и подељена је у 7 целина: 1. Увод (27 страна), 2. Циљ истраживања (2 стране), 3. Експериментални део (19 страна), 4. Резултати и дискусија (53 стране), 5. Закључак (7 страна), 6. Литература (15 страна), 7. Прилог – биографија (1 страна). Поред наведених тематских целина дисертација укључује сажетак на српском и

енглеском језику и садржај, као и изјаве о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 46 слика, 27 табела и 205 литературних навода.

У **уводу** дисертације је дат систематичан преглед литературних података од значаја за предмет проучавања и постављање циљева истраживања. У поглављу 1.1. представљен је кратак историјат употребе козметичких производа који датира из античког периода. У поглављу 1.2. разматране су карактеристике савремених козметичких производа и трендови у формулацији. Поглавље 1.3. садржи свеобухватан приказ малине (*Rubus idaeus*, L. Rosaceae) као извора биоактивних састојака за примену у фармацији и козметологији. Посебан фокус био је на анализи литературних података који се тичу састава масног уља семена малине, које је одабрано као модел козметички активна супстанца од значаја за испитивање, укључујући податке о доказаним ефектима и подручјима примене. У поглављу 1.4. дат је осврт на наноемулзије као иновативне носаче козметички активних састојака, почевши од дефиниције наноемулзија и анализе кључних разлика у односу на конвенционалне (макро)емулзије и микроемулзије, као сродне субмикронске системе. Такође, детаљно су описане доступне методе за израду наноемулзија, са посебним освртом на нискоенергетске методе које су погодније за примену у случају природних сировина, као што је уље семена малине. Поглавље 1.5. описује формулационе параметре од значаја за настанак и квалитет наноемулзија (нарочито нискоенергетских), као што су избор и концентрација сурфактаната/косурфактаната и корастварача, као и састојака масне и водене фазе. Такође, дат је и кратак осврт на студије које истичу потенцијал уље у води (У/В) наноемулзија као оптималних носача за стабилизацију и/или контролисано ослобађање бројних козметички активних супстанци са антиоксидативним својствима. У поглављу 1.6. систематизовани су литературни подаци који се тичу стабилности наноемулзија, а дат је и схематски приказ и главне карактеристике прототипа стабилне наноемулзије, према актуелним сазнањима. Поглавље 1.7. посвећено је анализи предности и изазова употребе наноемулзија као козметичких производа. Представљен је и преглед доступних патената и стања наноемулзија на тржишту козметичких производа.

Генерални циљ истраживања ове докторске дисертације био је развој формулација стабилних нискоенергетских наноемулзија поступком инверзије фаза услед промене састава (енгл. *phase inversion composition method* – *PIC* метода) на бази нових природних полиглицерилских сурфактаната и традиционално коришћеног полисорбата 80, ради повећања стабилности и унапређења биоперформанси уља семена малине као перспективне природне сировине за козметичку примену. Генерални циљ обухватао је више потциљева чија је реализација спроведена кроз четири експерименталне фазе. У оквиру прве фазе истраживања први циљ био је испитивање фазног понашања четири различита уља семена малине у псеудотермалном систему полисорбат 80/уље малине/вода, како би се идентификовали кључни формулациони параметри: *surfactant-to-oil ratio* – *SOR* и *surfactant-to-emulsion ratio* – *SER*. Следећи потциљ била је оптимизација састава и удела масне и водене фазе наноемулзија. Трећи потциљ ове фазе обухватао је истраживања *PIC* механизма наноемулзификације и карактеризацију детектованих прелазних течно-кристалних гел фаза као и финалних наноемулзија на бази полисорбата 80. Коначни циљ прве фазе био је финални одабир оптималне врсте уља семена малине за сва остала испитивања. Главни циљ друге фазе истраживања био је развој формулација нискоенергетских наноемулзија са одабраним уљем семена малине и новијим природним полиглицерилским сурфактантима, недовољно истраженим у формулацијама наноемулзија. Слично као у првој фази, први потциљ друге фазе подразумевао је одређивање кључних параметара – *SOR* и *SER*, оптимизацију

масне и водене фазе полиглицерилских наноемулзија и расветљавање *PIC* наноемулзификационог пута, кроз детаљну карактеризацију кључних прелазних фаза и резултујућих наноемулзија. У оквиру треће фазе планирано је одређивање укупног садржаја кључних биоактивних састојака уља семена малине (каротеноида, токоферола и фенолних једињења). Следећи потциљ треће фазе била је процена антиоксидативне активности и оксидативне стабилности уља семена малине пре и након инкорпорирања у два различита типа наноемулзија (са полисорбатом 80 или са полиглицерилским естрима), а испитана је и могућност додатка различитих липофилних/хидрофилних коантиоксиданаса. Циљ четврте фазе експерименталног рада била је процена способности уља семена малине и других природних сировина, као и одабраних оптималних формулација оба типа наноемулзија, да испоље биолошке ефекте. Према томе, ова фаза је укључивала *in vitro* процену цитотоксичности природних сировина и наноемулзија на одабраним ћелијским линијама, а затим и *in vitro* испитивање могућности појаве окуларне иритације, и коначно, спровођење *in vivo* процене компатибилности са кожом и ефикасности одабраних оптималних полиглицерилских наноемулзија на хуманим добровољцима.

Експериментални део обухватио је опис коришћених материјала и детаљан приказ примењене методологије. Најпре је описан поступак испитивања фазног понашања у псеудотернарном систему сурфактант/масна фаза/водена фаза, а затим је дат опис поступка израде и састав прелазних фаза и наноемулзија израђених применом *PIC* методе за формулациона истраживања. Након тога су приказане методе које су коришћене за карактеризацију наноемулзија и/или прелазних фаза: одређивање величине и дистрибуције величина капи наноемулзија (применом фотон корелационе спектроскопије и ласерске дифракције), спектрофотометријско одређивање оптичке бистрине прелазних фаза и наноемулзија, поларизациона микроскопија (за дистинкцију изотропних/анизотропних прелазних фаза и детекцију евентуалног присуства агрегата сурфактанта или већих уљаних капи наноемулзија). Такође је описана и техника микроскопије атомских сила, која је била неопходна за стицање увида у субмикронску структуру наноемулзија, али и за потврду резултата добијених индиректним техникама мерења величине капи. У циљу додатног разјашњења *PIC* механизма настанка наноемулзија употребљен је сет комплементарних техника: мерење електричне проводљивости, диференцијална скенирајућа калориметрија, реолошка карактеризација и текстурна анализа кључних прелазних фаза различитог колоидног типа, као и одговарајућих финалних наноемулзија. Поменута испитивања спроведена су на више различитих сетова репрезентативних узорака. Описан је и поступак праћења физичке стабилности наноемулзија мерењем просечне величине капи (изражених као *Z-ave*), расподеле величина капи (изражене као индекс полидисперзности – *PDI*), електричне проводљивости и *pH* вредности, који је спроведен у разним фазама експерименталног рада. Даље је описана техника Раманске спектроскопије као методе погодне за брзу процену профила масних киселина (тј. укупне незасићености) различитих уља семена малине, за детекцију присуства минорних састојака уља (нпр. каротеноида), али и за праћење евентуалних интеракција међу састојцима наноемулзија. Методологија коришћена у оквиру треће фазе експерименталног рада обухватала је одређивање укупног садржаја главних биолошки активних састојака (каротеноида, токоферола и фенолних једињења) у уљу семена малине одговарајућим спектрофотометријским техникама. Потом је описана процена *in vitro* антиоксидативне активности уља семена малине, *per se* и након инкорпорирања у два различита типа наноемулзија (на бази полисорбата 80 – П80 НЕ или полиглицерилских естара – ПГ НЕ), а такође је испитан и утицај додатка различитих коантиоксиданаса на антиоксидативну активност и прелиминарну

стабилност наноемулзија чуваних на собној температури (током три месеца). У том смислу коришћена су два комплементарна теста – *DPPH* (у липофилном медијуму) и *ABTS* (у хидрофилном медијуму). Затим је детаљно описана студија оксидативне стабилности уља семена малине, без или са додатком различитих липофилних коантиоксиданаса, као и студија оксидативне стабилности наноемулзија П80 НЕ или ПГ НЕ (без или са додатком различитих липофилних и хидрофилних коантиоксиданаса), током 30 дана чувања на различитим температурама (5°C, 25°C и 40°C). Током четврте фазе спроведена су *in vitro* испитивања цитотоксичности уља семена малине и других природних сировина, као и две врсте наноемулзија П80 НЕ и ПГ НЕ (припремљених са поменутих сировинама) на одабраним ћелијским линијама. Као нормалне ћелије коришћени су хумани фибробласти плућа (*MRC-5*) и хумани кератиноцити (*HaCaT*), а испитан је и ефекат на туморске ћелије хуманог малигног меланома (*Fem-X*). У наставку је приказана методологија *Hen's egg test on the chorioallantoic membrane* – *HET-CAM* теста коришћеног у циљу процене потенцијала појединачних козметичких састојака или наноемулзија (оба типа) да изазову окуларну иритацију. Експериментални део садржи и детаљан опис *in vivo* испитивања компатибилности са кожом и *in vivo* процене ефикасности полиглицерилских наноемулзија која су спроведена на здравим хуманим добровољцима, а према протоколима који су одобрени од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу, одлуком 12-8818-2/3 од 23.09.2020. године и Етичког комитета за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, одлуком 232021, на седници одржаној 15.11.2021. године. На крају је дефинисан поступак статистичке обраде резултата добијених током фаза оптимизације састава наноемулзија, као и током формулационих истраживања, студија стабилности и *in vivo* студија.

Резултати и дискусија су прегледно приказани у четири целине које одговарају дефинисаним фазама експерименталног рада. Резултати докторске дисертације су приказани јасно и систематично, текстуално и на 37 слика и 18 табела. Дискусија је обухватила анализу и разматрање приказаних резултата са критичким освртом на резултате сродних истраживања која су описана у литератури.

Закључак докторске дисертације садржи концизно приказане закључке свих фаза који су проистекли из постављених циљева. На крају је наведен и општи закључак и научни допринос докторске дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 205 референци цитираних Харвардским стилем.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У првој фази детаљно је испитана могућност развоја формулација наноемулзија са уљем семена малине и полисорбатом 80 (П80) употребом нискоенергетске методе инверзије фаза услед промене састава (*PIC* метода), на собној температури. Прво је спроведено испитивање фазног понашања у псеудотернарном систему П80/уље семена малине – РО/вода, а тестирана су 4 различита РО: хладно цеђена (из стандардне агрокултуре, рафинисано – РО1 или органско, нерафинисано – РО2) и *CO*₂-екстрахована (из стандардне агрокултуре, нерафинисано – РО3 или органско, нерафинисано – РО4). Као исход ових испитивања идентификовани су кључни формулациони параметри при чему су минималне вредности *SOR* и *SER* биле 1 и 10 редом. Такође, утврђено је да је избор уља семена малине значајно утицао на карактеристике добијених наноемулзија са полисорбатом 80 (П80 НЕ), као стабилизатором. У даљем току прве фазе извршена је оптимизација масне фазе (додатком токоферил ацетата и/или изостеарил изостеарата),

као и водене фазе додатком глицерола или хидрогликолних екстраката плода малине – РЕ или храста китњака – ФЕ, као потенцијалних костабилизатора и коантиоксиданаса. Рамански спектри уља семена малине (РО1–РО4) показали су да постоје fine разлике у профилу масних киселина, а у органским уљима малине (РО2 и РО4) детектовано је и присуство каротеноида. Раманском спектроскопијом детектоване су и интеракције између уља РО2, П80 и глицерола у воденој средини, што је резултирало формирањем П80-РО2 НЕ са најмањом величином капи и најбољом прелиминарном стабилношћу у односу на друга уља малине. Као исход опсежних преформулационих истраживања извршен је коначан одабир оптималног уља семена малине (хладно цеђено, органско, нерафинисано – РО2) за даљи експериментални рад, након чега је спроведена детаљна карактеризација кључних гел фаза и резултујућих наноемулзија добијених применом *PIC* методе. Наиме, комбинација микроскопске анализе, мерења електричне проводљивости, реолошке и текстурне анализе, показала је да су прелазне фазе течно-кристалне природе (тј. изотропне, кубне гел фазе), док су финалне наноемулзије биле млечно-беле и течне, са неутновским типом протицања. Оптималне П80 НЕ припремљене са РО2 (4,5 до 9%) и различитим хидрофилним и/или липофилним адитивима имале су просечну величину капи од 122,3 до 134,8 nm и *PDI* од 0,054 до 0,086, што је потврђено и микроскопијом атомских сила. Ове формулације су показале и добру прелиминарну стабилност, с обзиром да није било драстичних промена праћених параметара (*Z-ave*, *PDI*, *pH* и електрична проводљивост), а такође је и оптичком микроскопијом потврђено одсуство агрегата и уљаних капи након 45 дана чувања на собној температури.

Током друге фазе експерименталног рада у фокусу је био развој побољшаних формулација нискоенергетских наноемулзија са новијим природним полиглицерилским сурфактантима и одабраним уљем семена малине РО2. Као главни сурфактант одабран је полиглицерил-4 лаурат (П4Л), али он није могао да замени П80 у формулацијама добијеним током прве фазе рада, због чега се морало приступити оптимизацији састава полиглицерилских наноемулзија (ПГ НЕ) *de novo*. Студија фазног понашања показала је да наноемулзије могу настати комбинацијом П4Л са другим полиглицерилским естрима, уз нови емолијенс сертификован за природну козметику – етилхексил пеларгонат као главни састојак масне фазе и са водом као трећом компонентом. Слично као у првој фази, оптималне вредности *SOR* и *SER* биле су 1 и 10, редом. Међутим, како би се добиле наноемулзије веома финих капи (≤ 100 nm) био је неопходан и додатак косурфактанта (косурфактант 1– смеша феноксиетанола и етилхексилглицерина или косурфактант 2 – парфемско уље малине). Максимална концентрација уља семена малине РО2 која је могла бити инкорпорирана у масну фазу износила је 2%, и то тек уз додатак значајне концентрације глицерола у водену фазу (24%), рачунато на укупну масу ПГ НЕ, невезано за то који косурфактант је употребљен. На овај начин добијене су ПГ НЕ са уљем РО2 значајно мањих величина капи ($Z-ave < 70$ nm, $PDI < 0,1$) и побољшане стабилности у односу на бланко наноемулзију. Као важан део ове фазе, спроведена су детаљна истраживања *PIC* механизма настанка ПГ НЕ, применом комбинованих техника карактеризације, чиме су идентификована 2 наноемулзификациона пута која укључују течне прелазне фазе микроемулзионе структуре (изотропне, њутновске течности). Финалне ПГ НЕ имале су веома леп, полу-транспарентан изглед уз карактеристичан плавичасти одсејај, услед веома финих величина капи ($Z-ave < 65$ nm и $PDI < 0,12$), што је потврђено и путем микроскопије атомских сила, а биле су и стабилне током три месеца чувања на собној температури. ПГ НЕ су такође биле компатибилне са хидрогликолним екстрактима РЕ/ФЕ, с тим да је запажено да се ови екстракти могу додати само на крају израде, како се не би нарушио процес формирања наноемулзија (за

разлику од П80 НЕ код којих је додаток поменутих екстраката био могућ и на почетку израде).

У трећој фази, применом одговарајућих спектрофотометријских метода потврђено је да РО2 садржи три врсте природних антиоксиданаса у саставу (каротеноиде, токофероле и фенолна једињења). Резултати испитивања чистог РО2 потврдили су концентрациону зависност антиоксидативне активности, при чему је активност РО2 била већа у липофилној средини ($\%INH_{DPPH} \sim 74,72\%$), него у хидрофилној средини ($\%INH_{ABTS} \sim 95\%$), што је било у складу са очекивањима. Изразиту антиоксидативну активност према оба слободна радикала испољио је екстракт храста китњака – ФЕ ($\%INH_{DPPH} \sim 82\%$ и $\%INH_{ABTS} \sim 95\%$), док је РЕ екстракт показао слабу антиоксидативну активност. Запажена антиоксидативна активност обе врсте наноемулзија (П80 НЕ и ПГ НЕ) са уљем малине РО2 била је генерално у складу са концентрацијама природних сировина (уља малине и хидрогликолних екстраката) у њиховом саставу, при чему је додаток ФЕ екстракта у водену фазу (4%) оба типа наноемулзија значајно повећао % инхибиције оба слободна радикала у односу на наноемулзије са уљем РО2 без овог адитива. Додатно, антиоксидативна активност наноемулзија остала је незнатно промењена након 3 месеца чувања на собној температури, што је био индикатор њихове добре прелиминарне стабилности и ефикасности као носача за испитиване липофилне/хидрофилне природне антиоксидансе. Важан део треће фазе била је упоредна анализа оксидативне активности уља РО2 пре и након инкорпорирања у ПГ НЕ и П80 НЕ (припремљених без или са додатком различитих липофилних/хидрофилних антиоксиданаса) приликом чувања на различитим температурама. Наиме, закључено је да је оксидативна стабилност чистог уља малине РО2, као и РО2 са додатним антиоксидансима (природно етарско уље оригана – ОРЕ или синтетски, бутилхидрокситолуен – БХТ) била задовољавајућа током 30 дана чувања на 5°C и 25°C. Ипак, на 40°C запажена је оксидативна деградација уља – у случају додатка БХТ је била умерена (за обе тестиране концентрације, тј. 0,2% и 0,6%), док је у случају ОРЕ дошло до веће нестабилности у односу на чисто уље, што је потврдило да ОРЕ није адекватан антиоксиданс за уље семена малине. Када је реч о наноемулзијама, П80 НЕ показале су изразиту оксидативну нестабилност на 40°C што је била последица прооксидативне интеракције између РО2 и компонената наноемулзија, с обзиром да је у случају дисперзије чистог сурфактанта у води и бланко наноемулзије знатно спорије дошло до формирања оксидационих производа. Ипак, додаток било ког од тестираних антиоксиданаса (посебно БХТ или ФЕ) или чување у фрижидеру (на 5°C) значајно су инхибирали формирање оксидационих производа, тј. побољшали су оксидативни статус П80 НЕ. Са друге стране, ПГ НЕ су показале добру физичкохемијску и оксидативну стабилност на свим температурама чак и без додатка антиоксиданса, што је указало да слој полиглицерилских сурфактаната има кључну улогу у заштити уља малине унутар капи наноемулзија, као и да сами полиглицерилски сурфактанти имају добру оксидативну стабилност.

Током четврте фазе применом *MTT* теста показано је да уље семена малине РО2 и друге природне сировине (екстракти РЕ/ФЕ и парфемско уље малине) имају задовољавајући безбедносни профил, имајући у виду да нису испољиле цитотоксичност на нормалним фибробластима плућа (*MRC-5* ћелије) и хуманим кератиноцитима (*HaCaT* ћелије) и такође нису показале цитотоксичност ни према ћелијама малигног меланома (*Fem-X*) које су биле одабране имајући у виду потенцијалну примену на кожи. *Fem-X* ћелије нису биле осетљиве на П80 НЕ ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$, за бланко НЕ али и П80 НЕ са активним састојцима), што је било у супротности са ПГ НЕ које су показале селективни цитотоксични ефекат према *Fem-X* ћелијама ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$). Запажена је и селективна цитотоксичност тестираних ПГ НЕ према ћелијама малигног меланома (поређењем са

ефектом ових формулација на кератиноцитима), при чему је највећи *SI* скор (*SI* скор 3) имала формулација са PO2 без додатка адитива, што указује да је уље малине PO2 у наноемулзији главни активни састојак одговоран за уочен ефекат. Резултати *HET-CAM* теста потврдили су да уље PO2 практично не изазива иритацију, с обзиром да је као липофилна супстанца остало на површини хориоалантоинске мембране и није имало ефекат на крвне судове. Са друге стране, тестиране У/В наноемулзије изазивале су реакцију различитог интензитета, при чему су П80 НЕ биле класификоване као благи иританси, а ПГ НЕ као умерени иританси, те се не може препоручити примена тестираних наноемулзија у пределу ока. Врста сурфактанта, као и велика разлика у просечној величини капи П80 НЕ и ПГ НЕ могући су узроци примећених значајних разлика у ефектима ових наноемулзија приликом *MTT* и *HET-CAM* теста. Спровођењем *in vivo* студије на здравим хуманим добровољцима потврђена је компатибилност свих тестираних узорака ПГ НЕ са кожом (тест 24 h оклузије), с обзиром да нису примећени знаци иритације, као ни значајно повећање параметара еритема индекса (*EI*) или трансепидермалног губитка воде (*TEGV*), ни значајно смањење хидратације *stratum corneum*-а (*SCH*), а имајући у виду да значајне промене наведених параметара указују на оштећење баријерне функције коже. Додатно, краткотрајна *in vivo* студија ефикасности показала је да све тестиране ПГ НЕ значајно повећају хидратацију коже (*SCH* повећање 0,5, 1 и 2 h након примене), у поређењу са нетретираном контролом и измереним базалним вредностима. Показано је и да се *pH* вредност коже није значајно променила током два сата након примене наноемулзије, што је такође потврдило добру компатибилност ПГ НЕ са кожом.

3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Међу доступним нискоенергетским методама за израду наноемулзија, метода инверзије фаза услед промене састава (*PIC* метода) једна је од метода која поседује највећи потенцијал за примену у индустрији. Главна предност ове методе је њена погодност за ширу палету сурфактаната и активних састојака, па чак и оних најосетљивијих, с обзиром да је могућа и израда на собној температури (1-3). Процедура *PIC* методе изводи се титрацијом смеше масне фазе и сурфактанта воденом фазом, при чему разблаживање (тј. промена састава) изазива промену спонтане кривине сурфактанта и инверзију фаза. Иако сами механизми настанка нису до краја разјашњени, у литератури су описане различите врсте транзиционих фаза, од течно-кристалних мезоморфних фаза ламеларне (4) или кубне структуре (2) до микроемулзија биконтинуираног типа (1), чијим даљим разблаживањем настају уље у води наноемулзије. Према томе, *PIC* метода захтева интензивна истраживања фазног понашања и конструисање псеудотермалних фазних дијаграма за сваку комбинацију смеша сурфактаната, масне фазе и водене фазе како би се идентификовао наноемулзиони регион.

У првој фази ове докторске дисертације успешно су развијене формулације нискоенергетских наноемулзија применом *PIC* методе са стандарно коришћеним нејонским сурфактантом полисорбатом 80 (П80), имајући у виду његову доказану погодност за формулације разних врста субмикронских структура попут У/В наноемулзија, микроемулзија и течно-кристалних структура са биљним уљима (5,6). У овом докторату главна активна компонента било је уље семена малине, новије природно уље недовољно истражено у наноемулзијама (7,8). Наиме, на почетку прве фазе потврђена је добра компатибилност више различитих врста уља малине са П80 применом методе конструисања псеудотермалних фазних дијаграма, а утврђени су и оптимални формулациони параметри *SER* и *SOR* (10 и 1, редом), уз могућ додаток глицерола, до 8% (рачунато на масу наноемулзије). Ови налази били су у складу са

важећим сазнањима да нискоенергетски приступ захтева веће концентрације сурфактанта у односу на високоенергетски приступ (*SER* типично између 10 и 20, *SOR* ≥ 1) и/или додаток косурфактанта и полиола (9,10). Додатак токоферил ацетата испољио је ефекат костабилизатора на П80 НЕ, што је такође било у складу са литературом (11), а потврђена је и компатибилност различитих уља семена малине са изостеарил изостеаратом, као новијим емолијентним уљем погодним за природну козметику (12), а који је неистражен у наноемулзијама. Затим су П80 НЕ додатно обогаћене и хидрогликолним екстрактима плода малине – РЕ или храста китњака – ФЕ, као потенцијалним коантиоксидансима и костабилизаторима (13,14) који су такође неистражени у наноемулзијама. Постоји неколико публикација које су се бавиле сличном тематиком, а које су указале на побољшање карактеристика наноемулзија додатком сличних природних екстраката (15,16), али је генерално ова тема још увек недовољно истражена. Такође, по први пут су приказани Рамански спектри 4 различита типа уља семена малине чиме су потврђене разлике у профилу масних киселина (тј. степену незасићености) и садржају каротеноида у овим уљима. Добијени спектри били су у складу са претходним истраживањима биљних уља са високим садржајем полинезасићених масних киселина (17), као и биљних уља која садрже каротеноиде (18). Додатно, Раманском спектроскопијом детектоване су и интеракције између уља РО2 (хладно цеђено, нерафинисано, органско уље малине), П80 и глицерола у воденој средини, што је доведено у везу са формирањем стабилнијих наноемулзија у односу на наноемулзије са другим уљима малине која нису ступала у ову интеракцију. Ово представља један од новијих приступа за карактеризацију наноемулзија (19), а добијени резултати указују да је веома значајан утицај варијација у саставу уља малине на карактеристике добијених наноемулзија. Наиме, П80 НЕ израђене са РО2 и липофилним и/или хидрофилним адитивима имале су најмању величину капи (*Z-ave*: ~122 до 145 nm) и најнижи индекс полидисперзности ($PDI \leq 0,1$), као и најбољу шрелиминарну стабилност током месец дана чувања на собној температури. Као исход опсежних формулационих истраживања потврђено је да прелазне гел фазе које су детектоване као кључне за настанак оптималних П80 НЕ са уљем малине РО2 имају кубну течнокристалну структуру. Ово је било у складу да претходно описаним фазним понашањем других П80/уље/вода система (20), те је на овај начин разјашњен и механизам формирања П80 НЕ применом *PIC* методе.

Током друге фазе експерименталног рада у фокусу је био развој побољшаних формулација нискоенергетских наноемулзија са новијим природним сурфактантима типа полиглицерилских естара и што већим садржајем природних састојака (протип природне наноемулзије). Изузев патената са ограниченим информацијама (21,22), постоји само неколико публикација које се тичу израде У/В наноемулзија (23-25) или микроемулзија (26) са полиглицерилским естрима. У овој дисертацији је показано да П4Л мора да се комбинује са другим полиглицерилским естрима како би се инкорпорирало уље малине РО2 и то уз додаток етилхексил пеларгоната као новог природног емолијенса у масну фазу, као и уз додаток глицерола у водену фазу. Ово је било у складу са претходним студијама којима је потврђено да глицерол доприноси формирању нискоенергетских наноемулзија (25) и микроемулзија (27). Оптималне *SER* и *SOR* вредности су биле исте као и у случају П80 НЕ, али је мањи % уља малине могао бити инкорпориран у случају ПГ НЕ (2% у односу на 9%). Такође, био је потребан и додаток косурфактанта на бази феноксиетанола (који је у овом случају уједно и конзерванс), слично као што је претходно описано (28). Парфемско уље малине такође је могло да се користи као косурфактант, што је било у складу са претходно описаним понашањем појединих етарских уља, која се позиционирају на међуслоју уље-вода

(29,30). Овакви налази имају практичан значај, имајући у виду да улога конзерванаса и парфема није довољно истражена у контексту формирања и стабилности наноемулзија применом *PIC* методе, иако су у питању веома чести и практично неопходни састојци свих врста козметичких емулзија. На крају друге фазе спроведена су и детаљна формулациона истраживања, којима је утврђено да су кључне прелазне фазе биле микроемулзије, чијим разблажењем воденом фазом настају наноемулзије веома финих величина капи ($Z\text{-ave} < 65 \text{ nm}$ и $PDI < 0,12$), што је било у складу са литературом (28). Добијене ПГ НЕ даље су могле бити обогачене и екстрактима РЕ и ФЕ, слично као и П80 НЕ. Као резултат ове фазе истиче се детаљна оптимизација састава полиглицерилских наноемулзија различитим липофилним/хидрофилним адитивима и идентификација механизма њиховог настанка, чиме је успешно створен протип природне козметичке наноемулзије за испоруку различитих природних активних састојака.

Резултати треће фазе потврдили су да РО2 уље семена малине садржи најмање три врсте антиоксиданаса (каротеноиде $\sim 35,16 \text{ mg/kg}$, токофероле $\sim 497,09 \text{ mg/kg}$ уља и фенолна једињења $\sim 4,29 \text{ mg}$ еквивалента галне киселине по граму уља), што је било у складу са налазима других истраживања (31–33). Уље семена малине РО2 показује и апсорпцију светлости у УВ делу спектра што је такође претходно описано (31). Ови резултати указују да уље малине РО2 представља перспективан козметички активни састојак за развој производа намењених за свакодневну заштиту коже од оксидативног стреса, као и од штетних ефеката сунчевог зрачења, што је у складу са генералним трендом употребе разних биљних уља за ову намену (34,35). У оквиру треће фазе потврђена је и антиоксидативна активност уља семена малине РО2, што је било у складу са претходним студијама (33,36), а посебна пажња је затим била посвећена и испитивањима његове оксидативне стабилности. РО2 спада у органска, хладно цеђена биљна уља богата полинезасићеним масним киселинама ($> 80\%$), те постоји реалан изазов како обезбедити његову оксидативну стабилност током чувања и коришћења, посебно на повишеној температури. На основу добијених резултата формирања примарних оксидационих производа (изражених као пероксидни број – ПБ), као и секундарних производа оксидације (изражених као пара-анисидински број – ПА и садржај деривата тиобарбитурне киселине – ТБАРС) закључено је да је оксидативна стабилност чистог уља малине РО2 и РО2 са додатним антиоксидансима била задовољавајућа током 30 дана чувања на 5°C и 25°C , с обзиром да су сви релевантни параметри остали у оквиру оптималних граница (ПБ ≤ 15 , ТБАРС ≤ 5 и ПА ≤ 10), према генерално прихваћеним лимитима за хладно цеђена биљна уља (37,38). Оксидативна деградација уља запажена је на температури од 40°C , али је успешно била решена додатком стандардног антиоксиданса (БХТ). Даљи фокус истраживања био је усмерен на опсежна испитивања антиоксидативне активности и оксидативне стабилности уља семена малине РО2 након инкорпорирања у две врсте наноемулзија (П80 НЕ и ПГ НЕ), без или са додатим липофилним/хидрофилним адитивима, и представља оригинални научни допринос ове дисертације, имајући у виду да нису рађена слична истраживања наноемулзија са уљем семена малине. Што се тиче испитивања оксидативне стабилности П80 НЕ резултати су били у складу да претходним запажањима да полисорбат 80 и наноемулзије на бази овог сурфактанта показују нестабилност на повишеној температури (39), али у овој дисертацији тај проблем је решен чувањем у фрижидеру или додатком разних антиоксиданаса. Такође, треба напоменути да лимити за вредности липидних хидропероксида, као примарних производа оксидације (ЛХ) и секундарних производа оксидације (изражених као ТБАРС) тек треба да се успоставе када је реч о наноемулзијама. Слично запажање су истакли и аутори студије која се бавила упоредном

анализом оксидативне стабилности рибљег уља у наноемулзијама и класичним макроемулзијама (40).

У четвртој фази истраживања добијени су резултати који се односе на процену цитотоксичности поменутих природних сировина и две врсте наноемулзија који су спроведни по први пут на одабраним ћелијским линијама те представљају оригинални научни допринос кандидата. Током испитивања потенцијала за окуларну иритацију показано је да уље малине није иританс (такође по први пут), а са друге стране, оба типа наноемулзија су показала потенцијал за иритацију ока (П80НЕ – благи иританси, ПГ НЕ – умерени иританси). Генерално, овакви резултати нису били изненађујући, имајући у виду да обе врсте тестираних наноемулзија садрже 10% сурфактанта. То је релативно висока концентрација, али је карактеристична за нискоенергетске наноемулзије, а познато је да су у козметичким формулацијама сурфактанти међу главним састојцима по потенцијалу за изазивање иритације (41). Коначно, резултати *in vivo* студије компатибилности са кожом показали су да тестиране полиглицерилске наноемулзије са уљем малине PO2 не иритирају кожу, да показују ефекат хидратације и не нарушавају нормалну рН вредност коже, што представља прво испитивање овог типа када је реч о полиглицерилским наноемулзијама. Добијени резултати *in vivo* студија су генерално били у складу са малобројним *in vivo* студијама која указују на велики потенцијал примене наноемулзија као носача за природна уља и екстракте за козметичку примену (41,42).

Генерално гледано, део резултата докторске дисертације дипл. фарм. Ане Глеовић у сагласности је са подацима из литературе. То се пре свега односи на опште резултате и запажања који се односе на РС методу израде нискоенергетских наноемулзије на бази полисорбата 80 као носача за природна уља, као и карактеризацију активних састојака уља семена малине. С обзиром на то да су у овој докторској дисертацији први пут разматране полиглицерилске наноемулзије као потенцијални носачи за уље семена малине и друге природне сировине, по први пут су испитивани њихова физичкохемијска стабилност и оксидативна стабилност. Такође, по први пут су испитане и биоперформансе полиглицерилских наноемулзија (цитотоксичност, потенцијал за окуларну иритацију, компатибилност са кожом и ефикасност хидратације коже). Према томе, већина резултата и специфичних запажања током треће и четврте фазе ове докторске дисертације није могла бити проверена у доступним литературним изворима и сматра се оригиналним доприносом истраживачког рада кандидата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Solans, C., Solè, I. (2012) Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 17, 246–254.
2. Solè, I., Maestro, A., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2008) Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *J. Colloid Interface Sci.*, 327 (2), 15, 433–439.
3. Maestro, A., Solè, I., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2008) Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method, *J. Colloid Interface Sci.*, 327, 433–439,
4. Guevara, M, Mercado, R., Vega, K., Cardenas, A., Forgiarini, A. (2023) Rheology and phase behavior of surfactant–oil–water systems and their relationship with O/W nano-

- emulsion's characteristics obtained by dilution. *Nanomanufacturing*, 3, 20-35.
5. Fasolin, L.H., Santana, R.C., Cunha, R.L. (2012) Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. *Colloids Surf. A*, 415: 31–40
 6. Chang, Y.Y. and McClements, D.J. (2014) Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2306–2312.
 7. Oomah, B.D., Ladet, S., Godfrey, D.V., Liang, J., Girar, B. (2000) Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chem.*, 69, 187–193.
 8. Ispiryan, A., Viškelis, J., Viškelis, P. (2021) Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil: A review. *Plants*, 10, 944.
 9. Azmi, N.A.N., Elgharbawy, A.A.M., Motlagh, S.R., Samsudin, N., Salleh, H.M. (2019) Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. *Processes*, 7, 617.
 10. Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S. (2016) Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826–2841.
 11. Mayer, S., Weiss, J., McClements, D.J. (2013) Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. *J. Colloid Interface Sci.*, 402: 122–130.
 12. Dederen, J.C., Chavan, B., Rawlings, A.V. (2012) Emollients are more than sensory ingredients: the case of isostearyl isostearate. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 502–510
 13. Rios de Souza, V., Pimenta Pereira, P.A, Teodoro da Silva, T.L., Carlos de Oliveira Lima, L., Pio, R., Queiroz, F. (2014) Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* 156, 362–368.
 14. Popović, B.M., Štajner, D., Ždero, R, Orlović, S., Galić, Z. (2013) Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *Sci. World J.*, 8.
 15. Rocha-Filho, P.A., Ferrari, M., Maruno, M., Souza, O., Gumiero, V. (2017) In vitro and in vivo evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics*, 4, 32.
 16. Ribeiro, R.C., Barreto, S.M., Ostrosky, E.A., da Rocha-Filho, P.A., Veríssimo, L.M., Ferrari, M. (2015) Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent, *Molecules*, 20(2), 2492–2509.
 17. Jiménez-Sanchidrián, C., Ruiz, J.R. (2016) Use of Raman spectroscopy for analyzing edible vegetable oils. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 51, 417–430.
 18. Duraipandian, S., Petersen, J.C., Lassen, M. (2019) Authenticity and concentration analysis of extra virgin olive oil using spontaneous Raman spectroscopy and multivariate data analysis. *Appl. Sci.*, 9, 2433.
 19. Zhu, Y., Li, Y., Wu, C., Teng, F., Qi, B., Zhang, X., Zhou, L., Yu, G., Wang, H., Zhang, S., Wang Z., Jiang, L. (2019) Stability mechanism of two soybean protein-phosphatidylcholine nanoemulsion preparation methods from a structural perspective: A Raman spectroscopy analysis. *Sci. rep.*, 9, 6985.
 20. Alam, M.M., Ushiyama. K., Aramaki, K. (2009) Phase behavior, formation, and

- rheology of cubic phase and related gel emulsion in Tween80/Water/Oil Systems. *J. Oleo Sci.*, 58: 361–367.
21. Bernard, A.-L.; Ikeda, Y.K.; El Akkari, R.; Simonnet, J.-T. Cosmetic composition. EU Patent 2941238B1.
 22. Hameyer, P.; Meyer, J.; Polak, G. Cold-Preparable, Low-Viscosity and Prolonged-Stability Cosmetic Emulsions. (2008) U.S. Patent No. 879,569,2B2.
 23. Heunemann, P., Prevost, S., Grillo, I., Marino, C.M., Meyer, J., Gradzielski, M. (2011) Formation and structure of slightly anionically charged nanoemulsions obtained by the phase inversion concentration (PIC) method. *Soft Matter*, 7, 5697–5710.
 24. Wakisaka, S., Nakanishi, M., Gohtani, S. (2014) Phase behavior and formation of o/w nano-emulsion in vegetable oil/ mixture of polyglycerol polyricinoleate and polyglycerin fatty acid ester/water systems. *J. Oleo Sci.*, 63, 229–237.
 25. Wakisaka, S., Nishimura, T., Gohtani, S. (2015) O/W nano-emulsion formation using an isothermal low-energy emulsification method in a mixture of polyglycerol polyricinoleate and hexaglycerol monolaurate with glycerol system. *J. Oleo Sci.*, 64, 405–413.
 26. Sahle, F.F.; Metz, H.; Wohlrab, J.; Neubert, R.H.H. (2012) Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 82, 139–150.
 27. Do, L.D.; Withayyapayanon, A.; Harwell, J.H.; Sabatini, D.A. (2009) Environmentally friendly vegetable oil microemulsions using extended surfactants and linkers. *J. Surfact. Deterg.*, 12, 91–99.
 28. Heunemann, P., Prevost, S., Grillo, I., Marino, C.M., Meyer, J., Gradzielski, M. (2011) Formation and structure of slightly anionically charged nanoemulsions obtained by the phase inversion concentration (PIC) method. *Soft Matter*, 7, 5697–5710.
 29. Rocha-Filho, P.A., Camargo, M.F.P., Ferrari, M., Maruno, M. (2014) Influence of lavender essential oil addition on passion fruit oil nanoemulsions: Stability and in vivo study. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 5, 198.
 30. Pavoni, L.; Perinelli, D.R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G.F. (2020) An Overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10, 135.
 31. Oomah, B.D., Ladet, S., Godfrey, D.V., Liang, J., Girar, B. (2000) Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chem.*, 69, 187–193.
 32. Van Hoed, V., de Clerq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettnick, K., Verhé, R. (2009) Berry seeds: A source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *J. of Food Lipids*. 16(1), 33–49.
 33. Yang, B., Ahotupa, M., Maatta, P., Kallio, H. (2011) Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res. Int.* 2011, 44, 2009–2017.
 34. Ácsová, A., Hojerová, J., Janotková, L., Bendova, H., Jedlickova, L., Hamranova, V., Martiniakova, S. (2021) The real UVB photoprotective efficacy of vegetable oils: In vitro and in vivo studies. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 20, 139–151.
 35. Niculae, G., Lacatusu, I., Badea, N., Stan, R., Vasile, B.G., Meghea, A. (2014) Rice bran

- and raspberry seed oil-based nanocarriers with self-antioxidative properties as safe photoprotective formulations. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 13, 703–716
36. Šučurović, A., Vukelić, N., Ignjatović, Lj., Brčeski, I., Jovanović, D. (2009) Physical-chemical characteristics and oxidative stability of oil obtained from lyophilized raspberry seed. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1133–1141.
 37. Dimić, E.B., Vujasinović, V.B., Radočaj, O.F., Pastor, O.P. (2012) Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. *APTEFF*, 43, 1–9.
 38. Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., Grajeta, H. (2014) The antioxidant activity and oxidative stability of Cold-Pressed Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91:1291–1301.
 39. Mc Clements, D.J.; Decker, E. (2018) Interfacial antioxidants: A review of natural and synthetic emulsifiers and coemulsifiers that can inhibit lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 20–35.
 40. Nejadmansouri, M., Hosseini, S.M.H., Niakosari, M., Yousefi, G.H., Golmakani, M.T. (2016) Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng.*, 506, 821–832.
 41. Rocha-Filho, P.A., Ferrari, M., Maruno, M., Souza, O., Gumiero, V. (2017) In vitro and in vivo evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics*, 4, 32.
 42. Pereira, T.A., Guerreiro, C.M., Maruno, M., Ferrari, M., Rocha-Filho, P.A. (2016) Exotic vegetable oils for cosmetic O/W nanoemulsions: In vivo evaluation. *Molecules*, 21, 248–263.

4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад објављен у међународном часопису изузетних вредности (M21a):

Gledovic, A., Janosevic-Lezaic, A., Tamburic, S., Savic, S. (2022) Red Raspberry Seed Oil Low Energy Nanoemulsions: Influence of Surfactants, Antioxidants, and Temperature on Oxidative Stability. *Antioxidants*, 2022, 11, 1898. (IF2022) = 7,0; **Chemistry, Medicinal (6/60) M21a**

Рад објављен у врхунском међународном часопису (M21):

Gledovic, A., Janosevic Lezaic, A., Nikolic, I., Tasic-Kostov, M., Antic-Stankovic, J., Krstonosic, V., Randjelovic, D., Bozic, D., Ilic, D., Tamburic, S., Savic, S. (2021) Polyglycerol Ester-Based Low Energy Nanoemulsions with Red Raspberry Seed Oil and Fruit Extracts: Formulation Development toward Effective In Vitro/In Vivo Bioperformance. *Nanomaterials*, 11(1): 217. IF(2021) = 5,719; **Physics, Applied (37/161) M21**

Рад објављен у исктакнутом међународном часопису (M22):

Gledovic, A., Janosevic Lezaic, A., Krstonosic, V., Djokovic, J., Nikolic, I., Bajuk-Bogdanovic, D., Antić Stanković, J., Randjelovic, D. Savic, S. M., Tamburic, S., Savic S. D. (2020) Low-energy nanoemulsions as carriers for red raspberry seed oil: Formulation approach based on Raman spectroscopy and textural analysis, physicochemical properties, stability and

in vitro antioxidant/ biological activity. *PLoS ONE*, 15(4): e0230993. (IF2020) = 3,240; **Multidisciplinary Sciences (26/73) M22**

Монографска студија/поглавље у књизи (M14)

Nikolić I., **Gledović A.**, Tamburić S., Major T., Savić S. (2020) Nanoemulsions as Carriers for Natural Antioxidants: Formulation Development and Optimisation. In: Aboudzadeh M.A. (eds) Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants. Food Bioactive Ingredients. Springer, Cham.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33):

Gledovic, A., Janosevic Lezaic, A., Pantelic, I., Savić, S. Natural polyglycerol ester-based low energy nanoemulsions prepared with specialty seed oils for dermal application, 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Vienna, Austria -Virtual live meeting, 2021, 11–14 May. Poster session on 12 May 2021.

Gledovic, A., Janosevic Lezaic, A., Krstonosic, V., Bajuk-Bogdanovic, D., Djokovic, J., Nikolic, I., Savić, S. Red raspberry seed oil based low energy nanoemulsions: formulation optimization and characterization. 3rd European Conference on Pharmaceutics, 2019, March 25 - 26, Bologna, Italy. Poster number 171.

Gledovic, A., Tasic-Kostov, M., Ilic, D., Janosevic-Lezaic, A., Lukic, M., Savić, S. Polyglycerol-ester based green low energy nanoemulsions – optimization of cosmeceutical formulations for antioxidant protection and skin hydration. Skin and Formulation 5th Symposium and 17th Skin Forum, 2019, September 23-24, Reims, France, Page 93.

Gledovic, A., Tasic-Kostov, M., Ilic, D., Janosevic-Lezaic, A., Nikolic, I., Djokovic, J., Savić, S. In vivo/in vitro efficacy and skin safety profile of green low energy nanoemulsions with red raspberry seed oil. 28th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2019, October 9-13, Madrid, Spain. Abstract No PO516.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

Gledović, A., Ilić T., Pantelić I., Pantelić, Savić S. Eye irritation potential of red raspberry seed oil after nanoemulsification: assessment with the HET-CAM test. Skin and Formulation, 6th Symposium, October 2-3, 2023, Nantes, France, Page 37.

Gledović, A., Janošević Ležaić, A., Savić. S. Oxidative stability of red raspberry seed oil nanoemulsions: influence of temperature, oil and antioxidants. 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20 -22. October 2022, Novi Sad, Serbia. Page 154

Gledovic, A., Janosevic-Lezaic, A., Krstonosic, V., Cekic, N., Bajuk-Bogdanovic, D., Djokovic, J., Savić, S.. Comparison of SE and PIC method-produced low energy nanoemulsions with red raspberry seed oil – structural, rheological and antioxidant investigations. Proceedings of the 10th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine, 2019, April 15–17, Graz, Austria. Poster number 35.

Gledović, A., Đoković, J., Savić, S.M., Tasić-Kostov, M., Pavlović, D., Savić, S.D. Low-energy nanoemulsions with antioxidant red raspberry seed oil and fruit extracts – Influence of extract type and its quality and different polyols on EPI nanoemulsion formation and stability. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2018, September 20-22, Szeged, Hungary. Page 175-175.

Саопштење са скупа од националног значаја штампано у изводу (M64)

Gledović, A., Janošević Lezaić, A., Savić, S. Procena uticaja nanoemulzifikacije, antioksidanata i temperature na oksidativnu stabilnost ulja semena maline za primenu na koži. 8. Kongres farmaceuta Srbije, 12-15. oktobar 2022., Beograd, Srbija. Arh. farm 2022; 72: S420–S421

Gledović, A., Krstonošić, V., Nikolić, I., Randelović, D., Đoković, J., Savić, S.M., Savić, S.D. Niskoenergetske nanoemulzije sa uljem semenki maline i antioksidantnim ekstraktima – optimizacija formulacije, strukturna i reološka ispitivanja. Arh.farm. 2018; 68(3): 632-634.

Gledović, A., Bajuk-Bogdanović, D., Uskoković-Marković, S., Pavun, L., Savić, S., Janošević Lezaić, A. Niskoenergetske nanoemulzije kao potencijalni nosači za etarska ulja u formulacijama za antioksidativnu zaštitu kože. Arh.farm. 2021; 71: S96-99.

5. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Фундаментални научни допринос ове докторске дисертације огледа се у детаљној карактеризацији, применом низа комплементарних техника, различитих врста прелазних колоидних фаза које су детектоване као кључне током настанка наноемулзије *PIC* методом, као и одговарајућих наноемулзија. Ово је било од посебног значаја када је реч о наноемулзијама припремљеним са сурфактантима на бази полиглицерилских естара, имајући у виду да је реч о новијим, природним једињењима, недовољно истраженим у наноемулзионим системима. Коначно, у овој дисертацији велика пажња била је посвећена процени и очувању биолошке активности и стабилности уља семена малине као извора природних антиоксиданаса (каротеноида, токоферола и фенолних једињења) у наноемулзијама. Генерално гледајући, као крајњи исход ове докторске дисертације показано је да полиглицерилске наноемулзије представљају супериорнији систем за инкорпорирање уља семена малине и/или других природних сировина. Добијени резултати и развијене методе могу бити коришћене у будућности за развој полиглицерилских и других врста нискоенергетских наноемулзија као система за испоруку природних козметичких сировина, у циљу побољшања њихове стабилности, ефикасности и безбедности.

6. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу извештаја о провери оригиналности докторске дисертације коришћењем програма *iThenticate* регистровано подударање текста износи 15%. Овај степен подударности је последица коришћења терминологије карактеристичне за област, уобичајено коришћених фраза у опису и тумачењу резултата, стандардне опреме и супстанци за припрему узорака, претходно публикованих резултата истраживања докторанда, цитата, личних имена, општих места и података, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

28. јуна 2024. године

Ментори:

Др сци. Снежана Савић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сци. Александра Јаношевић Лежаић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

7. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу изложеног, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата дипломираног фармацеута Ане Гледовић, чија је израда одобрена на седници Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду (Одлука бр. 61206-4711/2-21 од 30.11.2021. године) задовољава критеријуме оригиналног научног дела. Кандидат је успешно реализовао циљеве истраживања, а приказани резултати представљају оригинално и самостално научно дело са значајним научним доприносом у области козметологије. Резултати докторске дисертације су публиковани у: једном раду у међународном часопису изузетних вредности (M21a), једном раду у врхунском међународном часопису (M21) и једном раду у истакнутом међународном часопису (M22), као и једној монографској студији/поглављу у књизи (M14), четири саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34), четири саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33) и три саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију дипломираног фармацеута Ане Гледовић под називом „**Биокомпатибилне нискоенергетске наноемулзије са уљем семена малине (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) за козметичку примену: формулациона истраживања и *in vitro/in vivo* биоперформансе**“ “ и предлаже Наставно – научном већу Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај о израђеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације:

1. _____

Др сци. Ивана Пантелић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

2. _____

Др сци. Јелена Антић Станковић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. _____

Др сци. Тања Илић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

4. _____

Др сци. Марија Тасић Костов, ванредни професор,
Универзитет у Нишу – Медицински факултет